

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



**ZEYTİN TAHMİNİ GLİSEROFOSFODİESTER
FOSFODİESTERAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EDA BAKİ

BALIKESİR, HAZİRAN - 2016

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



**ZEYTİN TAHMİNİ GLİSEROFOSFODİESTER
FOSFODİESTERAZ GENİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EDA BAKİ

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

Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Doç. Dr. Turgay ÜNVER

BALIKESİR, HAZİRAN - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

EDA BAKİ tarafından hazırlanan “ZEYTİN TAHMİNİ GLİSEROFOSFODİESTER FOSFODİESTERAZ 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
Doç. Dr. Turgay ÜNVER



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 2015-147 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ZEYTİN TAHMİNİ GLİSEROFOSFODİESTER FOSFODİESTERAZ
GENİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
EDA BAKİ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)**

BALIKESİR, HAZİRAN – 2016

Bu çalışmada zeytine (*Olea europaea* L.) ait bir cDNA'nın moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Yapılan biyoinformatik analizler sonucu cDNA'nın gliserofosfodiester fosfodiesteraz (*GPPDE*) genine benzer olduğu görülmüştür. *GPPDE*; bakteriler, mayalar, memeliler ve bitkiler dahil olmak üzere birçok canlıda farklı dizi yapısına sahip olarak bulunur. Yapılan biyoinformatik analizlerden alınan sonuçlara göre, Zeytin *GPPDE* (*OeGPPDE*) mRNA'sının 2250 nükleotit uzunluğunda, 749 aminoasit kodlayan 7 ekzon ve 6 introna sahip olduğu, 84119.6 kDA molekül ağırlığında ve GC oranının %34.35 olduğu görülmüştür. Ayrıca biyoinformatik analizler sonucu genin en çok serin aminoasidine sahip olduğu görülmüştür. Yapılan polimorfizm çalışmalarında genin zeytin çeşitleri arasında polimorfik olduğu belirlenmiştir. Genin karakterize edilmesi için gerekli zeytin örnekleri Edremit Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Zeytin örnekleri sıvı azot içerisinde laboratuvara getirilmiş ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir. Örnek toplama her ayın belirli günlerinde yapılmıştır. Aynı zamanda zeytin örneklerinin 'var yılı' ve 'yok yılı' zamanlarına göre toplanmasına özen gösterilmiş, genin dokusal ve zamansal sentez haritası çalışmaya dahil edilmiştir. Genin dokusal ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için zeytine ait; sürgün, meyve, çiçek, tomurcuk dokuları toplanmıştır. Ekspresyon seviyesinin en fazla olduğu dokunun olgun meyve olduğu belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Olea europaea* L., zeytin, gliserofosfodiester fosfodiesteraz, ekspresyon.

ABSTRACT

ZEYTİN TAHMİNİ GLİSEROFOSFODİESTER FOSFODİESTERAZ GENİNİN MOLEKÜLER KARKTERİZASYONU

MSC THESIS

EDA BAKİ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

(SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. EKREM DÜNDAR)

BALIKESİR, JUNE 2016

The molecular characterization of a cDNA of olive (*Olea europaea* L.) was carried out in this study. Olive tissue and organ samples were collected from Edremit Olive Research Institute in order to use for characterization of the gene. The olive samples were kept in liquid nitrogen during transportation to the laboratory. Bioinformatics analysis results showed that the cDNA was similar to gliserofosfodiester phosphodiesterase (*GPPDE*) gene. *GPPDE* exists in various living organisms including bacteria, yeast, mammals, and plants. Previous studies reported existence of different types of the gene in different species. According to results obtained from bioinformatic analysis of the gene, mRNA consisted of 2250 nucleotides, 749 amino acids as well as 7 exons and 6 introns. The molecular weight of mRNA was found to be 84119.6 kDA whereas the GC ratio was 34.35%. The results also indicated that the gene contained high proportion of serine amino acid. Polymorphism analysis revealed that gene was polymorphic. Harvesting of olives was considered according to their 'on year' and 'off year' seasons and the spatial and temporal expression pattern determination was included to the study. To determine spatial expression level of the gene, tissues were collected from shoots, fruits, flowers and buds. The highest expression level of the gene was found in mature fruits.

KEYWORDS: *Olea europaea* L., olive, glycerophosphodiester phosphodiesterase, expression.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ABSTRACT	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ	vii
SEMBOL LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Zeytin.....	1
1.2 Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Enziminin Biyokimyası.....	6
1.2.1 Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Enziminin Genel Özellikleri	6
1.3 GP-PDE Enziminin Farklı Canlılardaki İşlevleri	7
1.3.1 GP-PDE Enziminin <i>E.coli</i> 'deki işlevi	8
1.3.2 Patojen Bakterilerde GP-PDE Enzimi	8
1.3.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da GP-PDE Enzimi.....	9
1.3.4 Memelilerde GP-PDE Enzimi	10
1.3.5 Bitkilerde GP-PDE Enzimi	15
1.3.6 GP-PDE Enziminin Bitkiler İçin Önemi	17
1.3.6.1 Bitkilerde Fosfat Açlığı ve Membrandaki Lipit Organizasyonu..	17
2. MATERYAL VE METOD	21
2.1 Biyoinformatik Analiz.....	21
2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması.....	22
2.3 Bitki Materyali Toplama	22
2.4 DNA İzolasyonu.....	23
2.5 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması	23
2.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	24
2.7 Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
2.8 Toplam RNA İzolasyonu.....	25
2.9 cDNA Eldesi.....	26
2.10 Real - Time PCR	26
2.11 Klonlama Basamağı	27
2.11.1 Pürifiye DNA Eldesi	28
2.11.2 Genin Plate51 Vektörüne Klonlanması	28
2.11.3 Kompletan Hücre Hazırlanması	29
2.11.4 Çoğaltma Suşuna Aktarım	29
2.11.5 Kolonilerin Tespiti ve Seçimi	30
2.11.6 Plazmit DNA İzolasyonu	30
2.11.7 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu ve IPTG ile İndüklenmesi.....	31
2.11.8 Hücreleri Çöktürme	31
2.11.9 Lizis İşlemi	32
2.11.10 SDS-PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi.....	32
2.11.11 Western Blot	33
2.12 Kullanılan Solusyon ve Bazı Kimyasalların Hazırlanışı	34

2.12.1	LB Broth Hazırlanışı.....	34
2.12.2	LB Agar Hazırlanışı.....	34
2.12.3	Üst Tampon.....	34
2.12.4	Alt Tampon.....	34
2.12.5	SDS Tamponu.....	35
2.12.6	1.2'lik AgaroZ Jel Hazırlama.....	35
2.12.7	TBE (0.5 X) Hazırlama.....	35
3.	BULGULAR.....	36
3.1	Biyonformatik Analiz.....	36
3.2	Blast Analizleri.....	36
3.3	Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Geninin Farklı Zeytin Çeşitleri Arasındaki Polimorfizmi.....	39
3.1	NCBI ve GenScan Veritabanlarında Elde Edilen Tahmini cDNA Dizileri.....	41
3.2	BioEdit programında yapılan analizler.....	44
3.3	ExpAsy Programında Yapılan Analizler.....	46
3.4	Clc Genomic analizi.....	49
3.5	Phlogeny.fr Programı Analizi.....	50
3.6	Real-Time PCR Sonuçları.....	52
3.7	Klonlama Basamağına Ait Bulgular.....	54
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
5.	KAYNAKLAR.....	62
6.	EKLER.....	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: TÜİK verilerine göre Türkiye’de zeytin yetiştirilen yerler	2
Şekil 1.2: TÜİK verilerine göre, şehirlere göre zeytin üretim oranı.....	2
Şekil 1.3: GP-PDE enzimin rol oynadığı tepkime.....	6
Şekil 1.4: GP-PDE enziminin 3 boyutlu yapısı	7
Şekil 1.5: Memeli GP-PDE ailesi üyelerinin hücre içindeki yerleşimi	11
Şekil 1.6: GPDP1’in kromozom üzerindeki yerleşimi	11
Şekil 1.7: GPDP2’nin kromozom üzerindeki yerleşimi.....	11
Şekil 1.8: GPDP3’ün kromozom üzerindeki yerleşimi.....	11
Şekil 1.9: GPDP4’ün kromozom üzerindeki yerleşimi.....	12
Şekil 1.10: GPDP5’in kromozom üzerindeki yerleşimi.....	12
Şekil 1.11: <i>Arabidopsis thaliana</i> ’ya ait GP-PDE ailesi.....	16
Şekil 1.12: Kennedy yolu.....	18
Şekil 1.13: G3P’nin glikoliz reaksiyonlarına katılma basamakları	19
Şekil 1.14: G3P’nin lipit metabolizmasına katılması	20
Şekil 3.1: gDNA dizisinin nBLAST analizi sonucu.....	36
Şekil 3.2: gDNA dizisine benzeyen nükleotit kayıtları.	37
Şekil 3.3: Blast analizi sonucu intron ve ekzon yerleşimi.	37
Şekil 3.4: Tasarlanan primerlerle kurulan PCR sonucu.....	38
Şekil 3.5: Farklı zeytin çeşitlerinden elde edilen DNA örnekleriyle kurulan PCR sonucu görüntüsü.....	40
Şekil 3.6: GP-PDE dizileriyle Phlogeny.fr programı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.	40
Şekil 3.7: Polimorfizm örneklerinin kramotogramları.	41
Şekil 3.8: Polimorfizm sonuçları.	41
Şekil 3.9: NCBI BLAST analizi sonucu elde edilen tahmini cDNA dizisi.	42
Şekil 3.10: GenScan analizi sonucu elde edilen tahmini cDNA dizisi.....	43
Şekil 3.11: GenScan analizi sonucu elde edilen tahmini aminoasit dizisi.....	44
Şekil 3.12: BioEdit programında analiz edilen OeGP-PDE geninin aminoasit dizisi.	44
Şekil 3.13: OeGP-PDE geninin aminoasit kompozisyonu.....	45
Şekil 3.14: <i>OeGP-PDE</i> geninin nükleotit kompozisyonu.	45
Şekil 3.15: <i>OeGP-PDE</i> geninin hidrofobisitesi.....	46
Şekil 3.16: <i>OeGP-PDE</i> ’nin protein özelliği.	46
Şekil 3.17: <i>OeGP-PDE</i> ’nin hücre lokalizasyonu.	47
Şekil 3.18: <i>OeGP-PDE</i> ’nin sinyal peptid analizi.	47
Şekil 3.19: <i>OeGP-PDE</i> ’nin transmembran domain analizi.	48
Şekil 3.20: <i>OeGP-PDE</i> geninin aminoasit dizisi.	48
Şekil 3.21: <i>OeGP-PDE</i> geninin molekül ağırlığı.....	49
Şekil 3.22: <i>OeGP-PDE</i> genine ait atomik kompozisyon.	49
Şekil 3.23: Phlogeny.fr programında oluşturulan filogenetik ağaç.	51
Şekil 3.24: GP-PDE geninin <i>Arabidopsis thaliana</i> ’da bulunan homologları ve zeytinde bulunan benzerlerinden oluşan filogenetik ağaç.....	52

Şekil 3.25: Farklı dokularla yapılan ekspresyon analizi.....	53
Şekil 3.26: Farklı aylarda toplanmış olan yaprak örnekleri.....	53
Şekil 3.27: Tasarlanan primerlerle elde edilen PCR sonucu görüntüsü.	54
Şekil 3.28: Pürifiye DNA eldesi için uygun primerlerle çoğaltılan DNA'nın PCR sonucu.....	55
Şekil 3.29: Koloni taraması sonucu kurulan PCR sonucu görüntüsü.....	56
Şekil 3.30: SDS-PAGE jel elektroforezinde rekombinant OeGP-PDE'nin görüntüsü.....	57
Şekil 3.31: Rekombinant OeGP-PDE proteininin Western blot analizi görüntüsü	57

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: Zeytinin gelişme evrelerinde su stresi	3
Tablo 1.2: TÜİK zeytin istatistikleri.	5
Tablo 1.3: Dünya’da zeytinyağı üretimi.....	5
Tablo 1.4: Dünya’da zeytin üretimi..	5
Tablo 1.5: GP-PDE enzimi izoformların isimleri, kısaltmaları ve sinonimleri.....	14
Tablo 1.6: <i>Arabidopsis thaliana</i> ’da inorganik fosfat eksikliğinde görevli genler.	20
Tablo 2.1: Real-Time PCR’da kullanılacak primerler	27
Tablo 2.2: pLATE51 vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılan primerler	27
Tablo 3.1: Şekil 3.4’deki PCR görüntüsünün koşulları.	38
Tablo 3.2: Polimorfizm çalışmasında kullanılan zeytin çeşitleri.....	39
Tablo 3.3: Clc Genomics veri tabanından elde edilen kopya sayısı ve yakın akraba analizi.....	50

SEMBOL LİSTESİ

BLAST	:	Basic local alignment search tool
cDNA	:	Complementary DNA (Komplementer DNA)
dNTP	:	Dinükleotit trifosfat
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DEPC	:	Dietilpirokarbonat
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
GAPDH	:	Gliserol-3fosfat dehidrogenaz
GP-PDE	:	Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz
gDNA	:	Genomik DNA
kDa	:	Kilo Dalton
IPTG	:	İsopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid
LB	:	Luria - Bertani
MgCl₂	:	Magnezyum Klorür
nBLAST	:	Nükleotit Basic local alignment search tool
NH₄SO₄	:	Amonyum Sülfat
NCBI	:	National Center for Biotechnology Information
ORF	:	Open reading frame (Açık okuma çerçevesi)
pBLAST	:	Protein Basic local alignment search tool
PCR	:	Polymerase chain reaction
PMSF	:	Fenil metan sülfanil florid
RNA	:	Ribonükleik asit
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SDS-PAGE	:	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
TAE	:	Tris asetik asit
TBE	:	Tris borik asit
TE	:	Tris-EDTA
T_m	:	Melting temperature (Erime sıcaklığı)
GroPIIns	:	Gliserofosfoinositol
Gro3p	:	Gliserol 3-fosfat

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım boyunca tecrübeleriyle beni yönlendiren, destek olan, ondan çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a,

Her zaman, her türlü desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Doç.Dr. Fatih COŞKUN, Prof. Dr. Selma SİNAN'a,

Labaratuar çalışmalarında yanımda olan ve bir sürü işler başardığımız sevgili labaratuar arkadaşlarım ve hocalarım, Görkem DENİZ SÖNMEZ, Tuğba ÇAKMAK, Özgün SALI, Ali Can KAYA, Büşra BAŞ, Sümeyye ALTUNOK, Suna BOZKURT'a,

Deney çalışmalarımnda bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım, Merve KARAMAN, Özge TOK, Gamze GÜNGÖR, Aynur AYBEY'e,

Bu zamana kadar yanımda olan çok değerlilerim Ece DİNLER, Oğuzhan ÖZER, Volkan CANSIZ'a,

Hayatımda rol model olarak aldığım, çoğu şeyi öğrendiğim sevgili ilkokul öğretmenim Mesut ÖZER'e,

Beni büyüten ve her zaman maddi manevi yanımda olan saygıder büyüklerim başta dayım Ali ŞAHİN olmak üzere, ŞAHİN ailesine,

Çekirdek ailem, yanımda olduklarını hep hissettiğim sevgili annem Songül İNCE, babam Yüksel İNCE ve kardeşim Fikriye İNCE'ye

Yanımda oldukları ve hayatıma değer kattıkları için sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin

Zeytin bitkisi (*Olea europaea* L.); zeytingiller (Oleaceae) familyasına ait bir ağaç olup meyvesi için yetiştirilen [1] ve dünya tarihinde uzun yıllardır varolan (antik çağdan günümüze) bir ağaçtır. Uzun yıllar varlığını sürdürebiliyor olması, kuraklığa dayabilme özelliğinden kaynaklanmaktadır [2].

Yaklaşık olarak 20-29 yaygın çeşidi bulunmaktadır [3]. Zeytin bitkisi $2X = 46$ kromozoma sahiptir.

Olea europaea, iki ana gruptan oluşur. Bunlar *O. europaea sylvestris* ve *O. europaea sativa*'dır. *O. europaea sylvestris* yabani zeytinler olarak tanımlanan çeşitleri, *O. europaea sativa* ise kültüre alınmış zeytinleri içermektedir [4]. M.Ö. 3000 yıllarında kültürel zeytin çeşitleri yetiştiriciliğine başlanmıştır [5].

Zeytin adını; Yunanca elaiia, Latince olea'dan alır [6]. Zeytinin ismi zayit kelimesinden, zeytinyağının ismi ise ulu isminden türetilmiştir [7].

Zeytin ağacı, her dem yeşil kalabilen akdeniz ikliminde yetişen bir ağaçtır. Zeytin ağacının uzunluğu 2-10 metre arasındayken 15-20 metreye kadar çıkabilecek yapıdadır [6].

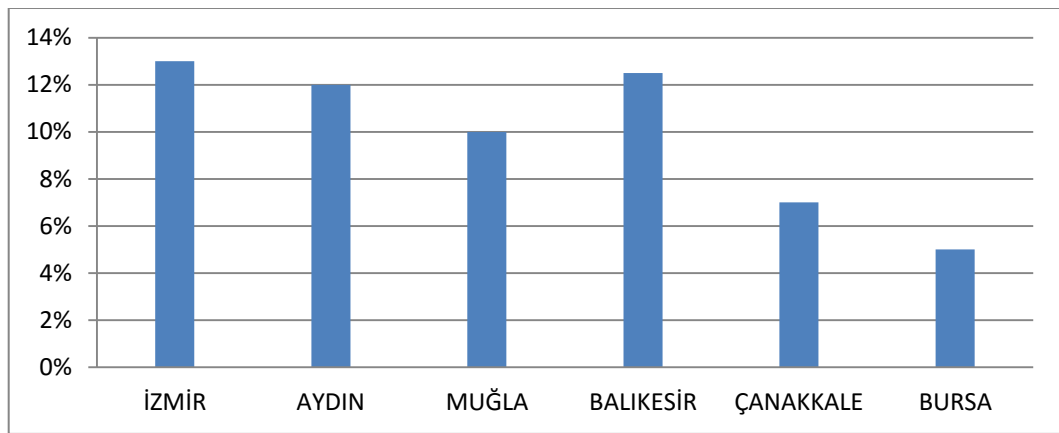
Zeytin ağacının anavatanı Güney Ön Asya olarak kabul edilmektedir [8]. Güney Ön Asya bölgesi Doğu Akdeniz ile Türkiye sınırları içerisindeki Hatay, Gaziantep ve Kahramanmaraş illerinin çevresi olarak kabul edilir [2]. Genetik olarak zeytin ağacının anavatanı hakkında çeşitli görüşler olmasına rağmen asıl yurdunun Güneydoğu Anadolu Bölgesi olduğu, bilhassa Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ne ait Mardin, Maraş ve Hatay illeri arasında kalan bölge olduğu

düşünülmektedir [9]. Dünyanın belli bölgelerinde yayılış göstermesine rağmen günümüzde %98'i Akdeniz ülkelerinde bulunmaktadır [10].

Zeytin, Türkiye'de Güneydoğu Anadolu, Akdeniz, Ege ve Marmara kıyı kesimleri, Karadeniz kıyılarında yetiştirilmektedir. Zeytin için uygun şartlara sahip iç kesimlerde de, az miktarda da olsa zeytin yetiştirildiği görülmektedir [11]. Türkiye, zeytin üretiminde dünya da 4. Sıradadır. Türkiye'de yaygın olarak zeytin yetiştirilen yerler Şekil 1.1'de, şehirlere göre zeytin üretimi Şekil 1.2'deki gibidir.



Şekil 1.1: TÜİK verilerine göre Türkiye'de zeytin yetiştirilen yerler (TÜİK 2013 verilerinden esinlenerek oluşturulmuştur) [12].



Şekil 1.2: TÜİK verilerine göre, şehirlere göre zeytin üretim oranı. (TÜİK 2013 verileren göre oluşturulmuştur) [12].

Zeytin ağacı morfolojik olarak; 10 metreye kadar boyu uzayabilen, dalları sık ve yukarılara doğru yayvan, yaprakları deri görünümlü sert, kısa ve mızraksı yapıya sahip, odunu çürümelere karşı dayanıklıdır. Zeytin ağacı bakımı yapılmazsa çalı görünümüne bürünebilir. Uzun süre varlığını sürdüren ve her zaman yeşil kalabilen bir ağaçtır. Zeytin ağacı Nisan - Mayıs aylarında çiçeklenir, Ekim - Kasım aylarında da meyveleri olgunlaşır. Meyve önceleri yeşil renkten daha sonra mor ve siyah renge dönüşür [10]. Zeytin meyvesinin bazı fiziksel özellikleri; tane ağırlığı: 2-12 gr, meyve kabuğu: %1.5-%3.5, çekirdek kabuğu: %13-%30, et oranı: %66-%85'dir. Zeytin meyvesinin bileşimi; su: %50-%70, yağ: %15-%30, protein: %1-%3, lif: %1-%3, kül: %1-%5, şeker: %2-%6, trigliserit: %99.8, doymuş yağ asitleri: %14, oleik asit%55-%83, linoleik asit: %3.5-%21, linonelik asit: %0.0-%1.5, kolesterol: 0, polifenoller: 300 mg/kg, palmitik asit.: %7-5%21 oranlarındadır [11].

Meyve ağaçlarını birbirini takip eden senelerde, birinin diğerinden fazla ürün alındığı olaya periyodisite denir. Zeytin bitkisinde de periyodisite özelliği görülür. Meyvenin çok olduğu yıl 'var yılı', daha az ya da hiç olmadığı yıl 'yok yılı' olarak adlandırılır [13]. Genellikle yabani çeşitler de periyodisite daha sık görülür.

Zeytin yetiştirirken; sıcaklık, yağış, rüzgar, yükseklik ve yön koşulları önemlidir [11]. Zeytin kuraklığa dayanıklı bir bitkidir ancak suyun toprakta muhafaza edilmesi ve nem dengesinin korunması gerekmektedir [14]. Zeytinin büyüme dönemlerine ait su stresinin etkisi Tablo 1.1'deki gibidir.

Tablo 1.1: Zeytinin gelişme evrelerinde su stresi [15].

Fizyolojik olay	Zamanı	Su stresinin etkisi
Sürgünün büyümesi	Mart – Haziran	Sürgün büyümesi azalır
Çiçek tohumu oluşması	Şubat - Mart	Çiçek tomurcuğu azalır
Çiçeklenme	Nisan - Mayıs	Abortif çiçe oluşur
Meyve tutumu	Mayıs - Haziran	Meyve tutumu azalır
Yağ oluşumu	Eylül	Meyve yağ oranı azalır

Zeytin meyvesi, farklı çeşitlerde işlenerek kullanılmaktadır. Zeytin ağacının gövdesinin kullanımının yanında meyveden elde edilen zeytinyağı tıp ve kozmetik alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır [16].

Zeytin ve zeytinyağının insan sağlığına önemli katkıları bulunmaktadır. [17]. Eski dönemlerde zeytin yaprağı tansiyona hastaları için ilaç olarak kullanılmıştır [18]. Bilinen en eski zeytinyağı üretimine dair kalıntılar ise 6500 yıl öncesinin bugünkü İsrail topraklarında kalan Haifa şehrinde bulunmuştur [19].

Zeytinyağı da tıpta önemli bir yere sahiptir. [20]. Zeytinyağı; diyabet [21] , kanser [22], mikrobiyal hastalıklar [23] tedavi edebilecek özelliklere sahiptir. Zeytinyağı aynı zamanda antioksidan [24] özelliğe sahiptir.

Zeytin organoleptik açıdan diğer meyvelerden farklılık gösterir. Diğer tek çekirdekli meyvelerde %12 ve daha fazla şeker oranı olmasına rağmen, zeytin de bu oran %2.5-6 arasındadır. Ayrıca diğer meyvelerde olmayan oleuropein adı verilen acılık maddesi bulunmaktadır. Zeytin de; fenolik bileşikler, sekoiridoidler, triterpenler, biyofenoller, benzoik asit türevleri gibi önemli bileşikler bulunur [25]. Zeytini içerisinde bulunan bileşikler Tablo 1.5'deki gibidir.

Zeytin dünya ülkeleri ve ülkemizde de ekonomik açıdan öneme sahiptir. İnsan sağlığına faydası ve birçok alanda kullanımı ekonomik değerini artırmaktadır. Türkiye'de zeytin ile ilgili veriler Tablo 1.2'deki gibidir. Dünya'da zeytin üretiminde ilk sırada İspanya yer alırken, Türkiye 4. sıradadır. Dünya'da zeytin ve zeytinyağı üretimi Tablo 1.3 ve Tablo 1.4'deki gibidir.

Tablo 1.2: TÜİK zeytin istatistikleri. TÜİK 2013 verilerine göre hazırlanmıştır [11].

Yıllar	Ağaç sayısı (bin adet)	Zeytin üretimi (ton)	Zeytinyağı üretimi (ton)
2006 – 2007	129.265	1.767.000	165.000
2007 – 2008	139.594	1.075.854	72.000
2008 – 2009	151.630	1.464.248	130.000
2009 – 2010	153.723	1.290.654	147.000
2010 – 2011	157.156	1.415.000	160.000
2011 – 2012	155.427	1.750.000	191.106
2012 – 2013	157.904	1.820.000	195.000
2013 – 2014		390.000	183.000

Tablo 1.3: Dünya’da zeytinyağı üretimi (bin ton). TÜİK 2013 verilerine göre hazırlanmıştır [26].

Ülkeler	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014
AB	2,209,000	2,444,000	1,459,000	2,308,000
Türkiye	160	191	195	180
Cezayir	67	39,5	66	62
Suriye	180	198	198	135
Fas	130	120	100	120
Arjantin	20	32	17	30

Tablo 1.4: Dünya’da zeytin üretimi. TÜİK 2013 verilerinden faydalanarak oluşturulmuştur [26].

Ülkeler	2010/2011	2011/2012	2012/2013	2013/2014
AB	828,5	741	739,5	698
Türkiye	330	400	410	438
Cezayir	192,5	145,5	175	168,5
Suriye	147	172	172	172
Fas	110	100	100	100
Arjantin	90	150	60	140

1.2 Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Enziminin Biyokimyası

1.2.1 Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Enziminin Genel Özellikleri

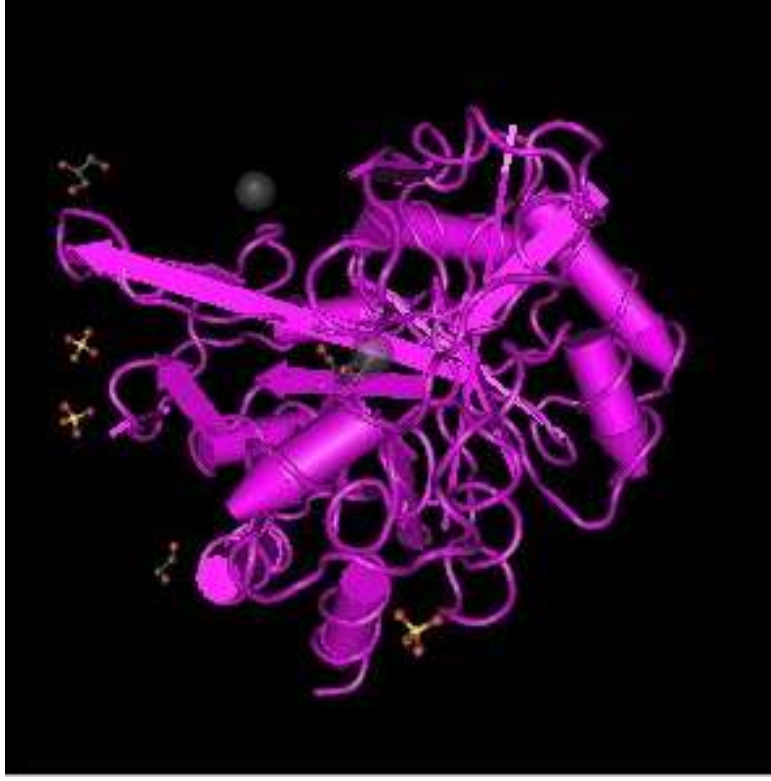
Gliserofosfodiester fosfodiesteraz (GP-PDE) enzimi, gliserofosfodiesterlerin alkol ve gliserol 3-fosfata parçalanmasında görevli bir enzimdir (Şekil 1.3) [27]. Başlıca gliserofosfodisterler; gliserofosfokolin, gliserofosfoetanolin, gliserofosfogliserol, gliserofosfoerin, bis-gliserofosfogliseroldür.

GP-PDE, aynı zaman da; glycerophosphoryl diester phosphodiesterase activity, glycerophosphodiester glycerophosphohydrolase activity, gene hpd protein, IgD-binding protein D olarak da adlandırılır.

GP-PDE enzimi hem prokaryotlarda, hem de ökaryotlarda tanımlanmış [28], önemli fizyolojik, patojenik yollarda rol aldığı belirlenmiş bir enzimdir [29]. Yapılan çalışmalarda enzimin büyüklüğünün 55 kDa olduğu belirlenmiştir. GP-PDE enzim kodu; EC 3.1.4.46'dir [29].



Şekil 1.3: GP-PDE enzimin rol oynadığı tepkime



Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase, Putative



Şekil 1.4: GP-PDE enziminin 3 boyutlu yapısı [30].

1.3 GP-PDE Enziminin Farklı Canlılardaki İşlevleri

GP-PDE enzimleri birçok canlıda tanımlanmış, karakterize edilmiş ve uzun yıllar boyunca iyi bir şekilde korunarak bu zamana kadar ulaşmış bir enzimdir. Farklı enzimatik karakterlere sahiptir ve farklı biyolojik fonksiyonlarda görev alır. Örneğin patojen bakterilerde, konak canlının immün sistemini kullanarak bakterinin hayatta kalmasını sağlarken, memelilerde iskelet sistemindeki hücrelerin çoğalmasına, bitkilerde selüloz birikmesine sebep olabilir. Memelilerde bu enzimin yedi izoformu bulunurken *Arabidopsis thaliana*'da 13 homoloğu bulunur. Enzimlerin her biri farklı dokularda farklı enzimatik aktiviteler gösterir.

1.3.1 GP-PDE Enziminin *E.coli*'deki işlevi

E.coli'de bulunan GP-PDE enzimi; gliserofosfodiesterleri gliserol 3-fosfata (Gro3P) parçalar. *E. coli*'de gliserol ve Gro3P metabolizmasıyla ilgili bir regülön vardır [31, 32, 33]. Bu regülön glpT adında bir operona sahiptir. Bu operon hem Gro3'ün sitozolden periplazmaya taşınmasını sağlayan bir geni ve aynı zamanda GlpQ genini kodlar. GlpQ periplazma da lokalize olmuş, Ca⁺ bağımlı [31] ve geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir [34]. *E.coli*'de Gro3P taşıma sistemini kodlayan ikinci bir gen vardır [35]. *E.coli*'de sitozolde bulunan bu gene UgpQ ismi verilmiştir. GlpQ ve UgpQ çok fazla benzerlik gösterirler ve ortak bir evrimsel orjine sahiptirler [36]. *E.coli* gliserofosfodiesterleri fosfat kaynağı olarak kullanır [37]. Bu iki gen, hücrenin fosfat ihtiyacı olduğu sırada ekspre olarak hücrenin fosfat açlığını giderirler [36].

1.3.2 Patojen Bakterilerde GP-PDE Enzimi

Haemophilus influenzae'da Protein D enzimi aynı zamanda hpd ve GlpQ olarak da adlandırılmıştır [38]. Kapsüllü *H. Influenzae* özellikle çocuklarda olmak üzere, üstyutak hastalıklarına sebep olur [39]. Kapsüllü olmayan *H. Influenzae* ise; kulak iltihabı, zatürre, kistik fibrozis ve solunum güçlüğü rahatsızlıkları ile ilişkilidir [40, 41, 42]. Aşılar hücre yüzeyindeki proteinlere etki ederek işlevlerini gösterirler, Protein D de hücre yüzeyindeki proteinlerle bağlantılı olduğundan dolayı, aşı yoluyla hastalıkların tedavisi sağlanabilir [43, 44].

Mycoplasma pnemonie, pnomokok hastalığına sebep olan bir pateojendir [45]. Konakladığı canlının lipid metabolizmasını kullanır. Fosfolipidler *M.pnemonie*'nin besin kaynağıdır. *M.pnemonie*'de GP-PDE enzimini kodlayan iki gen vardır; GlpQ ve MPN566. Fakat sadece GlpQ, GP-PDE'nin enzimatik aktivitesini sağlar. GlpQ aktivite göstermediği zamanlarda bakteri büyümesi azalır, hidrojen peroksit üretimini kaybeder [45]. Böylelikle hastalıklara sebep olan *M. pnemonie* işlevini kaybeder, canlıya zarar veremez.

Mycoplasma hyorhinitis'da GP-PDE aktivitesini sağlayan GPD genidir [46]. *M.hyorhinitis* doku kültürlerinde önemli kontaminasyonlara sebep olurlar ve domuz da çeşitli hastalıklara sebep olan bir patojendir [47, 48, 49]. Hücre yüzeyinde GPD aktivitesi bulunmuştur. İnsan da mide kanseri dokularında varlığı tespit edilmiştir [50, 51]. Konak canlının sadece hücre yüzeyinde değil, hücreyi (rneđin melanoma hücreleri) istila ederek de yaşamlarını sürdürürler. *M.hyorhinitis*'da GPD aktivitesi konak hücrenin hücre zarına ciddi zararlar verir [46].

Gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus subtilis*'da, sitoplazmik GP-PDE enzimi YqiK olarak bilinmektedir YqiK suyun hücrede korunmasından sorumludur [52].

Gram-pozitif bakteri olan *Staphylococcus aureus*'da A GP-PDE olarak tanımlanmıştır [53]. *S. Aureus*'da bulunan GP-PDE enziminin *E.coli* de bulunan UgpQ enzimine benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir.

1.3.3 *Saccharomyces cerevisiae*'da GP-PDE Enzimi

Saccharomyces cerevisiae (maya) moleküler biyolojide önemli bir model organizmadır. Bu canlı üzerinde yapılan çalışmalar günümüzde kullandığımız birçok bilgiye ışık olmuştur.

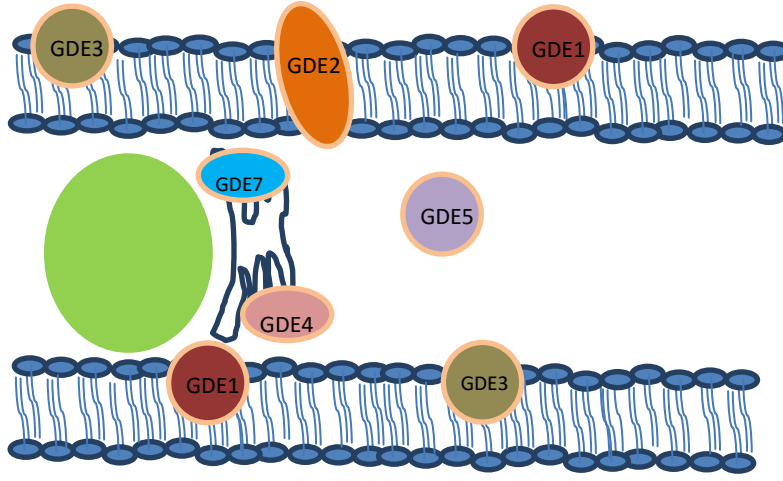
S. cerevisiae'da GP-PDE enzimi kodlayan genler YPL110c ve YPL206c olarak tanımlanmıştır [54, 55]. YPL110c geni, 1123 aminoasitten oluşan bir sitoplazmik protein kodlar ve moleküler ağırlığı 234 kDA'dur [56]. YPL100c bir gliserofosfodiester olan GroPCho hidrolizinde görevlidir [54]. YPL206c geni 321 aminoasit kopyalar ve 37 kDA molekül ağırlığına sahiptir [57]. YPL206c, hücre zarındaki fosfotidilgliserol kontrolünü sağlar [57].

1.3.4 Memelilerde GP-PDE Enzimi

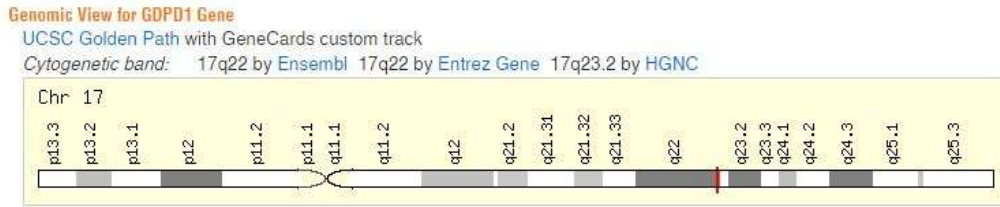
Gliserofosfodiester fosfodiesteraz enzimi memelilerde beyin [58, 59], karaciğer [60], böbrek [61] ve rahim salgısından alınan doku örneklerinde [62], iskelet sisteminde [63] tanımlanmıştır. Bu çalışmaların devamında iki gliserofosfodiester tanımlanmıştır. Bir tanesi sitozolde, diğeri membrandadır. Farklı yaşlardaki farelerin, beyinlerinin farklı bölgelerinden alınan doku örneklerinden gliserofosfokolinin özgülük gösterdiği görülmüştür. İnsanda, temporal kortex bölgesinden alınan dokuda ise iki farklı gliserofosfodisterin aktif olduğu gözlemlenmiştir. Bunlar; gliserofosfokolin ve gliserofosfoetanonamindir.

Memelilere ait yedi farklı gliserofosfodiester fosfodiesteraz enzimi vardır [64]. İnsanda da GP-PDE enziminin yedi farklı izoformu bulunur. Bu izoformlar çeşitli şekillerde adlandırılmıştır. İzofomların kısaltmaları, isimleri ve sinonimleri Tablo 1.5'deki gibidir. Memelilere ait GP-PDE'lerin hücrede buldukları yerler de farklılık gösterir (Şekil 1.5). İnsan GP-PDE ailesine ait bazı alt birimlerin kromozomda yerleşim yerleri Şekil 1.6, Şekil 1.7, Şekil 1.8, Şekil 1.9 ve Şekil 1.10'daki gibidir.

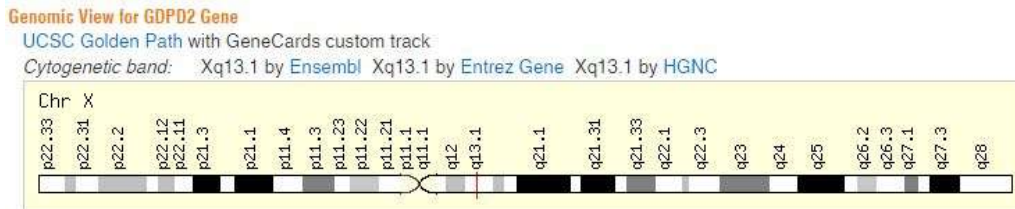
Tüm memeli gliserofosfodiesterazlarının *E.coli* UgpQ ile benzer grupta olduğu görülmüştür.



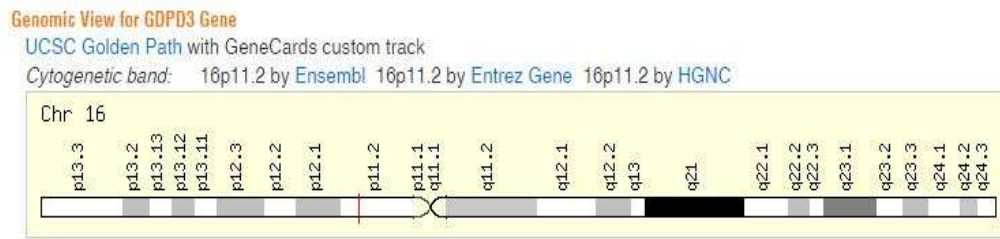
Şekil 1.5: Memeli GP-PDE ailesi üyelerinin hücre içindeki yerleşimi. D. Corda ve arkadaşlarından esinlenerek oluşturulmuştur [34].



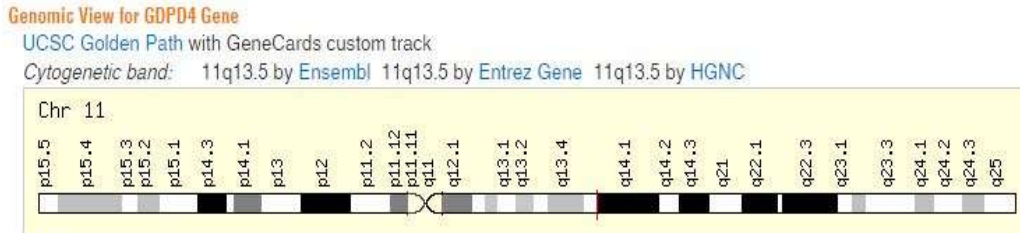
Şekil 1.6: GDPD1'in kromozom üzerindeki yerleşimi [65].



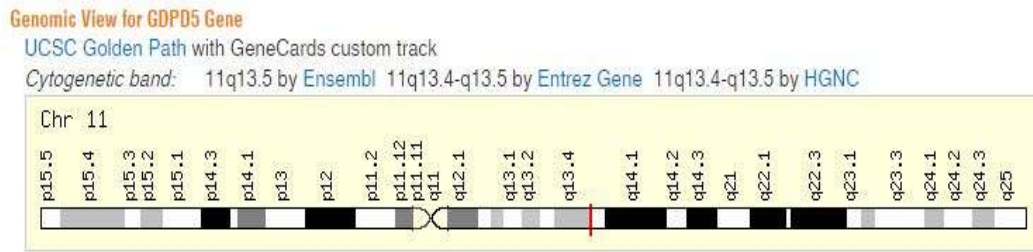
Şekil 1.7: GDPD2'nin kromozom üzerindeki yerleşimi [65].



Şekil 1.8: GDPD3'ün kromozom üzerindeki yerleşimi [65].



Şekil 1.9: GDPD4'ün kromozom üzerindeki yerleşimi [65].



Şekil 1.10: GDPD5'in kromozom üzerindeki yerleşimi [65].

GP-PDE enzim ailesinin işlevleri;

GDE1; ilk olarak insanda, Membran Interaction protein of *RGS16* (MIR16) olarak adlandırılmıştır. GDE1'in G-protein sinyallerinin düzenlenmesinde rol aldığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir [66]. Yapılan dizi analizleri ve üç boyutlu modelleme çalışmalarına göre insan GDE1 enzimi, bakterilere ait GP-PDE enzimlerine benzerlik gösterdiği görülmüştür [67]. GDE1 enziminin bakterilerde bulunan GP-PDE'lere benzerlik gösteriyor olması aynı zamanda bu enzimin uzun yıllar boyunca korunmuş olduğunu düşündürmektedir. GDE1 enzimi insanlarda 6 ekzon 5 introna sahiptir [68]. GDE1enziminin in vitro şartlarda yapılan enzimatik aktivitesinin belirlenmesi çalışmaları, GDE1'in GroPIns fosfodiesteraz aktivitesinde görevli olduğu belirlenmiştir. GDE1'in optimum pH 7.5 olduğunda aktivitesinin en fazla olduğu görülmüştür [66]. Yapılan çalışmalarda GDE1'in aynı zamanda gliserofosfodiesterlerden farklı substratları da hidroliz edebildiği görülmüştür [69]. GDE1'in plazma membranında lokalize olmuş integral membran

glikoproteindir. Aynı zamanda hücrenin iç membranında da lokalize olmuştur [66].

GDE2; GDE2 aynı zamanda insanlarda GDPD5 olarak da adlandırılır. İnsan GDE enzimi 17 ekzon ve 16 intron içermektedir [70]. GDE2, GroPCho (gliserofosfokolin) hidroliz eden bir enzimdir [71]. Transmembran protein olan GDE2 motor nöronlarının farklılaşmasında önemli bir rol oynar [72]. Aynı zamanda GDE2'nin farenin çeşitli dokularında, kalp ve akciğerinde ekspre olduğu görülmüştür [73].

Aminoasid sekanslarında GDE2 ve GDE6'nın %43,7, GDE2 ve GDE3'ün ise %34,3 benzerlik gösterdiği görülmüştür [73].

GDE3; aynı zamanda GDPD2 olarak da adlandırılır. İlk olarak yeni doğan fare osteoblastında tanımlanmıştır [74]. GDE3'ün osteoblast farklılaşmasında rol aldığı görülmüştür [75]. Aynı zamanda GDE3'ün kas dokusunda ve dalakta sentezlendiği görülmüştür [73].

GDE3 ekspresyonunun yoğun olduğu bölgeler; dalak, omurgalılarıdaki kafa içi (calvaria) ve femurdur [76].

GDE4; aynı zamanda GDPD1 olarak da adlandırılır. 10 ekzon 9 introna sahiptir. GDE4 liyofosfolipidlerin hidrolizinde görevlidir.

GDE5; aynı zamanda GPCPD1 ya da GDPD6 olarak adlandırılır. GDE5'in yoğun olarak insan beyinde ekspre olduğu görülmüştür [77]. Bununla birlikte iskelet kas sistemindeki hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında görevlidir.

GDE6; aynı zamanda GDPD4 olarak da adlandırılır. GDE6, fare testislerinde yoğun olarak sentezlendiği görülmüştür [73].

GDE7; aynı zamanda GDPD3 olarak da adlandırılır. GDE7 liyofosfolipidlerin hidrolizinde görevlidir. GDE7 ve GDE4 benzer özellikler göstermektedir [78].

Tablo 1.5: GP-PDE enzimi izoformların isimleri, kısaltmaları ve sinonimleri [28, 70,77].

Enzim adı	Kısaltma	Sinonim
Gliserofosfodiesteraz1	GDE1	GDPD1 (Gliserofosfodiester fosfodiesteraz1), insanlarda; GDE4.
Gliserofosfodiesteraz2	GDE2	İnsanlarda; GDPD5 GDE3.
Gliserofosfodiesteraz3	GDE3	GDPD2
Gliserofosfodiesteraz4	GDE4	GDPD4 (Gliserofosfodiester fosfodiesteraz4) insanlarda; GDE6, Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 4, UGPQ, UgpQ, GDPD1
Gliserofosfodiesteraz5	GDE5	GDPD5 (Gliserofosfodiester fosfodiesteraz5), insanlarda; GDE2, Glycerophosphodiester phosphodiesterase domain-containing protein 5, GPCPD, GDPD6
Gliserofosfodiesteraz6	GDE6	GDPD4
Gliserofosfodiesteraz7	GDE7	GDPD3

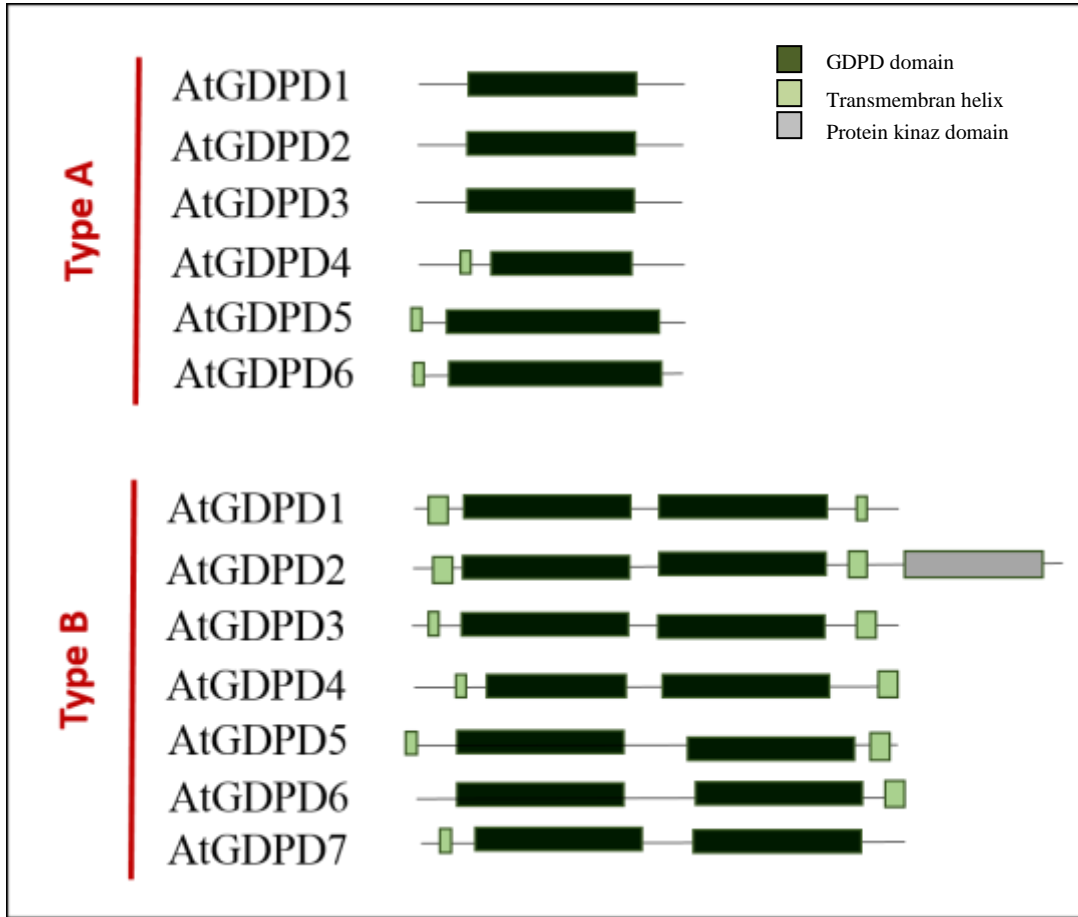
1.3.5 Bitkilerde GP-PDE Enzimi

Bitkilerde bulunan GP-PDE enzimi, moleküler ve biyokimyasal özelliklerinden dolayı bitkinin büyüme ve gelişmesinde önemli rol oynar [79].

GP-PDE enzimi ilk olarak bitki hücrelerinin vakuollerinde ve hücre duvarında tanımlanmıştır [80]. Başlangıçta; *Lupinus albus* (iki GP-PDE tanımlanmıştır), *Nicotiana tabaccum*, *Acer pseudoplatanus* bitkilerinde belirlenmiştir [80, 81, 82]. Kapsamlı olarak ise *Arabidopsis thaliana*'da çalışılmıştır [79].

A. thaliana'da yapılan genom analizleri sonucu GP-PDE enziminin ait 13 homolog (Şekil 1.11) bulunduğu ve bunların iki alt birimlere ayrıldığı belirlenmiştir. Bu iki grup Type A ve Type B olarak adlandırılmıştır. Type A enzimleri; AtGDPD1, AtGDPD2, AtGDPD3, AtGDPD4, AtGDPD5, AtGDPD6 olarak isimlendirilmiştir. Type B enzimleri; AtGDPDL1, AtGDPDL2, AtGDPDL3 (aynı zamanda SHV3 olarak da isimlendirilir), AtGDPDL4, AtGDPDL5, AtGDPDL6, AtGDPDL7 olarak isimlendirilmiştir. Type A enzimlerinin bakteri GP-PDE enzimleri ile benzerlik gösterdiği, Type B enzimlerinin ise, bitkilere özgü GP-PDE enzimleri olduğu görülmüştür. AtGDPDL3 (SHV3), enziminin hücre duvarı organizasyonunda görev aldığı görülmüştür [84].

AtGDPD genlerinin inorganik fosfat yokluğunda, inorganik fosfat kaynağı olan gliserofosfodiesterleri parçalayarak hücrenin fosfat eksikliğini gidermek için gerekli biyosentez reaksiyonlarında rol aldığı görülmüştür [83]. *L. albus* bitkisinde GP-PDE'nin fosfat yokluğunda aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir [82]. *Arabidopsis thaliana* ve diğer bazı organizmalara ait GP-PDE enzimlerinin filogenetik yakınlıkları belirlenmiştir.



Şekil 1.11: *Arabidopsis thaliana*'ya ait GP-PDE ailesi. Yuxiang Cheng ve ark. 2011'den esinlenerek oluşturulmuştur [79].

1.3.6 GP-PDE Enziminin Bitkiler İçin Önemi

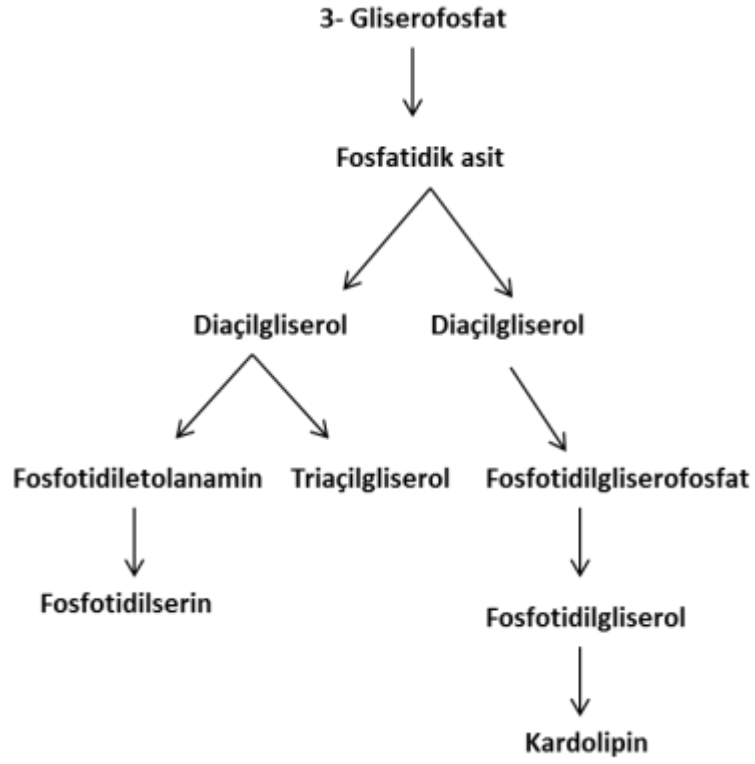
1.3.6.1 Bitkilerde Fosfat Açlığı ve Membrandaki Lipit Organizasyonu

Fosfat (inorganik fosfat; P_i) bitkiler için önemli bir besin kaynağıdır. Topraktaki P_i sınırlıdır ve bitki kökleri topraktan inorganik fosfat alamayabilir [85]. Bitkiler inorganik fosfatı dışarıdan ya da fosforlu madde içeren moleküllerden temin ederler. Köklerde bulunan kılcacal yapılar inorganik fosfatı topraktan alıp bitkinin ihtiyacını karşılamasında önemli rol oynar [86]. Alternatif olarak bitki metabolizması, membranda bulunan lipitleri kullanarak inorganik fosfat ihtiyacını karşılar [87].

Arabidopsis thaliana'da yapılan çalışmalarda da inorganik fosfat eksikliğinde çeşitli düzenlemeler olduğu görülmüştür. Fosfat eksikliği, membranda bulunan fosfolipidlerin hidrolizi ve galaktolipit biyosentezi yoluyla giderilmeye çalışılır [88].

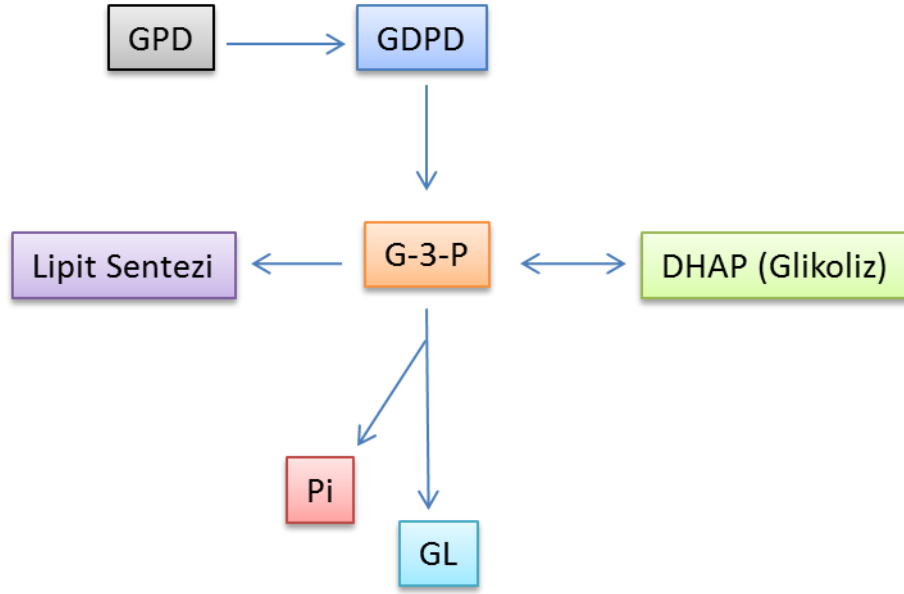
Prokaryot ve ökaryotlarda (bitkiler hariç), fosfolipidlerin hidrolizi fosfolipaz A (PLA) ve fosfolipaz B (PLB) tarafından gerçekleştirilir [89]. Bitkilerde fosfolipidlerin hidrolizi lipit açıl hidrolaz (LAH) tarafından gerçekleştirilir [90]. LAH'nın yanında GP-PDE da bitkilerdeki fosfolipidlerin hidrolizinde görevlidir [37].

GP-PDE, gliserofosfodiesterlerin gliserol 3-fosfat (G3P) ve alkole hidrolizinde görevli bir enzimdir. G3P, lipid metabolizmasına katılarak hücre membranında yer alan lipidlerin sentezinde de görevlidir. G3P Kennedy yolağı (Şekil 1.12) ile bu sentez de rol alır [88].



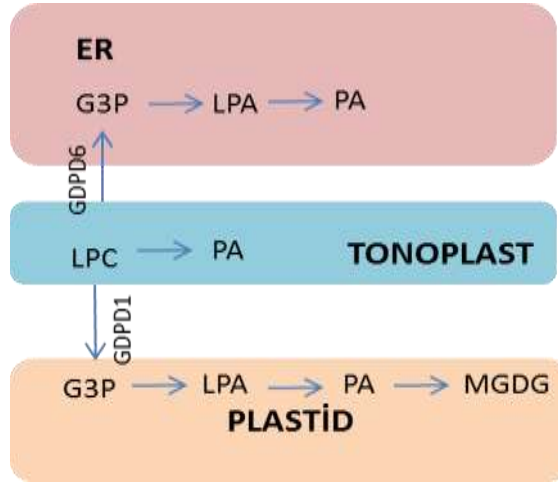
Şekil 1.12: Kennedy yolağı. William T. Wickner'den esinlenerek, düzenlenerek oluşturulmuştur [91].

Glikoliz reaksiyonlarında da G3P rol alır. G3P, gliserol 3-fosfat dehidrogenaz (GPDH) enzimi tarafından dihidroksi aseton fosfata (DHAP) dönüştürülerek glikoliz reaksiyonlarına katılır. Bu metabolik olay plastidlerde gerçekleşmez, çünkü GPDH enzimi mitokondri ve sitozolde etkinliğini gösterir [92].



Şekil 1.13: G3P'nin glikoliz reaksiyonlarına katılma basamakları. Yuxiang Cheng ve ark. 2011'den esinlenerek oluşturulmuştur [79].

Arabidopsis thaliana'da bulunan Type B enzim ailesine ait AtGDPDL3 (SHV3), bitkide selüloz birikmesi için gereklidir ve hücre duvarı organizasyonunda görevlidir [93]. SHV3 aynı zamanda kök tüylerinin morfogenezinde önemli bir rol oynar [94].



Şekil 1.14: G3P'nin lipid metabolizmasına katılması. Nakamura, 2013'den esinlenerek oluşturulmuştur [88].

Tablo 1.6: *Arabidopsis thaliana*'da inorganik fosfat eksikliğinde görevli genler. Nakamura, 2013'den esinlenerek oluşturulmuştur [88].

GEN	EKSPRESYON DOKUSU	SUBSTRAT	LOKALİZASYON
GDPD6	Polen, embriyo, genç gövde	?	?
GDPD1	Polen, embriyo, kuru tohum	GPC, GPG, GPE	Plastidler

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Biyoinformatik Analiz

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin ve proteinin hangi özelliklere sahip olduğu hakkında bilgi edinebilmek için farklı veri tabanlarındaki programlar kullanıldı.

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde daha önceki yıllarda oluşturulmuş zeytin bitkisine ait cDNA kütüphanesinden almış olduğumuz bir dizinin hangi canlıya ait olduğunu, hangi nükleotit dizisiyle benzerlik gösterdiğini belirlemek için NCBI (National Center for Biotechnology Information) NR (Non-Redundant) veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programından [95] “nBLAST” (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi yardımıyla benzerlik gösteren nükleotit dizileri bulundu. Daha sonra bu cDNA dizisi BioEdit programındaki [96] “Sorted Six – Frame Translation” bölümü yardımıyla ve Expasy web sitesindeki (<http://www.expasy.org>) “Translate” programı [97] yardımıyla aminoasit dizisi ayrı ayrı iki program tarafından belirlendi. Elde edilen aminoasit dizisine göre NCBI veri tabanındaki BLAST bölümünden “pBLAST” (Protein Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi kullanılarak hangi protein dizisine ve hangi gen ailesine benzediği tespit edildi.

cDNA dizisinin GeneScan programı [98] kullanılarak amino asit sayısı, intronlar ve intronların hangi nükleotitten başlayıp hangi nükleotitle sonlandığı ve içerisinde kaç ekzona sahip olduğu tespit edildi.

Elde edilen verilere göre gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin hangi gen ile yakın akraba ve yüzde yüz benzerlik gösterdiğini tespit etmek için CLC Genomics [99] programı kullanıldı.

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin aktif bölgesinin ve bu bölgenin özelliğinin ne olduğunu tespit etmek için NCBI veri tabanındaki CDD (Conserved Domain Database) programı kullanılarak belirlendi. Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin 3 boyutlu yapısını ve domainlerinin dizilerini tespit etmek için de Cn3D programı [30] kullanıldı.

Zeytin de bulunan gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin cDNA dizisinin nükleotit yapısı, aminoasit dizisi BioEdit programı kullanılarak belirlendi. Aynı zamanda gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin farklı zeytin çeşitlerindeki nükleotit dizisi formunun farklılık gösterip göstermediği tespit edildi. Bunun yapılması için çoğaltılan DNA örneklerinin LİGAND (İzmir) ticari firmasından gelen dizileme sonuçları BioEdit programında düzenlenerek hizalandı ve diğer zeytin çeşitleriyle karşılaştırılarak analiz edildi. Karşılaştırılan diziler arasında akrabalık derecelerine bakabilmek için Phylogeny.fr programı [101] kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu.

2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışma boyunca kullanılan cam malzemeler, PCR tüpleri, pipet uçları, ependorf tüpleri ve yüksek ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmalara başlamadan önce 121 °C'de 20 dakika süreyle 1 atm basınçta otoklavlanarak steril edildi.

2.3 Bitki Materyali Toplama

Çalışmalarda kullanılmak üzere, zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinden yaprak, meyve, çiçek dokularından örnekler toplandı. Örnekler, Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonu'nun bahçesindeki ağaçlardan toplandı. Her örnek toplandığında; hava durumu, tarih, toplanan doku örnekleri ve hangi ağaçtan toplandığına dair bilgiler not edildi. Toplanan örnekler Balıkesir

Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'ndan alınan sıvı azot içerisinde laboratuvara getirildi. Uzun süre saklanabilmesi için -80 °C dolabına yerleştirildi.

2.4 DNA İzolasyonu

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri arasındaki farklılığın olup olmadığını belirleyebilmek için gDNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için Qiagen, Hilden, Germany DNeasy Plant Mini Kit (50) (Kat No: 69104) kullanılarak kitin içerisinde bulunan prosedüre göre şu şekilde gerçekleştirildi; izole edilecek örnekler -80 °C'den çıkartılıp steril havanlarda sıvı azotla beraber toz haline gelinceye kadar ezildi. Üzerine 400 µl AP1 ve 4 µl RNase A eklendi ve vorteks yapıldı. 10 dakika 65 °C'de bekletildi. Üzerine 130 µl P3 eklendi ve 3 dakika buzda bekletildi. 5 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant QIAshredder kolona alındı ve 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon atıldı supernatant yeni bir ependorfa alındı. 900 µl AW1 eklendi ve pipetaj yapıldı. Karışımdan 650 µl DNeasy mini spin kolona alındı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj edildi. Kolona karışımın geri kalanı alındı ve 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Altta kalan sıvı atıldı. Kolona 500 µl AW2 eklendi ve 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon yeni ependorfa alındı üzerine 100 µl AE eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dakika 8000 rpm'de santrifüj yapıldı. Bu son basamak tekrarlanarak yeni bir ependorfta 2. elusyon elde edildi.

2.5 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması

PCR deneyleri için genimize özel primerler Primer3 programı [102] kullanılarak tasarlandı. Tasarladığımız primerler Macrogen (Korea) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara geldikten sonra nükleazlardan arındırılmış sudan primerlerin üzerinde yazan su miktarı kadar eklendi. 100 µL primer hazırlamak için 10 µL sulandırdığımız primer stoğundan 90 µL de nükleazlardan arındırılmış su eklendi ve kullanıma hazır hale getirildi.

2.6 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR reaksiyonları 25 µL'lik toplam hacimde manuel ve mix olmak üzere iki çeşit olarak kuruldu. Manuel PCR reaksiyonları için; forward ve reverse primerlerinden 1'er µL, 2.5 µL NH₄SO₄, 1.5 µL MgCl₂, 0.4 µL dNTP, 1.5 DMSO, 0.3 µL Taq polimeraz, 14.8 µL dH₂O, gDNA veya cDNA örneğinden 2µL kalıp olarak kullanıldı. Mix PCR reaksiyonları için; 1'er µL forward ve reverse primerlerinden, 8.5 µL dH₂O, 12.5 µL Mix, gDNA ya da cDNA örneklerinden 2µL kalıp olarak kullanıldı. Genin klonlama, polimorfizm ve intron belirlenmesinde kullanılacak DNA örnekleri tasarlanan uygun primerlerle PCR'da çoğaltıldı.

2.7 Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez için yurt içindeki firmalar aracılığıyla temin edilen Atto marka (Tokyo, Japonya) elektrofrez sistemi kullanıldı. Elektrofrezde kullanılan Agaroz (Katalog No: A9539-100G) Sigma (Taufkirchen, Almanya) firmasından temin edildi. TBE tampon çözeltisi için gerekli olan trizma bazı (Katalog No: 0826-500G) Amresco (Solon, Ohio) firmasından, borik asit (Katalog No: A0768, 1000) ve EDTA (Katalog No: A5097, 0250) ise Applichem (Darmstadt, Almanya) firmasından temin edildi. Elektrofrez de kullanmak için TBE (0.5 X) tampon çözeltisi hazırlandı. Zeytinden elde ettiğimiz gDNA, cDNA ve RNA örneklerini agaroz jel elektrofrezinde gözlemleyebilmek için %0.8'lik agaroz jeli hazırlandı. Agaroz jeli hazırlarken; 0.8 gr. agaroz tartıldı ve 100 mL TBE (0.5 X) tampon içerisine eklenip kaynatılarak agarozun erimesi ve karışması sağlandı. Karışım çeker ocağa alındı ve soğumaya bırakıldı. Bu sırada jel kaseti ve taraklar saf su ile yıkandı. Karışım soğuduğunda 1.5 µL Etidyum Bromür (EtBr) eklendi. EtBr ilave edilen karışım jel kasetine döküldü, taraklar yerleştirildi ve polimerleşmesi beklendi. Daha sonra taraklar çıkarıldı ve böylece örneklerin yükleneceği kuyucuklar hazır hale getirildi. Elektrofrez tankına jel yerleştirildi ve üzerini

kapatacak miktar kadar TBE (0.5 X) tampon çözelitisi eklendi. İlk kuyucuğa markır, diğer kuyucuklara örnekler yüklendi. Markır, Fermentas (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edildi. (Katalog No: SM1333). Manuel PCR'da; örneklerden 5 µL DNA, 1 µL (6 X) yükleme boyası (Fermantes GeneRuler™ DNA Ladders (Katalog No:SM1333)) karıştırılarak yüklendi. Mix PCR için yükleme boyasına gerek duyulmadı, kuyucuklara 5 µL DNA yüklendi ve yürütüldü. Örnekler 140 volt elektrik akımıyla 35 dakika yürütüldü. Yürütülen DNA ve RNA örnekleri UV görüntüleme cihazında gözlendi ve fotoğraf kaydedildi.

2.8 Toplam RNA İzolasyonu

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin zamansal ve dokusal ekspresyon seviyesini belirleyebilmek için 12 ay boyunca toplanan 'var yılı' ve 'yok yılı' zeytin ağaçlarından toplanıp -80 °C'de muhafaza edilen örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon için Qiagen, Hilden, Germany RNeasy Plant Mini Kit, (Kat. No: 74904) kullanıldı ve kullanım klavuzu takip edilerek şu şekilde gerçekleştirildi: -80 °C'de muhafaza edilen zeytin örnekleri steril havanın içerisine konulan sıvı azot ile toz haline getirildi. Toz hali ependorfa alındı. Üzerine 450 µL RLT tamponu eklendi ve homojen olması için vortekslendi. Kitin içerisindeki lila renkli kolona örnek aktarıldı ve 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Sıvı kısım alınarak 1.5 µL'lik steril ependorfa aktarıldı. 225 µL etanol eklendi ve alt üst edildi. Örnekten 650 µL alınarak kitin içerisindeki pembe renkli kolona aktarıldı ve 10 000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı. Kitin içerisinde bulunan RW1 tamponundan 700 µL eklendi. 10 000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı. 2 mL'lik steril toplama tüplerine kitin içerisinde bulunan kolonlar yerleştirildi. 500 µL RPE tamponu eklendi. 10 000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Bu basamak 2 defa tekrarlandı. Etanol'ün tamamen uçması için kolon 30 saniye boş bir şekilde santrifüj edildi. Örneğin üzerine 30 µL DEPC'li su ilave edildi ve 10 000 rpm'de

1 dakika santifüj edildi. Bu basamak bir kez daha tekrar edildi. 60 µL'lik DEPC'li su içinde RNA örnekleri elde edildi.

2.9 cDNA Eldesi

cDNA elde ederken RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Litvanya, Kat. No: K1631) kullanıldı. Kitin içerisindeki prosedür takip edilerek şu şekilde yapıldı: 5 µL total RNA, 1 µL oligo DT, 6 µL DEPC'li su ependorfa eklendikten sonra karışım 3-5 saniye santrifüj edildi. 5 dakika 70 °C'de inkübe edildi. İşlemler bittikten sonra buzda bekletildi. Bu aşamadan sonrası buz üzerinde çalışıldı. 4 µL 5X tampon eklendi. 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL dNTP eklendi ve birkaç saniye santrifüj edildi. 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. 1 µL Reverse Transkriptaz enzimi eklendi. 42 °C'de 60 dakika ve sonrasında 10 dakika 70 °C'de inkübe edildi.

2.10 Real - Time PCR

Zeytin ağaçlarından 12 ay boyunca ve belirlenen dokulardan alınan örneklerden RNA izole edildi. Ters transkripsiyon ile elde edilen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanıldı. Real-Time PCR için Exicycler™ 96 BIONEER cihazı kullanıldı. Real-Time PCR kurarken kullanılan cihaza uyumlu 96 kuyucuklu tabakalara malzemeler konuldu. Her bir kuyucuğa, 1 µL cDNA kalıbı, , 1 µL R primer, 1 µL F primer, 17 µL saf su eklendi. 1 döngü; 5 dakika 94 °C'de, 35 döngü; 25 saniye 94 °C'de, 25 saniye 55 °C'de, 30 saniye 72 °C'de, 1 döngü; 1 dakika 72 °C'de olacak şekilde gerçekleştirildi. Kontrol primeri olarak; GPDH, Ubiquitin ve Süperoksit dismutaz kullanıldı. Genin primerleri için ise özel olarak PRIMER3 programından faydalanarak primerler tasarlandı.

Tablo 2.1: Real-Time PCR’da kullanılacak primerler

Forward primer	ATTACTTGTGGCCAGGTTGC
Reverse Primer	CCGACTTCCCAATAACTCCA

2.11 Klonlama Basamağı

Genimizin genomik DNA’sından bir cDNA daha önce elde edildi. Elde edilen cDNA’ya göre klonlamada kullanılacak primer tasarlandı. Primerlerin kontrolü için PCR kuruldu. Tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. PCR şu şekilde yapıldı; 2’şer µL forward ve reverse primerler eklendi, 2 µL cDNA, 19 µL saf su eklendi. Mix karışımının en son eklenmesine dikkat edildi ve 25 µL Mix eklendi.

Tablo 2.2: pLATE51 vektörüne klonlama çalışmalarında kullanılan primerler

PRİMERİN ADI	PRİMER DİZİSİ
LIC Forward Sequencing primer	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
LIC Reverse Sequencing primer	5' GAGCGGATAACAATTTACACAGG 3'
Forward Primer	5' GGTGATGATGATGACAAGATGTATAAGCAGCAGTTTCTAGT 3'

2.11.1 Pürifiye DNA Eldesi

Klonlama yaparken kullanılacak kalıp DNA'yı elde ederken; tasarladığımız primerlerle PCR kuruldu. Çıkan sonuca göre PCR örneği jele yüklendi, yürütüldü. GenJET Gene Extraction Kit (Fermentes Vilnius, Litvanya Kat. No: K0691) kullanıldı. Jel şu aşamalardan geçirildi ve pürifiye DNA elde edildi; uv altına alınan jel, örneğin bulunduğu kuyucuklardan kesildi, ependorfa alındı. Üzerine 350 µL Binding tampon eklendi. 10 dakika 55 °C'de bekletildi. Kitin içerisinde bulunan kolona 800 µL örnek konuldu. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Kolonun içerisine 100 µL Binding tampon eklendi. 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolonun altında bulunan tüp atıldı. Kolona 700 µL Wash tampon eklendi ve 1 dakika santrifüj yapıldı. 50 µL Elusyon tampon kolona eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 1 dakika santrifüj yapıldı. DNA kolondan alttaki tüpe geçmiş oldu ve kolon atılarak işlem tamamlandı.

2.11.2 Genin Plate51 Vektörüne Klonlanması

Elde edilen pürifiye DNA kalıp olarak kullanılarak aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Litvanya Kat. No: 1271) kiti içerisinde yazan prosedüre takip edilerek şu şekilde yapıldı; 7 µL pürifiye DNA, 2 µL LIC tampon, 1 µL T4 DNA polimeraz eklendi. Bu işlemleri yaparken buz üzerinde çalışıldı. Kullanılan malzemeler -20 °C'de dolapta bulunan kitin içerisinde tek tek çıkarılarak kullanıldı. Bu üç malzemeyi ekledikten sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından 0.6 µL EDTA ve 1 µL plate51 eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi, işlem tamamlandı.

2.11.3 Kompetan Hücre Hazırlanması

Elimizde bulunan kompetan hücre antibiyotik içermeyen LB agara ekildi. 1 gece 37 °C inkubasyona bırakıldı. Üreme gerçekleştikten sonra tek koloni seçilip 5 mL sıvı LB'ye (antibiyotik içermeyen) alındı. 37 °C'de 1 gece 200 rpm'de çalkalayıcı etüvde bekletildi. 80 mL sıvı LB'ye 2 mL ön kültürden eklendi. OD₆₀₀ = 0.2 olana kadar 37 °C'de çalkamaya devam edildi. OD₆₀₀ = 0.2 olduğunda 1.6 mL 1M MgCL₂, 888 µL 1M glikoz eklendi ve 37 °C'de çalkamaya devam edildi. OD₆₀₀ = 0.5 olana kadar çalkalandı. OD₆₀₀ = 0.5 olduğunda buz içinde +4 °C'ye kaldırıldı ve 2 saat bekletildi. +4 °C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pellet 40 mL tritalasyon tamponunda çözüldü. Pellet çözülünce 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant atıldı. Pellet üzerine herhangi bir şey eklenmeden 1 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pellet %15 gliserol içeren 4 mL tritalasyon tamponunda çözüldü. Kompetan hücreler, 10 mL steril %40'lık gliserol eklenerek ependorflara 50 µL paylaşılırak -80 °C'ye kaldırıldı.

2.11.4 Çoğaltma Suşuna Aktarım

-80 °C'de muhafaza edilen kompetan hücreleri ile hazırladığımız ligasyon ürününü aynı tüpe aldık. Kompetan hücre olarak *Escherichia coli* DH10B hücreleri kullanıldı. İşlem buz üzerinde gerçekleştirildi. Buzda 30 dk. bekletildi. Ardından 42 °C'de 90 sn ısı şokuna maruz bırakıldı. Hemen tekrar buza alınarak 5 dakika bekletildi. Tüpün içerisine 450 µL LB broth eklenerek 37 °C'de 1.5 saat çalkalandı. Bu işlemin ardından önceden hazırlanmış olan petri kaplarındaki LB agara (ampisilinli) ekim yapıldı ve 1 gece 37 °C'de bekletildi.

2.11.5 Kolonilerin Tespiti ve Seçimi

LB agara ekim yapıldıktan sonra 1 gece bekletilen bakterilerin koloni oluşturup oluşturmadığı tespit edildi. Oluşan kolonilerden alınarak sulandırıldı ve genin aktarılıp aktarılmadığını tespit etmek için PCR yapıldı. Sulandırma işlemi için; seçilen koloniler ependorfa alındı ve üzerine 10 µL saf su ilave edildi. PCR için şu malzemeler ve miktarları kullanıldı; 1 µL sulandırılmış DNA, 1 µL forward primer, 1 µL reverse primer, 9.5 µL saf su, 12.5 µL mix pcr tüpüne eklendi. Bu işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. En son olarak mix malzemesinin konulmasına dikkat edildi. PCR cihazına konulmadan önce pipetaj yapılarak malzemelerin homojen olarak karışması sağlandı ve PCR gerçekleştirildi.

2.11.6 Plazmit DNA İzolasyonu

Koloniler taranarak PCR gerçekleştirildi. PCR sonucunda en parlak banda sahip olan pcr tüpündeki koloni örneği falkona alındı ve üzerine 10 mL LB Broth ve 10 µL ampisilin eklendi. Falkon ağzı hafif bir şekilde çalkalamalı inkübatöre konuldu ve 1 gece 37 °C’de bekletildi. Plazmit izolasyonu için GeneJet Plazmit Miniprep Kit kullanıldı ve içerisinde yazan prosedüre göre şu şekilde gerçekleştirildi; büyütülmüş plazmitler 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. 5 ependorfa 850 µL supernatan eklendi. Üzerinde 150 µL %90 gliserol eklendi.-80’de saklandı. Kite bulunan Resuspension solution RNase A ile muamele edilmeden kullanılmadı. Kite bulunan Wash tampon etanol ile muamele edilmeden kullanılmadı. 1 mL Resuspension solution içerisine 10 µL RNase A ilave edilerek hazırlandı. Pellet üzerine 250 µL Resuspension solution eklendi ve pipetaj yapıldı. 250 µL lizis solüsyon eklendi ve yavaşça pipetaj yapıldı. Bu karışım ependorfa alındı. Üzerine 350 µL Neutralization solüsyon eklendi ve 5 kez alt üst edildi. 5 dakika 14000 rpm’de santrifüj yapıldı. Supernatant kolon tüpüne aktarıldı ve pellet atıldı. 1 dakika 14000 rpm’de santrifüj edildi ve alttaki sıvı atıldı. 500 µL Wash solüsyon kolonun üzerine

eklendi. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Alttaki sıvı atıldı. Kolona 500 µL Wash solusyon eklendi. 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı atıldı. Kolonun üzerine bir şey eklenmeden 1 dakika 14000 rpm'de santrifüj edildi. Alt kısımdaki tüp atıldı. Kolonun altında yeni bir ependorf koyuldu. 50 µL elüsyon tampon eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. 20 µL elüsyon tampon kolona eklendi, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 2 dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı ve işlem tamamlandı.

2.11.7 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu ve IPTG ile İndüklenmesi

İzole edilen plazmitten 3 µL alınarak *E.coli* BL21 hücrelerine transforme edildi. Aktarılan plazmit LB agara ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Üreme sonucu LB agardan seçilen tek bir koloni LB broth'a ekildi. LB broth'a ekerken; 10 mL LB broth, 10 µL ampisilin ve koloni ependorfa alındı ve 1 gece 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bekletildi. 1 gece sonunda üreme gerçekleştiğinde, 90 mL LB broth, 10 mL inkübatörden alınan kültür ve 12.5 µL ampisilin ependorfa alındı. Yaklaşık 2 saat 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde bırakıldı. 2 saat sonra örnekten 200 µL alınarak spektrofotometre de ölçüm yapıldı. OD değeri 0.6 olana kadar çalkalamalı inkübatörde bekletildi. OD değeri 0.6 olduğunda artık gen, protein sentezi yapabilecek kapasiteye ulaştığı için IPTG ile indüklendi. 1 mL IPTG erlene ekildi ve 1 gece 37 °C'de çalkalamalı inkübatör de bırakılarak indüklenmesi gerçekleştirildi.

2.11.8 Hücreleri Çöktürme

1 gece 37 °C'de çalkamalı inkübatörde IPTG ile indüklenme işleminden sonra hücreler 50 mL'lik falkonlara paylaştırıldı. 20 dakika 4000 rpm'de santrifüj yapıldı. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Supernatant atıldı. Lizis işlemi için kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

2.11.9 Lizis İşlemi

-20 °C’de saklanan örnek alındı ve üzerine 2 mL lizis tampon eklendi. Pellet ve lizis tampon iyice çözüldü. 100 µL PMSF eklendi ve pipetaj yapıldı. 125 µL lizozim eklendi ve pipetaj yapıldı. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Mukusa benzer bir yapı görüldüğünde lizis işlemi gerçekleştiği görüldü. 10 dakika buzda bekletildi. İki ependorfa örnekler paylaştırıldı. 5 dakika 14000 rpm’de santrifüj yapıldı. Pellet atıldı ve üstte kalan sıvı başka bir ependorfa alındı. Hemen kullanılacaksa +4 °C’ye, daha sonra kullanılacaksa -20 °C’ye örnekler kaldırıldı.

2.11.10 SDS-PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi

SDS-PAGE jeli için çeşitli solüsyonlar hazırlandı.

SDS-PAGE jeli; ayırma jeli (alt jel) ve yığma (üst jel) jeli olarak iki tabakadan oluşmaktadır.

SDS-PAGE %15’lik ayırma jeli için; 2.5 mL Lower tampon, 3.75 mL bisakrilamid, 3.75 mL saf su, 100 µL %10’luk APS, 10 µL Temed kullanıldı.

SDS-PAGE %5’lik yığma jeli için; 2.5 ml Upper tampon, 1.25 ml bisakrilamid, 6.14 ml saf su, 100 µL %10’luk APS, 10 µL Temed kullanıldı.

SDS-PAGE tamponu hazırlamak için %10’luk SDS kullanıldı.

Jel hazırlanırken belirtilen malzemeler karıştırıldı. İlk olarak ayırma jeli hazırlandı ve jel kasetine o döküldü. Malzemeler karıştırılırken en son APS konuldu. Kasete dökülen jelin üzerinin düz olabilmesi için ayırma jelinin üzerine izopropanol ilave edildi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jelin üzerindeki izopropanol döküldü. Ayırma jeli tamamlandıktan sonra yığma jeli hazırlandı. Yığma jeli hazırlanırken son olarak APS karışıma ilave edildi. Yığma jeli için hazırlanan karışım, ayırma jelinin üzerine döküldü. Örneklerin yüklenebileceği

kuyucuklar oluşturmak için yığıma jelini döktükten sonra tarak yerleştirildi ve polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra tarak çıkarıldı.

2.11.11 Western Blot

Western için kullanılacak örnekler kuyucuklara yüklenmeden önce boyama işleminden geçirildi. Boyama işleminde; Western Blot için kullanılacak kitin içerisinde bulunan boya kullanıldı. Boya üzerinde yazan miktara göre örnek ve boya şu miktarlarda karıştırıldı; örnekten 30 µL, boyadan 10 µL alınarak örnek boyama işlemi gerçekleştirildi. Örnekler boyandıktan sonra 10 dakika 100 °C’de bekletildi. Western Blot tankına yürütme tamponu konuldu. Kasetlere örneklerin yükleneceği kuyucukların bulunduğu jel yerleştirildi. Boya ile muamele edilmiş örnekler jele yüklendi. Örnekten 40 µL, markırdan 3 µL yüklendi. Jelin yürütülmesi için ise; yığıma jeli 90 volt 20 dakika, ayırma jeli 120 volt 1.5 saat koşulları ayarlandı. Yürütülen jel kasetlerde bulunan camların arasından dikkatlice çıkarıldı. Bir kaba alındı ve commensie blue boyası ile boyandı. 45 dakika +4 °C çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Boya önce su, ardından SDS renk açma solüsyonu ile yıkandı. SDS 8renk açma solüsyonunda 1 gece çalkalamalı inkübatörde bekletildi. BioRad (Amerika) Trans-Blot Turbo Blotting System cihazı kullanıldığı protokle göre, transfer işlemi şu şekilde gerçekleştirildi. Sırasıyla; kurutma kağıdı, jel, membran, kurutma kağıdı yerleştirildi. Program 1.3A, 25V, 7 dakika ayarlandı. Cihazdaki işlem bittikten sonra membran alındı ve 1X TBS ile 10’ar dakika ara ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra Blocking tampon içerisinde 1 saat çalkalamalı inkübatörde bekletildi. 1 saat sonunda tekrar 10’ar dakika arayla 3 kez 1X TBS ile yıkandı. Yıkama bittikten sonra antibody eklenerek 1 saat çalkalamalı inkübatörde bekletildi. Ardından tekrar 10’ar dakika ara ile 3 kez yıkandı. Thermo Scientific (Amerika) Pierce ECL Western Blotting Substrat kullanılarak bir sonraki aşamada kullanılacak solüsyon hazırlandı. Solüsyon prosedüre göre şu şekilde hazırlandı; 3mL Luminol Enhancer Solution, 3mL Peroxide Solution kullanılarak solüsyon hazırlandı. Membran bu solüsyon içerisinde 1 dakika

bekletildi. Memran solüsyonunun bulunduğu yerden alınarak görüntüleme cihazına ait olan tabakaya yerleştirildi. Bu işlemin ardından görüntüleme gerçekleştirildi.

2.12 Kullanılan Solusyon ve Bazı Kimyasalların Hazırlanışı

2.12.1 LB Broth Hazırlanışı

LB Broth hazırlanırken; 10 gr Triptone, 5 gr Yeast Extract ve 5gr Sodyum Klorid karıştırılıp üzeri 1 lt'ye tamamlanacak şekilde saf suda çözüldü. Otoklavlanarak kullanıldı.

2.12.2 LB Agar Hazırlanışı

LB agar hazırlanırken; 5 gr Triptone, 2.5 g yeast extract, 2.5 gr Sodyum Klorid, 200 mL saf suda çözüldü. 3.75 gr agar eklendi ve 500 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı. Soğuduğunda uygun antibiyotik ilave edilip petrilere dökülerek hazırlandı. Kullanılana kadar alimunyum folyoya sarılı bir şekilde +4 °C'de muhafaza edildi. İşlemler kontaminasyon olmaması için alev başında gerçekleştirildi.

2.12.3 Üst Tampon

SDS-PAGE jeli için hazırlanan yığılma jelinin hazırlanması için; 6.60 gr Tris, 0.4 gr SDS kullanıldı ve ph 6.8 olması sağlandı. Karışım 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

2.12.4 Alt Tampon

SDS-PAGE jelinde kullanılacak ayırma jelinin hazırlanması için; 19.8gr Tris, 0.4 gr SDS kullanıldı ve ph 8.8 olacak şekilde ayarlandı. Karışım 100 mL olacak şekilde üzeri saf su ile tamamlandı.

2.12.5 SDS Tamponu

%10'luk SDS tamponu hazırlanırken; 10 gr SDS 100 mL saf su kullanıldı. Saf su içerisinde SDS çözdürülerek kullanıldı.

2.12.6 1.2'lik Agaroz Jel Hazırlama

1.2 gr agaroz tartıldı. Behere konuldu ve üzeri 150 mL TAE ile tamamlandı. Karışım mikrodalga fırında 2 dakika kaynatıldı. Çeker ocakta soğuması beklendi. 1.5 µL etidyum bromür eklendi ve yürütme tankına karışım döküldü, kuyucuklar için taraklar yerleştirildi ve jelin donması beklendi.

2.12.7 TBE (0.5 X) Hazırlama

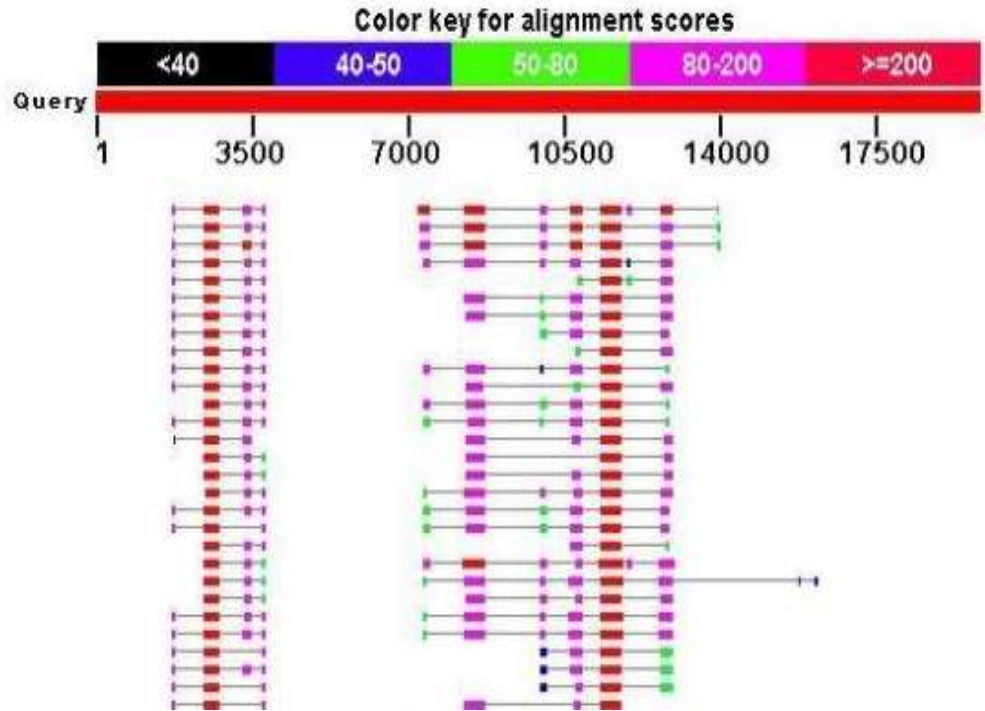
1 lt için; 54 gr Tris-base, 27.5 gr Borik asit, 20 mL 0.5 M EDTA kullanılarak TBE (5 X) hazırlandı. 100 mL TBE (5 X) ve 900 mL distile su karıştırılarak TBE (0.5 X) hazırlandı.

3. BULGULAR

3.1 Biyonformatik Analiz

3.2 Blast Analizleri

Daha önceden elde edilmiş genomik DNA kütüphanesinden seçilen ve daha önce karakterize edilmemiş “gK332878” adlı gDNA dizisi NCBI veri tabanındaki nBLAST programı kullanılarak çeşitli analizler yapıldı. Analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de gösterilmektedir. Kütüphaneden alınan gDNA dizisinin hangi canlıya benzediği ve hangi aileye ait olduğu tespit edilmiş aynı zamanda tahmini cDNA dizisi tespit edilmiştir.

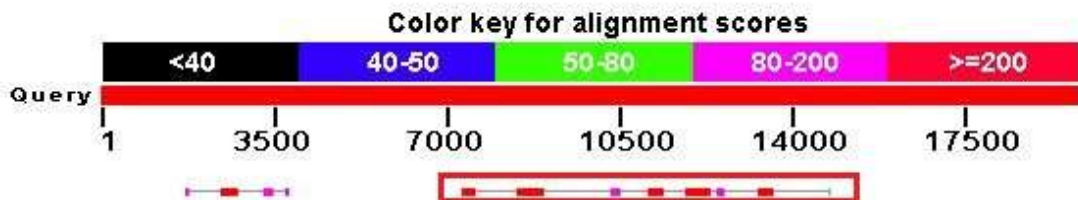


Şekil 3.1: gDNA dizisinin nBLAST analizi sonucu.

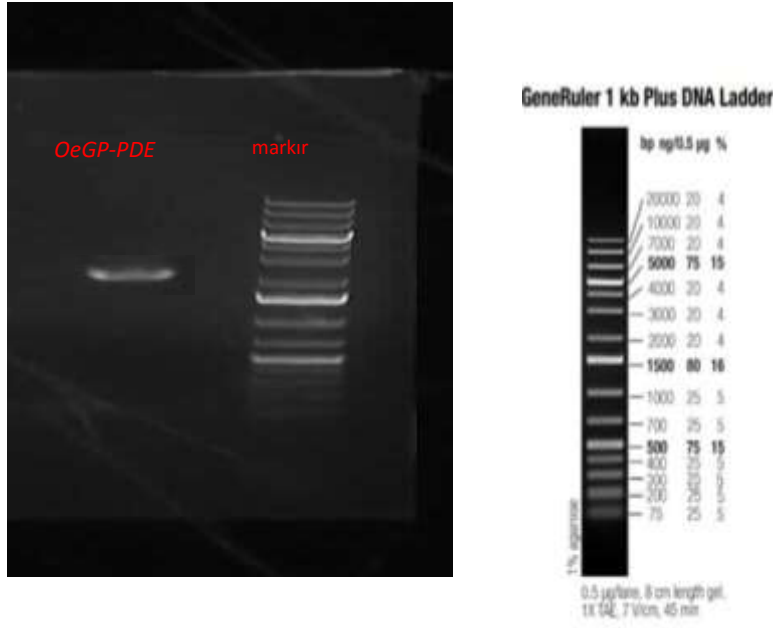
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL3-like (LOC105173644). mRNA	446	1727	10%	6e-120	80%	XM_011099513.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL3-like (LOC105174928). transcript variant X2. mRNA	446	1412	10%	6e-120	80%	XM_011097188.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL3-like (LOC105174928). transcript variant X1. mRNA	446	1412	10%	6e-120	80%	XM_011097187.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum 40S ribosomal protein S8 (LOC105155233). mRNA	405	789	3%	2e-107	87%	XM_011071104.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana glauca probable glycerophosphoni diester phosphodiesterase 2 (LOC104095849). mRNA	385	1067	9%	2e-101	77%	XM_009580962.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Nicotiana glauca probable glycerophosphoni diester phosphodiesterase 2 (LOC104244436). mRNA	379	652	5%	7e-100	77%	XM_009790950.1
<input type="checkbox"/> Picramnia kurooa putative 40S ribosomal protein S8-like protein mRNA, complete cds	379	715	3%	7e-100	85%	FJ022430.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Prunus mume probable glycerophosphoni diester phosphodiesterase 2 (LOC103326598). mRNA	365	825	8%	2e-95	76%	XM_00228838.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Sesamum indicum 40S ribosomal protein S8 (LOC105174932). mRNA	361	795	3%	2e-94	84%	XM_011097192.1
<input type="checkbox"/> Prunus persica hypothetical protein IPRUPE_gpa001847m01 mRNA, complete cds	360	771	8%	7e-94	76%	XM_007214593.1
<input type="checkbox"/> Theobroma cacao 40S ribosomal protein S8 isoform 1 (TCM_030748) mRNA, complete cds	347	677	3%	4e-90	83%	XM_007020583.1
<input type="checkbox"/> Theobroma cacao 40S ribosomal protein S8 isoform 1 (TCM_030748) mRNA, complete cds	347	677	3%	4e-90	83%	XM_007020582.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Malus x domestica probable glycerophosphoni diester phosphodiesterase 2 (LOC103420020). mRNA	345	616	5%	2e-89	75%	XM_008366114.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Nelumbo nutera glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL4-like (LOC104594424). mRNA	343	521	4%	5e-89	76%	XM_010254708.1

Şekil 3.2: gDNA dizisine benzeyen nükleotit kayıtları.

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin intron ve ekzonlarının (Şekil 3.3) belirlenebilmesi için PCR kuruldu. Kurulan PCR sonuçları (Şekil 3.4) dizileme yapılması için LİGAND, İzmir firmasına gönderildi. PCR kurulurken cDNA ve gDNA kullanıldığında, ikisinde jel görüntüleri arasındaki büyüklük farklılıklarının olması intron varlığını doğrulamıştır.



Şekil 3.3: Blast analizi sonucu intron ve ekzon yerleşimi.



Şekil 3.4: Tasarlanan primerlerle kurulan PCR sonucu, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

Tablo 3.1: Şekil 3.4’deki PCR görüntüsünün koşulları.

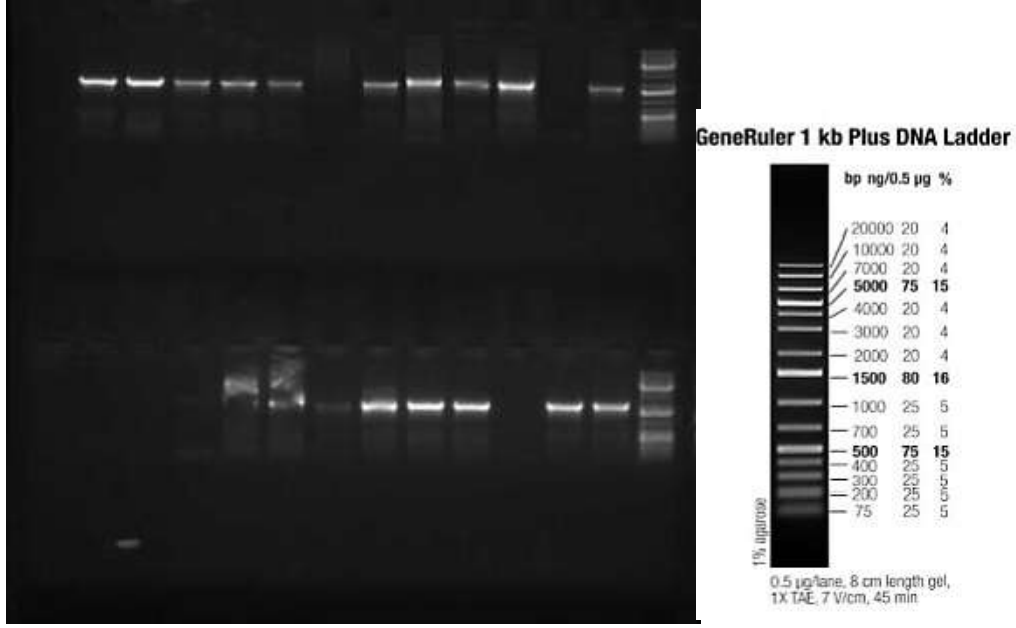
Basamak	Sıcaklık	Zaman
Ön ısıtma	94°C	5 dk
Denatürasyon	94°C	1 dk
Bağlanma	58°C	1 dk
Sentez	72°C	10 dk
Uzama	72°C	10 dk

3.3 Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Geninin Farklı Zeytin Çeşitleri Arasındaki Polimorfizmi

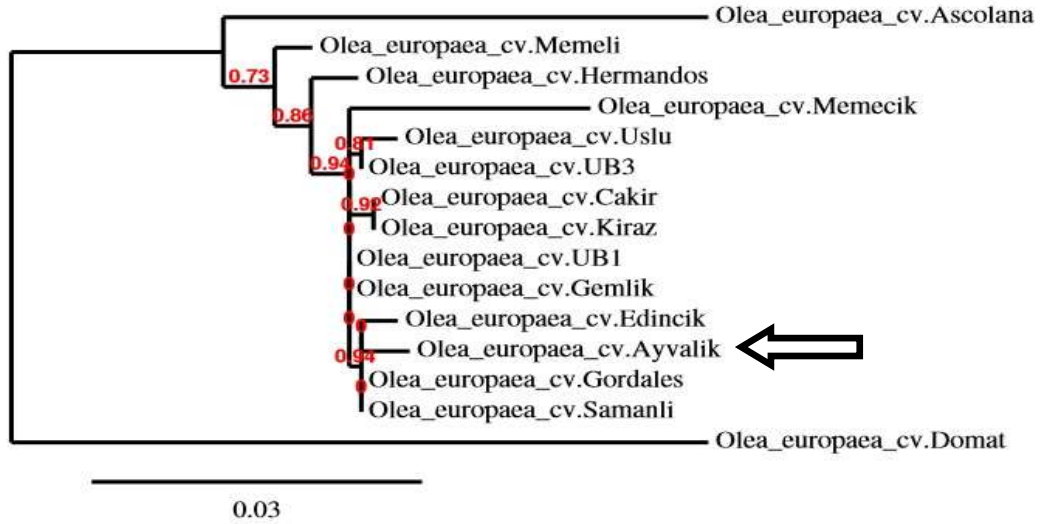
Gliserofosfodister fosfodiesteraz geninin farklı zeytin çeşitlerinden elde edilen DNA'lar kullanılarak PCR kuruldu. PCR sonuçları LİGAND, İzmir firmasına gönderilerek dizilendi. Firmadan gelen dizileme sonuçları değerlendirilerek Phlogeny.fr programı [103] yardımıyla filogenetik ağaç oluşturuldu. Polimorfizm için kullanılan zeytin çeşitleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2: Polimorfizm çalışmasında kullanılan zeytin çeşitleri.

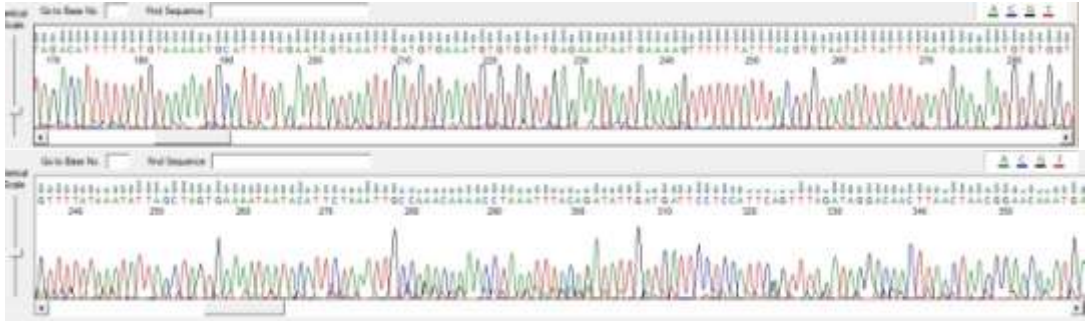
ASCOLANA
GEMLİK
UB1
ÇAKIR
MEMECİK
EDİNCİK
SAMANLI
GORDALES
AYVALIK
KİRAZ
UB3
USLU
HERMANDOS
MEMELİ
AYVALIK



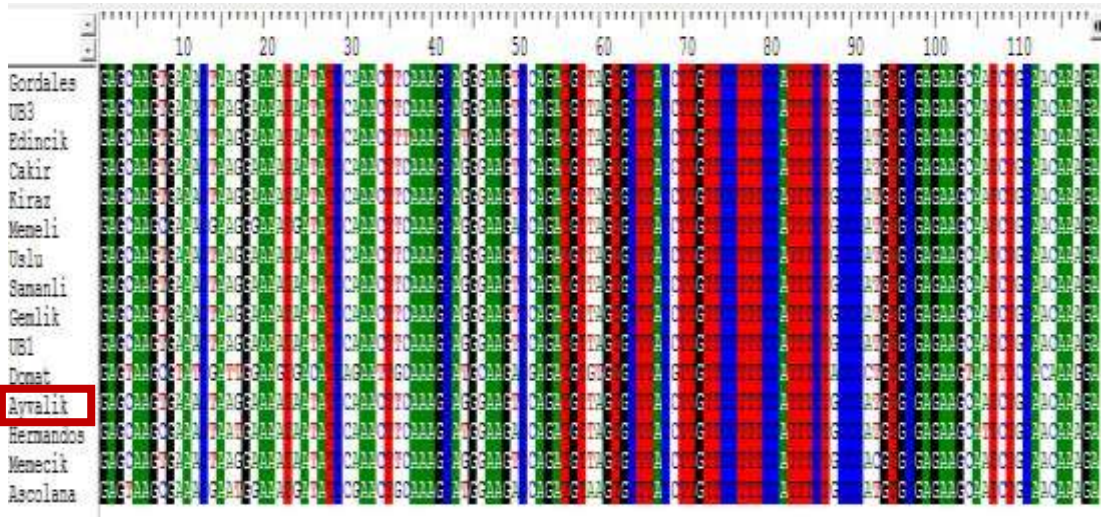
Şekil 3.5: Farklı zeytin çeşitlerinden elde edilen DNA örnekleriyle kurulan PCR sonucu görüntüsü, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Litvanya).



Şekil 3.6: GP-PDE dizileriyle Phlogeny.fr programı kullanılarak oluşturulan filogenetik ağaç.



Şekil 3.7: Polimorfizm örneklerinin kromatogramları.



Şekil 3.8: Polimorfizm sonuçları.

3.1 NCBI ve GenScan Veritabanlarında Elde Edilen Tahmini cDNA Dizileri

Elimizde bulunan gDNA dizisini GenScan ve NCBI veri tabanlarında yapılan analizlerde tahmini cDNA dizisi (Şekil 3.9 ve Şekil 3.10) elde edildi. NCBI ve GenScan veritabanlarında yapılan analizlerde elde edilen tahmini cDNA dizileri karşılaştırıldı ve GenScan veri tabanından elde edilen cDNA dizisi gözönüne alınarak çalışmalara devam edildi.

TTACTTTTATACTTAACTGCTGTTGCAGGGAAGTCTGTAATGACACCATT
AATTTCCATAACAGAAACATGTGTTGATCTCCACGTAAGGGTCGGAGAA
GAAATCCCAGGGTTGAGACACGAACTCATTTCTGAATAATTCACATAAA
CATGGAGTCCAAAGGCCTGAAGCTTTGGGACCACATCCGTTTGCGAAGT
AAGAAATGCCTTATCCACAGGAAATACAGATCTTTTTGTGATGACTACA
GAACTGGCGAATTTTTTGTGATCTCCGAAATTGTTGAGTTTGTGATGTCACG
GATATCCTCATTGACCAAGTAAACAACTCATAATTGCTTCTACTCTTGA
ACTTTCTCAAACAGCACTATCACTAGATTTTACCATAATTTTTTTAGCT
GTCTGATTATTGTAACCAGTTTTGCTCAAAGCATCCAAAAGTGCATCAGT
TACACCTAGTCCCTGTTTTTCGGCTAGGTAACCAGCATGCTGTACTCTAT
GCTGATTAAGACACCAGAGACAGAAGATGCATTTCTTGCAAAAAGCCAAA
AAATCAGACAACCACGTGAGATTATAGGTGTATATTCCACCGTCAATGC
TAAGATCTGGATTACTTGTGGCCAGGTTGCTGAAGTCTGTTTCATCAACA
TTAGTTCTCTCTGAGATTGATAGATCCCAAGCAAAAAGCTATCCCATC
GTTTGTCAATTTGAACAGGACAATCAAGAACATCTACGCCATCTGATATA
GCTTTACTATATGCCTTGTGAGTACAGCCAGGATAGTCGCCGCTTGCTCC
TTCCAAGGAGATAACCGAAAGGTTTCTATGGCTTCAGATGGAGTTATTG
GGAAGTCGGAGAGTACACCATCAACAGAAAAGTCTCTGTTGTCAATGTA
ACTGAGATACTCAGCAACAGGGTCATAACTGTAGTTATAGGGTAAATGT
GCATCATCATTTAAAAAATCTGATGCAAACACTTCTAGACCAGCTTTATG
AGCATCAGAAACAACAGAAGTATGAGGCTGTAAATATAGACTGTTGTCT
ACAGGCCAGATGTAATATTTAGGAACAAGAATTCCTGAGGCCAAATGTTT
TGATAAATGTTAGATTCTCAAAGTGAGTCATATGTTTGGTTGGTTAAA
GGCTCCACCTCATCAGGTGCCAGAACTGAAATATGAGTTTTGTTCGACT
TGTTCTGAATCGTGCAATGATACTTCTCAAGAAGTTCACCTCTGGTGATG
AAATATAATTAACGATAACGCGTCTAGACAGAGAAATAATGAAGGTTCT
CATACTCAGATTATGTTGGCTGAAGAAGGCATCATGCTGAGGTCGTTGA
AGGTAAAATCAACAGAAAACCATCCTCGCATAGGAACCCCGTTCACAGG
GTAGGCGTTGCTCCCGTTCTTGAAAATATCATCGATGTTAGAGCCATTTT
CAAGCCTAAGATCTGGAAAGCAGATTCCAGATCCATCTTTCGTAAGTTG
AACGTCACACCATACAACTACATTGGGTAAGCCAATACTAACTGCTAGT
TGATAAGCATATTGACCAGAATCAGGAAACATGCCCGAAAATCCACCTC
TAGCTATGACTAAAGGTGGGTCTCC

Şekil 3.9: NCBI BLAST analizi sonucu elde edilen tahmini cDNA dizisi.

CCGTCCATTCTCACCAATTTACATCTATCTACAAACATCCAAAATTAGATTCCGGGTCGGACTCACGTATAATGGGGCCGGAGACCCACCTTTAGTCATAGCTAGAGGTGGATTTTCGGGCATGTTTCCTGATTCTGGTCAATATGCTTATCAACTAGCAGTTAGTATTGGCTTACCCAATGTAGTTGTATGGTGTGACGTTCAACTTACGAAAGATGGATCTGGAATCTGCTTTCAGATCTTAGGCTTGAAAATGGCTCTAACATCGATGATATTTTCAAGAACGGGAGCAACGCCTACCCTGTGAACGGGGTTCCTATGCGAGGATGGTTTTCTGTTGATTTTACCTTCAACGACCTTGAACCTGTCAATTTGAAACAGAGAATCTATTCTCGGGCCCCTAATTTTGATGGCACTCCACAGCAGATTCTTGGTGTGGAAGATGTTGTTGGCTTAGTAAAACCGCCGAGTTGTGGTTGAATGTTTCAGCATGATGCCTTCTTCAGCCAACATAATCTGAGTATGAGAACCTTCATTATTTCTCTGTCTAGACGCGTTATCGTTAATTATATTTTCATCACAGAGGTGAACTTCTTGAGAAGTATCATTGCACGATTCAGAACAAGTCGAACAAACCTCATATTTTCAGTTTCTGGCACCTGATGAGGTGGAGCCTTTAACCAACCAAACATATGACTCACTTTTGAGGAATCTAACATTTATCAAACATTTGCCTCAGGAATCTTGTTCTAAATATTACATCTGGCCTGTAGACAACAGTCTATATTACAGCCTCATACTTCTGTTGTTTCTGATGCTCATAAAGCTGGTCTAGAAGTGTTGCATCAGATTTTTTAAATGATGATGCACATTTACCCTATAACTACAGTTATGACCCTGTTGCTGAGTATCTCAGTTACATTGACAACAGAGACTTTTCTGTTGATGGTGTACTCTCCGACTTCCAATAACTCCATCTGAAGCCATAGATTGCTTCGCGACATGGGCAGAAATGGAAAGGAACAAGTAAACCTTTCGGTTATCTCCTTGGAAGGAGCAAGCGGCGACTATCCTGGCTGTACTGACAAGGCATATAGTAAAGCTATATCAGATGGCGTAGATGTTCTTGATTGTCCTGTTCAAATGACAAACGATGGGATAGCTTTTTGCTTGGGATCTATCAATCTCAGAGAGAGAACTAATGTTGATGAAACAGACTTCAGCAACCTGGCCACAAGTAATCCAGATCTTAGCATTGACGGTGGAAATATACACCTATAATCTCACGTGGAGCCAAATTCATAGCACCTTGAGGCCTGCTATATACAATCCATACGCAAACCTTTTCGTTATATCGAAATCCAAAGCCAGAAATGATGGGAACCTTATGCAGTTGTCTGATTTTTTGGCTTTTGCAAGAAATGCATCTTCTGTCTCTGGTGTCTTAATCAGCATAGAGCATGCTGGTTACCTAGCCGAAAAACAGGGACTAGGTGTAACCTGATGCAGTTTTGGATGCTTTGAGCAAACTGGTTACAATAATCAGACAGCTAAAAAATTATGGTAAAATCTAGTGATAGTGCTGTTTTGAGAAAGTTCAAGAGTAGAAGCAATTATGAGTTTGTTACTTGGTCAATGAGGATATCCGTGACATCACAACTCAACAATTTTCGGAGATCAAATAATTCGCCAGTTCTGTAGTCATCACAAAAAGATCTGTATTTCTGTGGATAAGGCATTTCTTACTTCGCAAACGGATGTGGTCCCAAAGCTTCAGGCCTTTGGACTCCATGTTTATGTGCAATTATTCAGAAATGAGTTTCGTGTCTCAACCCTGGGATTTCTTCTCCGACCCTTACGTGGAGATCAACACACATGTTTCTGTATGGAATTAATGGTGTGATTACAGACTTCCCTGCAACAGCAGTTAAGTATAAAGGAACCGATGTTTAGGGTATAAAGAAGTACCGCTATACATGAGCCCTGTGCTACCCGGCAGCCTTATTTCACTTATGGCACCTCAATTTTTGCCACCGGCCGAGGCTCAAACCCGATCCTTTCGGAGAACGATGTGGTTGAACCACCTCTCCCTGCCGTGTGGAAAAGCCCCCAACCACGGATACTGGCAACAGCTCTACAGCACCAGGTCCCGCACCACGAAATGGACAGCCTACAATTGTTGCAAGCATGATCCTAAGTTGCATTGCTGTCCTTGCAGACCCTATTGCTTTGCTGA

Şekil 3.10: GenScan analizi sonucu elde edilen tahmini cDNA dizisi.

```
PSILTNFTSIYKHPKLDNRVGLTYNGAGDPPLVIARGGFSGMFPDSGQYAYQLAV
SIGLPNVVVWCDVQLTKDGGSGICFPDLRLENGSNIDDIFKNGSNAYPVNGVPMRG
WFSVDFTFNDLEPVNLKQRIYSRAPNFDGTPQQILGVEDVVGLVKPPSLWLVNQ
HDAFFSQHNLSMRTFIISLSRRVIVNYISSPEVNFLRSIARFRTSRTKLIFQFLAPDE
VEPLTNQTYDSLRLNLTFIKTFASGILVPKYYIWPVDNSLYLQPHTSVVSDAHKA
GLEVFASDFLNDDAHLNYSYDPVAEYLSYIDNRDFSVDGVLSDFPITPSEAIDC
FSHMGRNGKEQVNLVSVISLEGASGDYPGCTDKAYSKAISDGDVLDLDCPVQMTN
DGIACFLGSLNLRERTNVDLDFSNLATSNDLSDIDGGIYTYNLTWSQIHSTLRPAI
YNPYANFSLYRNPKARNDGNFMQLSDFLAFARNASSVSGVLISIEHAGYLAEKQ
GLGVTDVAVLDALSKTGYNNTAKKIMVKSSDSAVLRKFKSRSNYEFVYLVNEDI
DITNSTISEIKKFASSVITKRSVFPVDKAFLTSQTDVVPKLQAFGLHVYVQLFRN
EFVSPWDFFSDPYVEINTHVSVMINGVITDFPATAVKRNRLCLGYKEVPLYMS
PVLPGSLISLMAQFLPPAEAPNPILSENDVVEPPLPAVVEKPPTTDTGNSSTAPGP
APRNGOPTIVASMLSCIAVLATLLLC
```

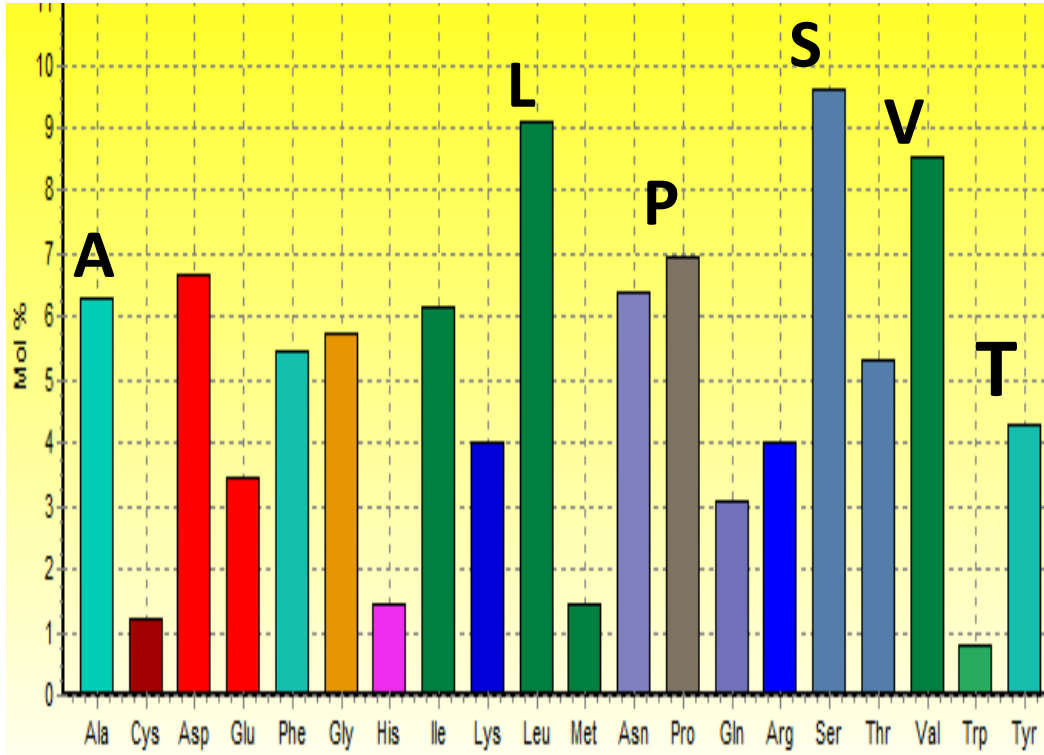
Şekil 3.11: GenScan analizi sonucu elde edilen tahmini aminoasit dizisi.

3.2 BioEdit programında yapılan analizler

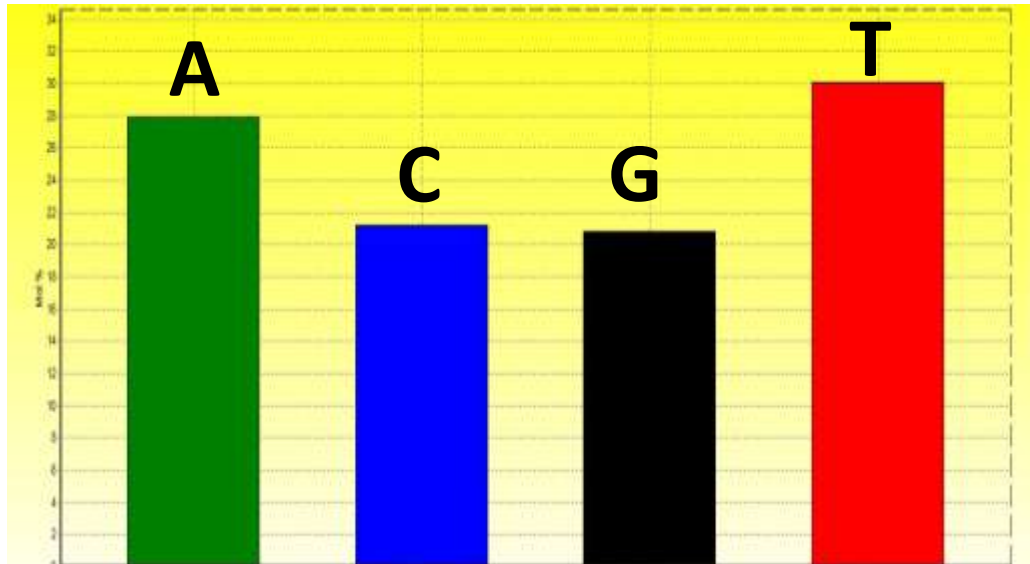
Zeytin tahmini gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin hangi azotlu organik bazı ne kadar içerdiği (Şekil 3.14), aminoasit dizisi ve sayısı (Şekil 3.12), hidrofobisitesi (Şekil 3.15), aminoasit kompozisyonu (Şekil 3.13) BioEdit programında [62] analiz edildi.

```
MFPDSGQYAYQLAVSIGLPNVVVWCDVQLTKDGGSGICFPDLRLENGSNIDDIFKNGS
NAYPVNGVPMRGWFSVDFTFNDLEPVNLKQRIYSRAPNFDGTPQQILGVEDVVGLV
KPPSLWLVNQHDAFFSQHNLSMRTFIISLSRRVIVNYISSPEVNFLRSIARFRTSRTKLI
FQFLAPDEVEPLTNQTYDSLRLNLTFIKTFASGILVPKYYIWPVDNSLYLQPHTSVVS
DAHKAGLEVFASDFLNDDAHLNYSYDPVAEYLSYIDNRDFSVDGVLSDFPITPSE
AIDCFSTMGRNGKEQVNLVSVISLEGASGDYPGCTDKAYSKAISDGDVLDLDCPVQMT
NDGIACFLGSLNLRERTNVDLDFSNLATSNDLSDIDGGIYTYNLTWSQIHSTLRPAIY
NPYANFSLYRNPKARNDGNFMQLSDFLAFARNASSVSGVLISIEHAGYLAEKQGLG
VTDVAVLDALSKTGYNNTAKKIMVKSSDSAVLRKFKSRSNYEFVYLVNEDIRDITNS
TISEIKKFASSVITKRSVFPVDKAFLTSQTDVVPKLQAFGLHVYVQLFRNEFVSPW
DFFSDPYVEINTHVSVMINGVITDFPATAVKYKRNRLCLGYKEVPLYMSVLPGLSIS
LMAQFLPPAEAPNPILSENDVVEPPLPAVVEKPPTTDTGNSSTAPGPAPRNGOPTIV
ASMLSCIAVLATLLLC
```

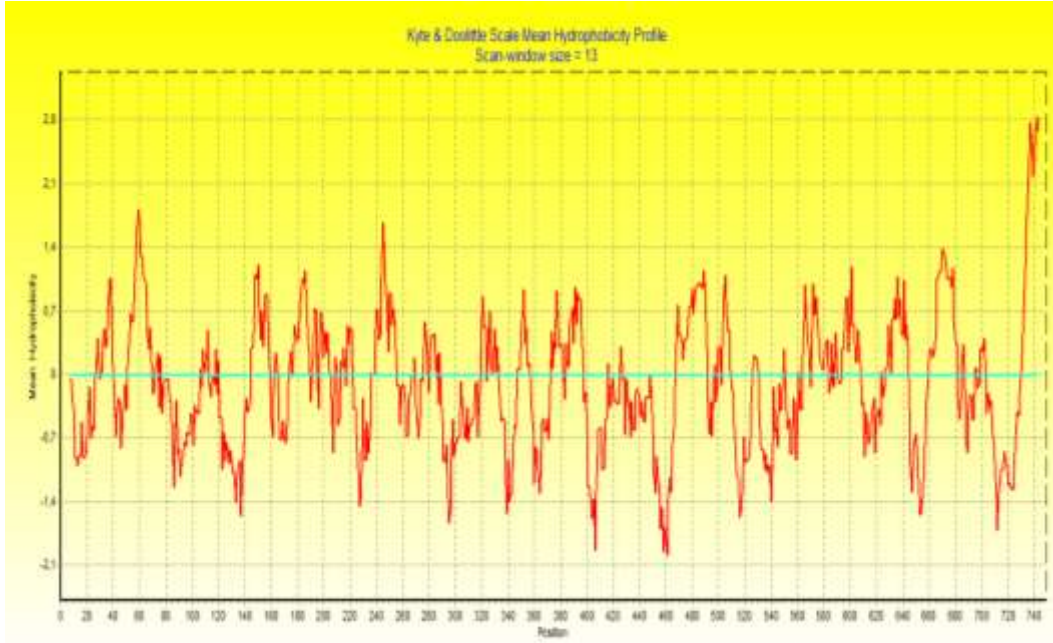
Şekil 3.12: BioEdit programında analiz edilen OeGP-PDE geninin aminoasit dizisi.



Şekil 3.13: OeGP-PDE geninin aminoasit kompozisyonu.



Şekil 3.14: OeGP-PDE geninin nükleotit kompozisyonu.



Şekil 3.15: *OeGP-PDE* geninin hidrofobisitesi.

3.3 ExPASy Programında Yapılan Analizler

Gliserofosfodiester fosfodiesteraz geninin moleküler ağırlığı (Şekil 3.21), protein özellikleri (Şekil 3.16), atom kompozisyonu (Şekil 3.22), sinyal peptid analizi (Şekil 3.18), transmembran domain analizi (Şekil 3.19), hücre içi lokalizasyonu (Şekil 3.17), ExPASy web sitesindeki programlar kullanılarak tespit edildi.

SOSUI Result

Query title : GP-PDE
Total length : 2250 A. A.
Average of hydrophobicity : 0.755205

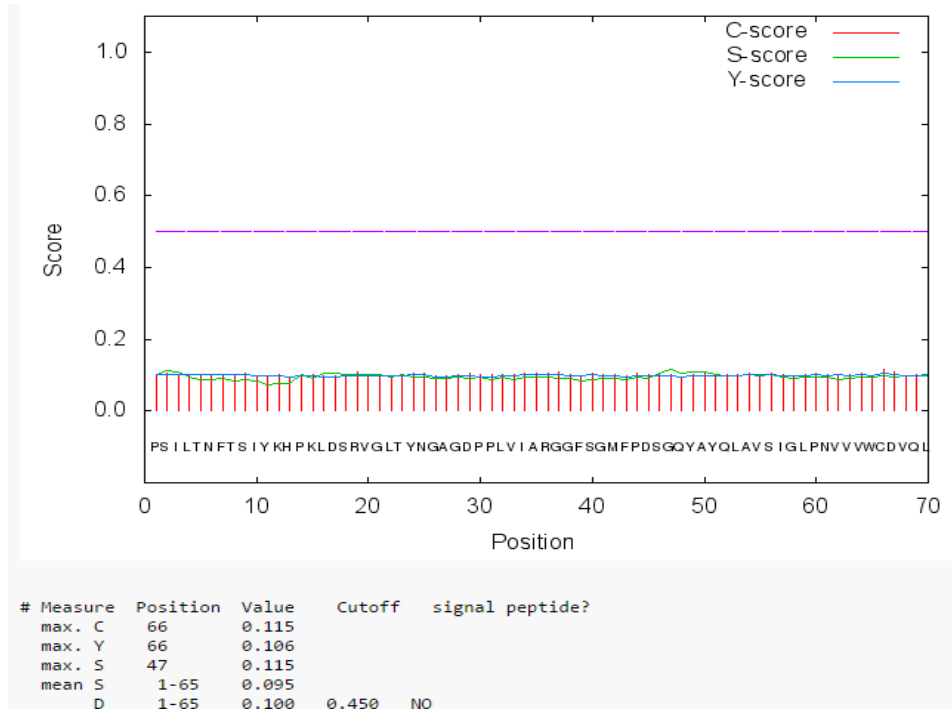
This amino acid sequence is of a **SOLUBLE PROTEIN.**

Şekil 3.16: *OeGP-PDE*'nin protein özelliği.

SOSUI_{GramN} Result

No.	seg.Length	subcellular Localization site	ID
0001	749a.a.	IM (inner membrane)	GP-PDE

Şekil 3.17: *OeGP-PDE*'nin hücre lokalizasyonu.

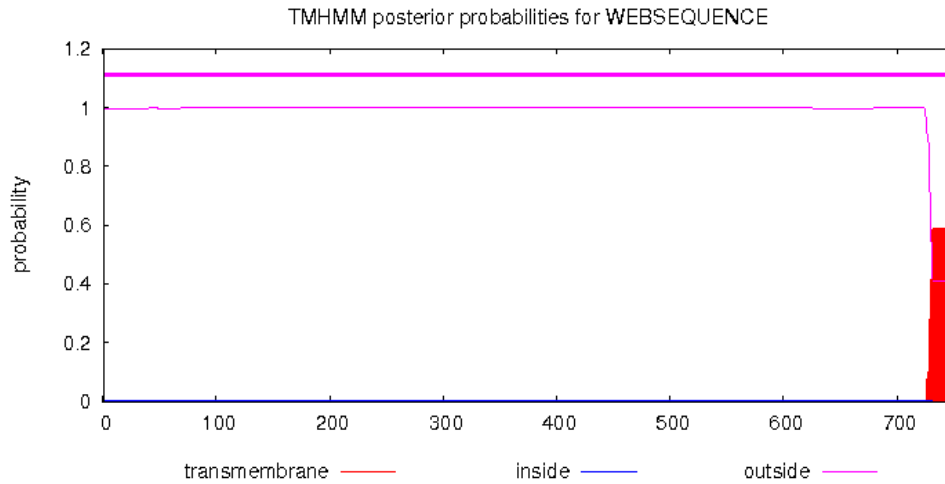


Şekil 3.18: *OeGP-PDE*'nin sinyal peptid analizi.

TMHMM result

[HELP](#) with output formats

```
# WEBSEQUENCE Length: 749
# WEBSEQUENCE Number of predicted TMHs: 0
# WEBSEQUENCE Exp number of AAs in TMHs: 11.64717
# WEBSEQUENCE Exp number, first 60 AAs: 0.03658
# WEBSEQUENCE Total prob of N-in: 0.00260
WEBSEQUENCE TMHMM2.0 outside 1 749
```



Şekil 3.19: OeGP-PDE 'nin transmembran domain analizi.

```
ID VIRT30457 Unreviewed; 708 AA.
AC VIRT30457;
DE Translation of nucleotide sequence generated on ExpASy
DE on 18-May-2016 by 46.2.80.161.
CC -!- This virtual protein sequence will automatically be deleted
CC from the server after a few days.
DR SWISS-2DPAGE; VIRT30457; VIRTUAL.
SQ SEQUENCE 708 AA; 92DD02711C8DDB72 CRC64.
MFPDSGQYAY QLAVSIGLPN VVVWCDVQLT KDGSGICFPD LRENGSNID DIFKNGSNAY
PVNGVPMRGW FSVDFTFNDL EPVNLKQRIY SRAPNFDGTP QQILGVEDVW GLVKPPSLWL
NVQHDAFFSQ HNLSMRTFII SLSRRVIVNY ISSPEVNFLR SIIARFRTSR TKLIFQFLAP
DEVEPLTNQT YDSLLRNLTf IKTFASGILV PKYYIWPVDN SLYLQPHTSV VSDAHKAGLE
VFASDFLNDD AHLPNYSYD PVAEYLSYID NRDFSVDGVL SDFPITPSEA IDCFSHMGRN
GKEQVNL SVI SLEGASGDYP GCTDKAYSKA ISDGDVLDLC PVQMTNDGIA FCLGSLNRE
RTNVDETDFS NLATSNPDLs IDGGIYTYNL TWSQIHSTLR PAIYNPYANF SLYRNPKARN
DGNFMQLSDF LAFARNASSV SGLVLSIEHA GYLAEQQLG VTDVAVLDALS KTGYNNTAK
KIMVKSSDSA VLRKFKSRN YEFVYLVNED IRDITNSTIS EIKKFASSVW ITRSVFPVD
KAFLTSQTDV VPKLQAFGLH VYVQLFRNEF VSQPWDFFS D PYVEINTHVS VMEINGVITD
FPATAVKYKR NRCLGYKEVP LYMSPVLPGS LISLMAPOFL PPAEAPNPIL SENDVVEPPL
PAVVEKPPPT DTGNSSTAPG PPRNGQPTI VASMILSCIA VLATLLLC
```

Şekil 3.20: OeGP-PDE geninin aminoasit dizisi.

Number of amino acids: 708

Molecular weight: 78439.9

Theoretical pI: 5.08

Şekil 3.21: OeGP-PDE geninin molekül ağırlığı.

Atomic composition:

Carbon	C	3539
Hydrogen	H	5457
Nitrogen	N	915
Oxygen	O	1061
Sulfur	S	20

Formula: C3539H5457N915O1061S20

Total number of atoms: 10992

Şekil 3.22: OeGP-PDE genine ait atomik kompozisyon.

3.4 Clc Genomic analizi

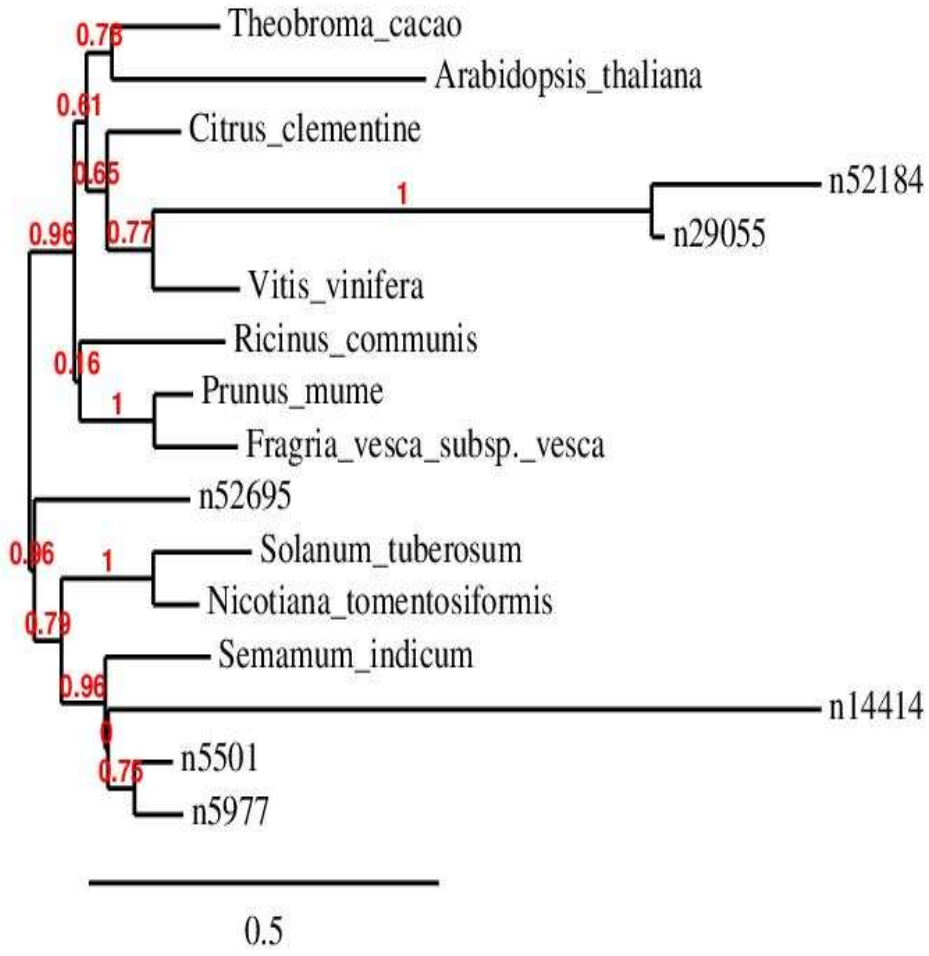
Clc Genomics programında daha önceden oluşturulmuş genomik DNA kütüphanesinde yer alan nükleotit dizileriyle bizim çalıştığımız genin kopya sayısı ve yakın akrabaları tespit edildi (Tablo 3.3). Elde edilen sonuçlar ve gliserofosfodiester fosfodiesteraz geni ile NCBI veri tabanında ikili Blast yapıldı ve karşılaştırıldı. Aynı zamanda, gliserofosfodiester fosfodiesteraz geni, yakın akrabaları, kopyası ve çalıştığımız genin benzeri on farklı canlıya ait nükleotit dizilerinden Phlogeny.fr programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu.

Tablo 3.3: Clc Genomics veri tabanından elde edilen kopya sayısı ve yakın akraba analizi.

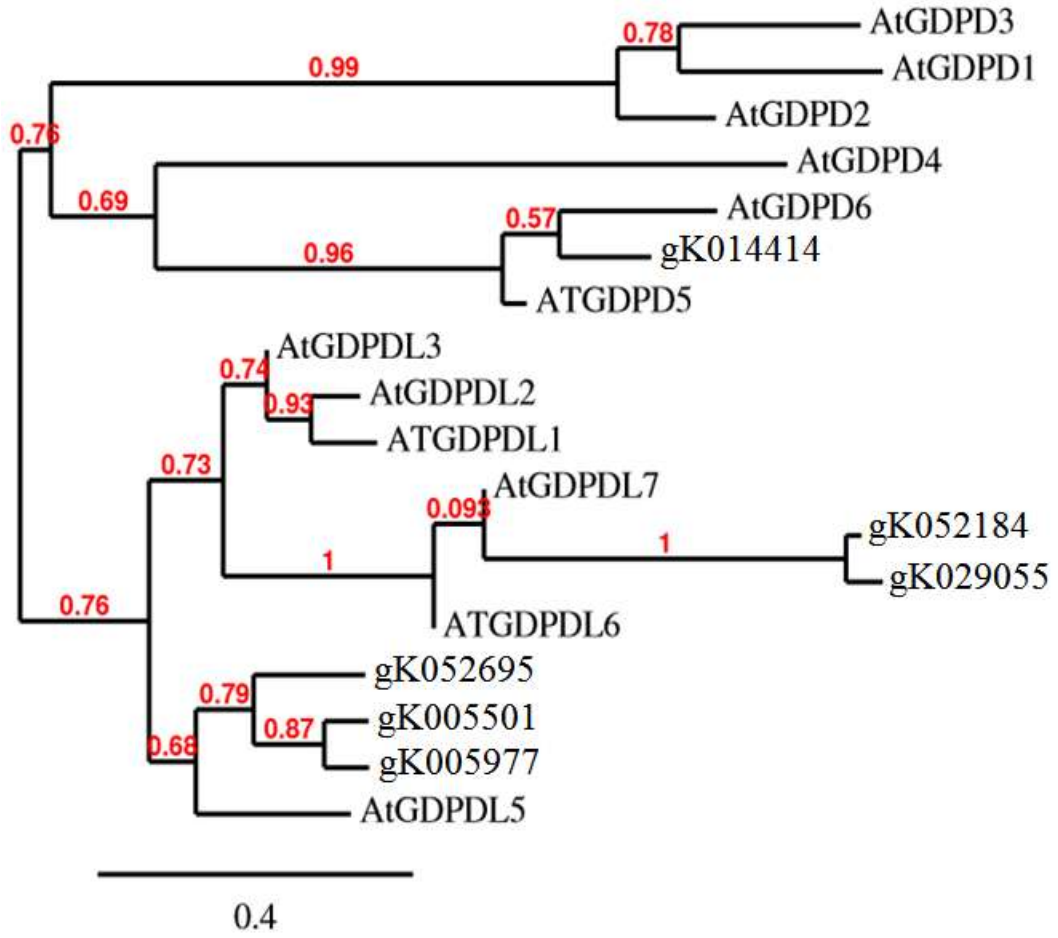
Hit	Description	E-value	Score	%Gaps
GK005977	locus=gK1216:260189:265407:- [translate_table: standard]	0,00	2.680,00	0,78
GK052695	locus=gK62:895450:901348:- [translate_table: standard]	0,00	2.353,00	1,12
GK052184	locus=gK609:153134:164777:- [translate_table: standard]	1,50E-147	1.185,00	14,65
GK029055	locus=gK2420:118:1744:- [translate_table: standard]	1,64E-123	979,00	3,86
GK014414	locus=gK157:632832:638925:- [translate_table: standard]	1,04E-18	221,00	9,15
GK014414	locus=gK157:632832:638925:- [translate_table: standard]	1,82E-16	203,00	10,46
GK005977	locus=gK1216:260189:265407:- [translate_table: standard]	2,48E-15	197,00	13,12
GK029055	locus=gK2420:118:1744:- [translate_table: standard]	2,48E-11	162,00	11,46

3.5 Phogeny.fr Programı Analizi

Phogeny.fr programı kullanılarak NCBI BLAST ve CLC genomics veri tabanlarından analiz edilen akraba ve benzer türlerin filogenetik ağacı Şekil 3.17’de, *Arabidopsis* ’ya ait GP-PDE geninin ve genin zeytinde bulunan benzer genlerinin oluşturduğu filogenetik ağaç Şekil 3.18’dedir.



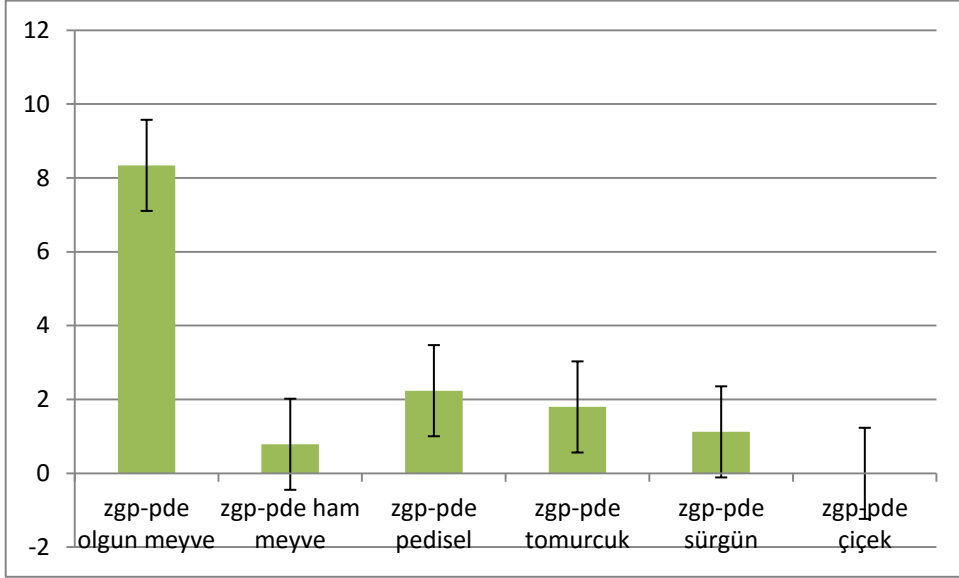
Şekil 3.23: Phlogeny.fr programında oluşturulan filogenetik ağaç.



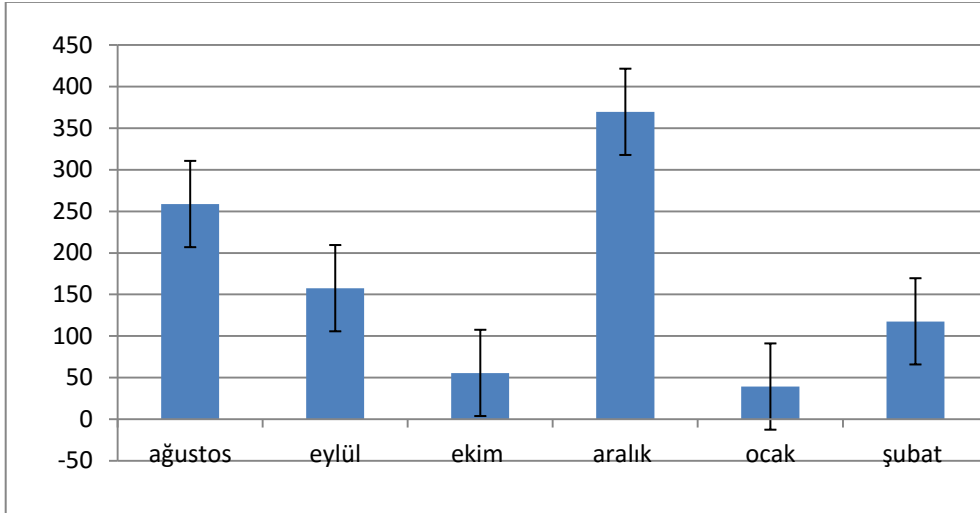
Şekil 3.24: GP-PDE geninin *Arabidopsis thaliana*'da bulunan homologları ve zeytinde bulunan benzerlerinden oluşan filogenetik ağaç.

3.6 Real-Time PCR Sonuçları

Genin hangi dokuda ne kadar sentezlendiğini tespit edebilmek için yapılan Real-Time PCR sonucunda (Şekil 3.25) olgun meyvede daha fazla sentezlendiği görüldü. Farklı aylarda toplanan yaprak örneklerinden yapılan Real-Time sonucunda (Şekil 3.26), Aralık ayında en fazla sentezlendiği görüldü.



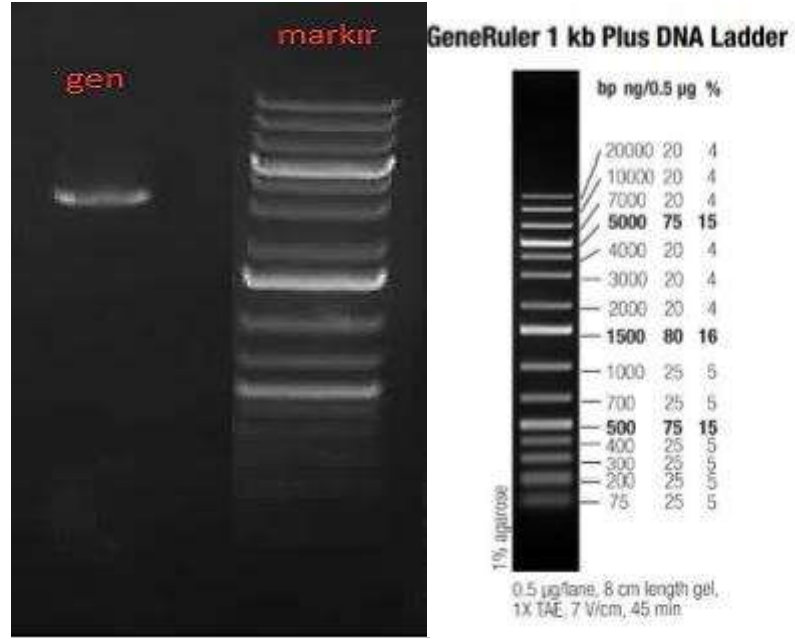
Şekil 3.25: Farklı dokularla yapılan ekspresyon analizi.



Şekil 3.26: Farklı aylarda toplanmış olan yaprak örnekleri.

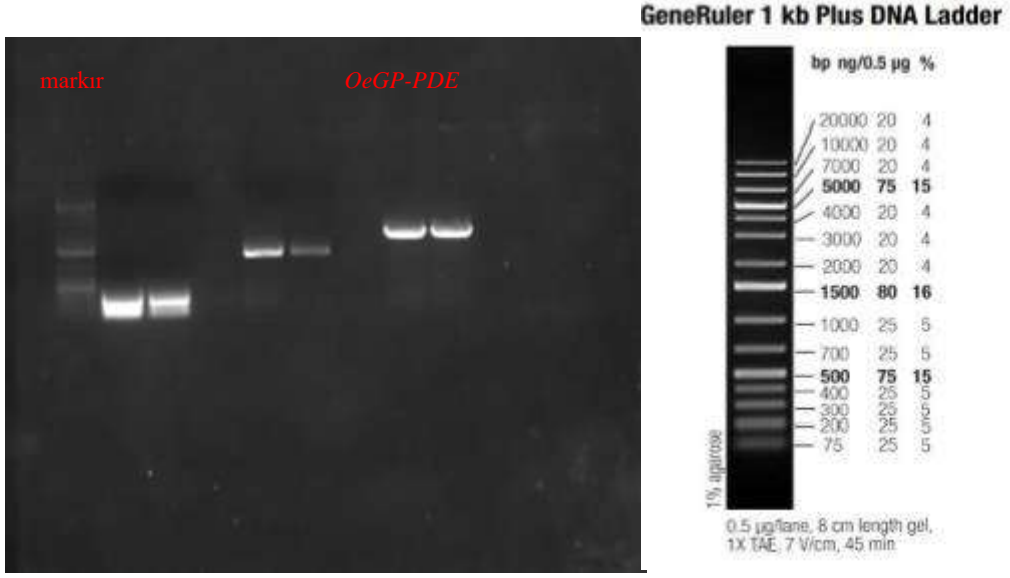
3.7 Klonlama Basamağına Ait Bulgular

Genin, kit kullanılarak yapılan plate51 vektörüne klonlanması için cDNA'ya uygun primerler tasarlandı ve çalışıp çalışmadığı PCR kurularak kontrol edildi. Yapılan PCR sonucu Şekil 3.27'deki gibidir.



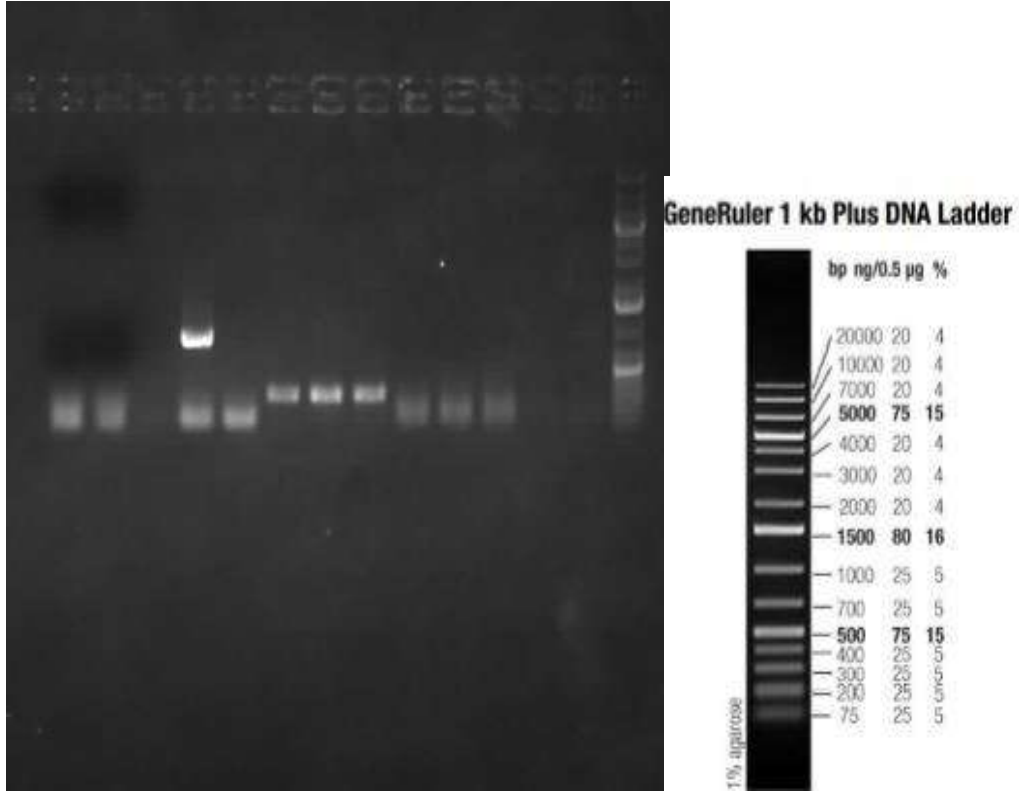
Şekil 3.27: Tasarlanan primerlerle elde edilen PCR sonucu görüntüsü, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

Tasarlanan primerlerle 50 µL PCR örneği hazırlandı, DNA çoğaltıldı (Şekil 3.28) yürütüldü ve uv altında jelden kazanılarak klonlama için kalıp oluşturacak DNA elde edildi.



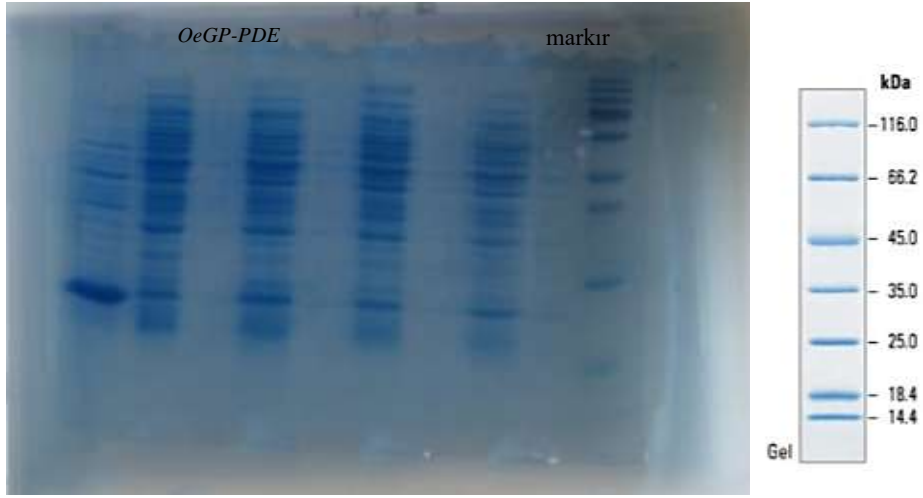
Şekil 3.28: Pürifiye DNA eldesi için uygun primerlerle çoğaltılan DNA'nın PCR sonucu, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder #1331 (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

Jelden kazanılan DNA ile klonlama ve transformasyon basamakları gerçekleştirildi. Hazırlanan bakteri ortamlarında bakterilerin büyümesi ve üremesi sağlandı. Üreyen bakteri kolonileri PCR tüplerine alınarak (yaklaşık 10 örnek), PCR kuruldu (Şekil 3.29) ve en parlak bant veren koloni seçilerek bir sonraki aşamaya geçildi.



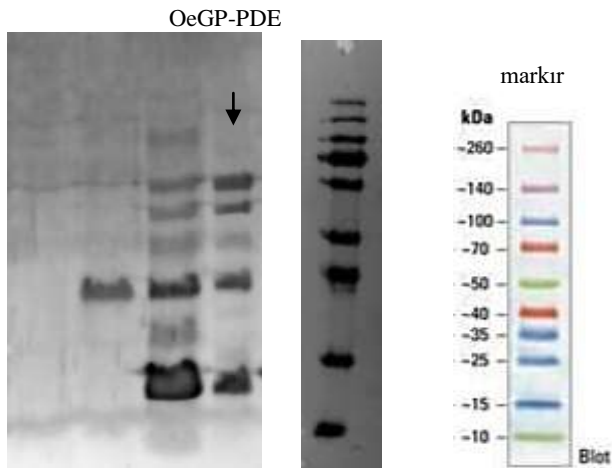
Şekil 3.29: Koloni taraması sonucu kurulan PCR sonucu görüntüsü, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Litvanya).

PCR sonucu en iyi olan koloni protein üretimi aşaması için kullanıldı. Koloni metod kısmında bahsedilen; büyütme, indükleme ve lizis aşamalarından geçirilerek protein elde edildi. Elde edilen protein SDS-PAGE jelinde görüntülendi (Şekil 3.30).



Şekil 3.30: SDS-PAGE jel elektroforezinde rekombinant OeGP-PDE'nin görüntüsü, Markır Fermentas Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker, (Fermentas, Litvanya).

SDS-PAGE jel elektroforezinde görüntülenen proteinlerin içerisinde Western blot yöntemi ile çalıştığımız proteine özgü bant görüntülendi (Şekil 3.31).



Şekil 3.31: Rekombinant OeGP-PDE proteininin Western blot analizi görüntüsü, Markır PageRuler™ Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, Litvanya).

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

GP-PDE enzimi; bakteriler, maya, memeliler, bitkiler gibi çeşitli organizmalarda bulunan [28], gliserofosfodiesterlerin hidrolizi sonucu alkol ve gliserol 3-fosfat açığa çıkmasını sağlayan bir enzimdir [27]. Organizma da önemli yaşamsal faaliyetlerde görevlidir. Farklı canlılarda farklı özelliklere sahiptir. Örneğin; bazı patojenik bakterilerde, konak organizmadan faydalanarak yaşamını sağlar ve patojenitenin artmasına sebep olurken [45], memelilerde bulunan enzim, iskelet sistemi [72], sinir sistemi hücrelerinin farklılaşmasında [74] görevlidir. Organizmalarda farklı sayılarda bulunabilir. Örneğin; *E.coli* ve *L.albus* iki, *A.thaliana* iki farklı tipte on üç, *Homo sapiens* yedi GP-PDE enzimi izoformuna sahiptir. Enzimin kapsamlı çalışması bitkilerden *Arabidopsis thaliana*'da yapılmıştır. Zeytin bitkisine dair herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Zeytin, uzun yıllardır varlığını sürdüren, insan sağlığıyla yakından ilişkili alanlarda önemli kullanımları olan bir bitkidir. Bu yüzden zeytin ile ilgili olan çalışmalar önem arz etmektedir. Dünya da zeytin bitkisinin önemli bir ekonomik pazarı vardır.

Balıkesir Üniversitesi Biyoloji Bölümü kapsamında zeytinin genomik DNA kütüphanesi ile ilgili yapılan çalışmada, zeytinin genomik DNA kütüphanesi oluşturulmuştur. Bu genomik DNA kütüphanesinden “GK 332878” adlı genomik DNA çalışmada kullanılmıştır. NCBI’da yapılan biyoinformatik analizler sonucu genomik DNA’nın *Sesamum indicum* organizmasının gliserofosfodiester fosfodiesteraz enziminine benzediği bulunmuştur.

Bu çalışma kapsamında zeytin GP-PDE geni moleküler yöntemler yardımıyla karakterize edilmiştir. Real-Time analizi yardımıyla dokusal, zamansal ekspresyon seviyeleri belirlenmiş, protein elde edilerek biyokimyasal özelliği belirlenmeye çalışılmıştır.

Zeytin GP-PDE geninin yaklaşık 7 ekzon, 6 intron içerdiği, 749 aminoasit içerdiği, mRNA’sının 2250 bp uzunluğunda olduğu belirlenmiştir.

Biyoinformatik analizler sonucu zeytin GP-PDE geninin polar ve apolar aminoasitleri içerdiği, en fazla serin aminoasidinin bulunduğu, sinyal peptidinin bulunmadığı, molekül ağırlığının 84119.6 olduğu, hücre membranının içinde lokalize olduğu, gözlemlenmiştir.

Polimorfizm çalışmalarında 15 farklı zeytin çeşidi kullanılmıştır. Çalışma sonucu Zeytin GP-PDE geninin polimorfik olduğu tespit edilmiştir.

Real-Time PCR sonucu olarak zeytinde bulunan GP-PDE enziminin en çok olgun meyvede ekspre olduğu, analizde kullanılan Temmuz, Ağustos, Eylül, Ekim, Aralık, Ocak, Şubat ayları yaprak örneklerinden en çok Aralık ayında sentezlendiği görülmüştür.

Zeytin GP-PDE geninin cDNA'sı elde edilirken NCBI veritabanında benzer geni baz alarak ekzon ve intron bölgeleri belirlenmeye çalışıldı. GenScan veritabanı kullanılarak genin cDNA'sı belirlendi ve bu sonucun daha güvenilir olduğu kararlaştırılarak çalışmanın devamı GenScan veritabanından elde edilmiş olan cDNA kullanılarak yürütüldü. CLC genomics programı kullanılarak genin zeytindeki kopya sayıları ve yüzde yüz benzer olan parçası bulundu. Kopya, akraba ve yüzde yüz benzer olan diziler ile NCBI veritabanında Blast sonucu elde ettiğimiz benzer ilk 10 geni filogenetik ağaç oluşturmak üzere kullanıldı. Filogenetik ağaç sonucu beklenildiği gibi çıkmadı ve bu durum zeytinde bulunan GP-PDE enziminin de birden fazla altbirimi olabileceğini düşündürdü.

Bitkilerde kapsamlı olarak çalışılmış olan *A.thaliana* bitkisinin 13 farklı GP-PDE enzimi [84] ile genimizin zeytinde bulunan kopya, akraba ve yüzde yüz benzerlik gösterdiği diziler kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Bunun sonucu olarak da zeytindeki GP-PDE enzimine ait verilerin 13 homologun herbiri ile farklı yakınlıkta olduğu görülmüş oldu.

Genin klonlama çalışmaları sorunsuz ilerlemiş, rekombinant protein eldesi gerçekleştirilmiştir. Ancak uzun süren uğraşlar sonucunda Western blot analizi sonuçları başarılı bir şekilde elde edilememiştir. Western blot analizi sonucu elde edildikten sonra genin ekstrem koşullardaki aktivite deneyleri

gerçekleştirilecek, böylece genin farklı koşullardaki biyolojik faaliyetleri gözlemlenmiş olacaktır.

Serin aminoasidi GP-PDE geninde en fazla bulunan aminoasittir. Serin; pürin, pirimidin, sistein, bakterilerdeki triptofan ve daha birçok metabolitin biyosentezinde görevli bir aminoasittir. Enzimlerin yapısında bulunduğu katalitik fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli bir göreve sahiptir [103].

Birçok organizmanın parasempatik sinir sisteminde görevli olan asetilkolin nörotransmitter molekülü, asetilkolin esteraz enzimi tarafından inaktive edilir. Asetilkolin esteraz enzimi görevini yerine getirmediğinde asetilkolin nörotransmitter molekülü sürekli salgılanır [104] ve bu durumda canlının kasları sürekli uyarılır. Asetilkolin esteraz enziminin inhibe olması ise, yapısındaki serin aminoasidinin kimyasal olarak değiştirilmesiyle mümkün olur. Serin aminoasidinin işlevi kimyasal yöntemlerle değiştirilir, asetilkolin esteraz enzimi görevini yerine getiremez, asetilkolin salgılanması sürekli hale gelir ve organizma sürekli uyarılır.

Merkezi sinir sisteminden kaynaklı bazı hastalıklar asetilkolin nörotransmitter molekülünün eksikliğinden kaynaklanır [105]. Bu hastalıklardan olan Alzheimer hastalığı için, asetilkolin esteraz enzimini inhibe edilmesi hastalığın tedavisinde önemlidir [103]. Myastenia gravis hastalığının tedavisinde de asetilkolin esteraz enzimini inhibe eden ilaçlar kullanılmaktadır [106]. Bunların yanı sıra asetilkolin nörotransmitter molekülü, katarakt ameliyatlarında göz bebeğinin hızlı bir şekilde küçülüp daralmasında kullanılır.

Lösin, genimizin yapısında bulunan ikinci sırada en fazla sentezlenen aminoasittir. Lösin aminoasidi kaslar ve karaciğerde protein sentezinin artmasını sağlar. Lösinin izomeri olan İzölösin aminoasidi enerji kaynağı olarak da kullanılabilir. Beslenme yoluyla vücuda alınamayan Lösin aminoasidi eksikliği, B₆ vitamini eksikliği olarak görülmektedir [107].

Genimizde sentezlenen aminoasitlerden en fazla üçüncü olarak sentezlenenini ise Valin aminoasididir. Valin aminoasidi, yapısında meydana gelen mutasyon sebebiyle glutamik aside dönüşür ve orak hücre anemisi

hastalığına sebep olur. Orak hücre anemisi hastalığında, hemoglobinin 3 boyutlu yapısı bozulur ve alyuvarlar içerisinde kristal yapıya dönüşür, olması gerektiği gibi taşınmaz [108].

En fazla beşinci olarak sentezlenen aminoasit ise Prolin'dir. Prolin aminoasidi insan derisinde bulunan kolajen proteini yapılarında daha çok bulunur. Prolin aminoasidinin hidroksilli türevi olan hidroksprolin de kollajen yapıdadır. Vücuttaki Prolin aminoasidi eksikliğinde, Hiperprolinemi Tip 1 ve Hiperprolinemi Tip 2 metabolik bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Hiperprolinemi Tip 1 metabolik bozukluğunda; mental retardasyon, böbrekte meydana gelen bozukluklar ve sara hastalığı, Hiperprolinemi Tip 2 metabolik bozukluğunda ise, mental retardasyon hastalığı kaydedilmiştir [109].

Son olarak en fazla sentezlenen aminoasit ise Alanin'dir. Alanin proteinlerin yapısında oldukça fazla miktarda bulunan, en sık kullanılan aminoasittir. Alanin canlıların temel metabolizmalarında görevlidir, örneğin; karbohidrat metabolizması [110].

Canlıların yapısında bulunarak önemli yaşamsal faaliyetlerde görevli serin, lösin, valin, alanin, prolin aminoasitlerinin önemi örneklerle çoğaltılabilir. Çalıştığımız genin bu aminoasitler bakımından zengin olması, bu aminoasitlerin insanlarla doğrudan ilişkili olması, zeytinin kolay bulunabilir, ucuz ve bulunduğumuz topraklarda yetiştirilmesinin kolay olması daha sonraki çalışmalarda dikkate alınması gereken bir unsur olmaktadır. Zeytinin dünya çapında insanlık adına ne kadar önemli bir yere sahip olduğu bilinmektedir. Zeytine ait olan, çoğu yaşamsal faaliyette önemli yeri olan gliserofosfodister fosfodiesteraz enziminin işlevinin aydınlatılması ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] Duran, M., “Zeytin/Zeytinyağı [online]”, (25.12.2015), <http://www.ito.org.tr/Dokuman/Sektor/1-106.pdf>, (2006).
- [2] Dara, R., *Sofralara Geldi Bahar Baharatlar- Kokulu Otlar Yerel ve Evrensel Tatlar*, Yapı Kredi Yayınları, (2010).
- [3] Bozkaya, F., Dolu Yılında Zeytin (*Olea Europaea L.*) Bitkisinde Mineral Bitki Besin Maddelerinin Mevsimsel Değişiminin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilimdalı, Aydın, (2009).
- [4] Turrill, W. B., “Wild and cultivated olives”, *British Association for the Advancement of Science*, 6(3), 437-442, (1951).
- [5] Blazquez, J. M. Dünya Zeytin Ansiklopedisi. Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, Principe de Vergana, 154. 19-53, (1997).
- [6] Kaplan, M., Arıhan, S., “Antik Çağdan Günümüze Bir Şifa Kaynağı: Zeytin ve Zeytinyağının Halk Tıbbında Kullanımı”, *Ankara Üniversitesi Dergisi*, 1-15, (2012).
- [7] Özdizbay, A., *Eski Yunan'da Tarım*, Türk Eskiçağ Bilimleri Enstitüsü Yayınları, (2004).
- [8] Hehn, V., *Zeytin Üzüm ve İncir- Kültür Tarihi ve Eskizleri*, Dost Kitabevi Yayınları, (2000).
- [9] Ünsal, A., *Ölmez Ağacın Peşinde-Türkiye’de Zeytin ve Zeytinyağı*, Yapı Kredi Yayınlar, (2011).

- [10] Kuşadası Ticaret Odası, “Türkiye’de Zeytin Ve Zeytinyağı”, *KUTO Araştırma Yayınları*,(2010).
- [11] Tatlı, A., “Zeytin ve Türkiye’de Zeytincilik”, *Kahramanmaraş’ta tarım ve yaşam dergisi* 1, 14-18, (2014).
- [12] TÜİK 2013 Verileri, (23.12.2015), <http://www.tuik.gov.tr/Start.do;jsessionid=RkNKXxGHX6gzxhHN2J9RN7bdy0stWfQF2fz5JkwnpcYytylyT6Kg!688340026>, 2013.
- [13] Bedestenci H. C., Vuruş, H., “Türkiye’de Zeytin Üretimi Ve Geleceği”, *Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2, 136-144, (2000).
- [14] Varol, N., Ayaz, M., “Küresel İklim Değişikliği ve Zeytincilik”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5(1), 11-13, (2012).
- [15] Principe, D. V., *Dünya Zeytin Ansiklopedisi*, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, (1998).
- [16] İpekoğlu, A. N., Karakulak, Ş., Zeytin Yapraklarından Antioksidan Eldesinde, Etüv Ve Mikrodalga İle Kurutmanın, Çözücü, Sıcaklık Ve Zaman Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilimdalı, İstanbul, (2009).
- [17] Hashmi, M. A., Khan, A. and Perveen, S., “Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology of *Olea europaea* (Olive)”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 29, (2015).
- [18] M. T. Khayyal, M. A. El-Ghazaly, D. M. Abdallah, N. N. Nassar, S. N. Okpanyi, and M.-H. Kreuter, “Blood pressure lowering effect of an olive leaf extract (*Olea europaea*) in L-NAME induced hypertension in rats,” *Arzneimittel-Forschung*, 52(11), 797–802, (2002).

- [19] Galili, E., Stanley, D. J., Sharvit, J. and Weinstein-Evron, M., “Evidence for earliest olive-oil production in submerged settlements off the Carmel coast, Israel”, *Journal of Archaeological Science*, 24, 1141-1150, (1997).
- [20] Armutcu, F., Akyol, S., Hasgül, R., Yiğitoğlu, M.R., “Biologically Effects and the Medical Usage of Olive Leaves”, *Spatula DD*, 1(3), 159-165, (2011).
- [21] Assy, N., Nassar, F., Nasser, G., and Grosovski, M., “Olive oil consumption and non-alcoholic fatty liver disease”, *World Journal of Gastroenterology*, 15(15), 1809-1815 (2009).
- [22] Cardeno, A., Sanchez-Hidalgo, M., Alarcon-de-la-Lastra, C., “An Up-date of Olive Oil Phenols in Inflammation and Cancer: Molecular Mechanisms and Clinical Implications”, *Bentham Science Publishers*, 20(37), 4758-4776, (2013).
- [23] Soni, M., Burdock, G., Christian, M., Bitler, C., Crea, R., “Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods”, *Food Chem Toxicology*, 44(7), 903, (2006).
- [24] Dekanski, D., Jančićjević-hudomal, S., Tadic, V., Markovic, G., Arsić, I., and Mitrović, D.M., “Phytochemical analysis and gastroprotective activity of an olive leaf extract,” *Journal of the Serbian Chemical Society*, 74(4), 367–377, (2009).
- [25] Ghanbari, R., Anwar, F., Alkharfy, K.M., Gilani, A., and Saari, N., “Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive” *International Journal of Molecular Sciences*, 13(3), 3291-3340, (2012).
- [26] Ulusal Zeytinyağı Konseyi, (23.12.2015), (<http://www.internationaloliveoil.org>), (2013).

- [27] Rest, B., Rolland, N., Boisson, A., Ferro, M., Bligny, R., and Douce, R., “Identification and characterization of plant glycerophosphodiester phosphodiesterase”, *Biochemical Journal*, 379, 601–607, (2004).
- [28] Corda, D., Mosca, M.G., Ohshima, N., Grauso, L., Yanaka, N., and Mariggio, S., “The emerging physiological roles of the glycerophosphodiesterase family”, *FEBS Journal*, 281 (4), 998–1016, (2014).
- [29] Shi, L., Liu, J., An, X. and Liang, D., “Crystal structure of glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) from *Thermoanaerobacter tengcongensis* metal ion-dependent enzyme: Insight into the catalytic mechanism”, *Proteins*, 72(1), 280-8, (2008).
- [30] Wang, Y., Geer, L.Y., Chappey, C., Kans, J.A. and Bryantemail, S.H., “Cn3D: sequence and structure views for Entrez”, *Trends Biochem Science*, 25(6), 300-302, (2000).
- [31] Larson, T.J., Ehrmann, M., Boos, W., “Periplasmic glycerophosphodiester phosphodiesterase of *Escherichia coli*, a new enzyme of the *glp* regulon” *The Journal Of Biological Chemistry*, 258(9), 5428–5432 (1983).
- [32] Kasahara, M., Makino, K., Amemura, M., Nakata, A., “Nucleotide sequence of the *ugpQ* gene encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterase of *Escherichia coli* K-12”, *Nucleic Acids Research*, 17(7), 2854 (1989).
- [33] Tommassen, J., Eiglmeier, K., Cole, S. T., Overduin, P., Larson, T. J. and Boos, W., “Characterization of two genes, *glpQ* and *ugpQ*, encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli*”, *Mol. Gen. Genet.*, 226, 321–327. (1991)
- [34] Beacham, I.R., “Periplasmic enzymes in gramnegative bacteria” *International Journal of Biochemistry*, 10(11), 877–883, (1979).

- [35] Brzoska, P. and Boos, W., “Characteristics of a ugp-encoded and phoB-dependent glycerophosphoryl diester phosphodiesterase which is physically dependent on the ugp transport system of *Escherichia coli*”, *Journal Of Bacteriology*, 170(9), 4125-4135 (1988).
- [36] Ohshima, N., Yamashita, S., Takahashi, N., Kuroishi, C., Shiro, Y., Takio, K., “*Escherichia coli* Cytosolic Glycerophosphodiester Phosphodiesterase (UgpQ) Requires Mg^{2+} , Co^{2+} , or Mn^{2+} for Its Enzyme Activity” *Journal Of Bacteriology*, 190(8), 1219-1223, (2008).
- [37] Su, T., Schweizer, H. P., Oxender, D. L., “Carbon-starvation induction of the ugp operon, encoding the binding protein-dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system in *Escherichia coli*”, *Molecular and General Genetics*, 230(1), 28-32, (1991).
- [38] Janson, H., Hedén, L., Grubb, A., Ruan, MR., Forsgren, A., “Protein D, an immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*: cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli*”, *Infection And Immunity*, 59(1), 119-125, (1991).
- [39] Bandi, V., Apicella, M. A., Mason, E., Murphy, T. F., Siddiqi, A., Atmar, R. L., and Greenberg, S. B., “Nontypeable *Haemophilus influenzae* in the lower respiratory tract of patients with chronic bronchitis” *Am J Respir Crit Care Med*. 164(11), 2114–2119, (2001).
- [40] Maw, A. R., “Chronic otitis media with effusion (glue ear) and adenotonsillectomy: prospective randomised controlled study”, *British Medical Journal*, 287, 1586–1588, (1983).
- [41] Sethi, S., Timothy, F., and Murphy, T. F., “Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease”, *The New England Journal of Medicine*, 359, 2355–2365, (2008).

- [42] Murphy, T. F., “Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*”. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 16(2), 129–134, (2003).
- [43] Janson, H., Hedén L.O., and Forsgren, A., “Protein D, the immunoglobulin D-binding protein of *Haemophilus influenzae*, is a lipoprotein” *Infection And Immunity*, 60(4), 1336–1342, (1992).
- [44] Forsgren, A., Riesbeck, K., “Protein D of *Haemophilus influenzae*: a protective nontypeable *H. influenzae* antigen and a carrier for pneumococcal conjugate vaccines” *Oxford Journals*, 46(5), 726-731, (2008).
- [45] Schmid, S.R., Otto, A., Lluch-Senar, M., Piñol, J., Busse, J., Becher, D., and Stulke, J., “A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression”, *PLoS Pathogens*, 7(9), 1-14, (2011).
- [46] Kornspan, J.D., Rottem, S., “Phospholipase A and glycerophosphodiesterase activities in the cell membrane of *Mycoplasma hyorhinis*”, *Oxford Journals*, 332(1), 34-9, (2012).
- [47] Kotani, H., Butler, G.H., Tallarida, D., Cody, C., McGarrity, G.J., “Microbiological cultivation of *Mycoplasma hyorhinis* from cell cultures”, *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 26(1), 91-96, (1990).
- [48] Kobisch, M., Friis, N.F., “Swine mycoplasmoses”, *Revue scientifique et technique*, 15 (4), 1569-1605, (1996).
- [49] Morita, T., Fukuda, H., Awakura, T., Shimada, A., Umemura, T., Kazama, S., and Yagihashi, T., “Demonstration of *Mycoplasma hyorhinis* as a possible primary pathogen for porcine otitis media”, *Veterinary Pathology*, 32, 107-111, (1995).

- [50] Huang, S., Li, JY., Wu, J., Meng, L., and Shou, CC., “Mycoplasma infections and different human carcinomas”, *World Journal of Gastroenterology*, 7(2), 266-9, (2001).
- [51] Yang, H., Qu, L., Ma, H., Chen, L., , Liu, W., Liu, C., Meng, L., and Wu, J., “Chengchao ShouMycoplasma hyorhinis infection in gastric carcinoma and its effects on the malignant phenotypes of gastric cancer cells” *BMC Gastroenterology*, 10(132), 2-8, (2010).
- [52] Fischer, K. E., , Bremer, E., “Activity of the osmotically regulated yqiHIK promoter from *Bacillus subtilis* is controlled at a distance”, *Journal of bacteriology*, 194(19), 5197–5208, (2012).
- [53] Ryffel, C., Bucher, R., Kayser, F. H., and Bachi, B. B., “The *Staphylococcus aureus* mec determinant comprises an unusual cluster of direct repeats and codes for a gene product similar to the *Escherichia coli* sn-glycerophosphoryl diester phosphodiesterase”, *Journal of Bacteriology*, 173(23), 7416-7422, (1991).
- [54] Ferna´ndez-Murray, J. P., McMaster, C. R., “Glycerophosphocholine Catabolism as a New Route for Choline Formation for Phosphatidylcholine Synthesis by the Kennedy Pathway”, *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38290 –38296, (2005).
- [55] Beilharz, T., Egan, B., Silver, P. A., Hofmann, K., and Lithgow, T., “Bipartite signals mediate subcellular targeting of tail-anchored membrane proteins in *Saccharomyces cerevisiae*”, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(10), 8219-23, (2003).
- [56] Huh, W., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K., “Global analysis of protein localization in budding yeast”, *Nature* 425, 686-691, (2003).

- [57] Simockova, M., Holic, Roman., Tahotn, D., Patton-Vogt, J., and Griac, P., “Yeast Pgc1p (YPL206c) controls the amount of phosphatidylglycerol via a phospholipase C-type degradation mechanism”, *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17107–17115, (2008).
- [58] Webster, G. R., Marples, E. A. and Thompson, R. H. S., “Glycerolphosphorylcholine diesterase activity of nervous tissue”, *Biochem J.*, 65(2), 374-377, (1957).
- [59] Jope, R. S. and Jenden, D. J., “Choline and phospholipid metabolism and the synthesis of acetylcholine in rat brain”, *Journal of Neuroscience Research*, 4(1), 69–82, (1979).
- [60] Dawson, R. M. C., “The role of glycerolphosphorylcholine and glycerolphosphorylethanolamine in liver phospholipid metabolism” *Biochemical Journal*, 59(1), 5–8, (1955).
- [61] Baldwin, J. J. and Cornatzer, W. E., ”Rat kidney glycerolphosphorylcholine diesterase”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 164(2), 195–204. (1968).
- [62] Mitra, J., and Chowdhury, M., “Purification and characterization of rat uterine glycerolphosphorylcholine diesterase and its tissue-specific induction by 17 betaestradiol”, *Endocrinology*, 129(3), 1147-54, (1991).
- [63] Infante, J. P., “Defective synthesis of GPC in murine muscular dystrophy: the primary molecular lesion?”, *FEBS Letters*, 186(2), 205–210. (1985).
- [64] Yanaka, N., “Mammalian glycerophosphodiester phosphodiesterases”, *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(8), 1811–1818, (2007).
- [65] Safran, M., Dalah, I., Alexander, J., Rosen, N., Stein, T. I., Shmoish, M., Nativ, N., Bahir, I., Doniger, T., Krug, H., Sirota-Madi, A., Olender, T., Golan, Y., Stelzer, G., Harel, A., and Lancet, D., “GeneCards Version 3: The human gene integrator”, *Database*, 2010, 1-16, (2010).

- [66] Zheng, B., Berrie, C. P., Corda, D., and Farquhar, M. G., “GDE1/MIR16 is a glycerophosphoinositol phosphodiesterase regulated by stimulation of G protein-coupled receptors”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1745–1750, (2003).
- [67] Fo, C.S., Coleman, C.S., Wallick, C.J., Vine, A.L., and Bachmann, A.S., “Genomic organization, expression profile, and characterization of the new protein PRA1 domain family, member 2 (PRAF2)” *Gene*, 371(1), 154–165, (2006).
- [68] AS, B., FF, Duennebier., and G, M., “Genomic organization, characterization, and molecular 3D model of GDE1, a novel mammalian glycerophosphoinositol phosphodiesterase” *Gene*, 137(1), 144–153, (2006).
- [69] Simon, GM., Cravatt, BF., “Anandamide biosynthesis catalyzed by the phosphodiesterase GDE1 and detection of glycerophospho-N-acyl ethanolamine precursors in mouse brain” *The Journal of Biological Chemistry*, 283(14), 9341–9349, (2008).
- [70] Lang, Q., Zhang, H., Li, J., Yin, H., Zhang, Y., Tang, W., Wan, B., Yu, L., “Cloning and characterization of a human GDPD domain-containing protein GDPD5” *Molecular Biology Reports*, 35(3), 351-359, (2007).
- [71] Gallazzini, M., Ferraris, JD., Burg, MB., “GDPD5 is a glycerophosphocholine phosphodiesterase that osmotically regulates the osmoprotective organic osmolyte GPC” *PNAS*, 105(31), 11026–11031, (2008).
- [72] Rao, M., Sockanathan, S., “Transmembrane protein GDE2 induces motor neuron differentiation in vivo” *Science*, 309(5744), 2212-2215, (2005).
- [73] Nogusa, Y., Fujioka, Y., Komatsu, R., Kato, N., Yanak, N., “Isolation and characterization of two serpentine membrane proteins containing

- glycerophosphodiester phosphodiesterase, GDE2 and GDE6” *Gene*, 337, 173–179, (2004).
- [74] Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto S., and Kasa, S., “In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria” *The Journal of Cell Biology*, 96, 191- 198, (1983).
- [75] The developmentally regulated osteoblast phosphodiesterase GDE3 is glycerophosphoinositolspecific and modulates cell growth” *The Journal of Biological Chemistry*, 284(37), (2009).
- [76] Yanaka, N., Imai, Y., Kawai, E., Akatsuka, H., Wakimoto, K., Nogusa, Y., Kato, N., Chiba, H., Kotani, E., Omori, K., and Sakurai, N., “Novel membrane protein containing glycerophosphodiester phosphodiesterase motif is transiently expressed during osteoblast differentiation” *The Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 335-8305, (2003).
- [77] Trygve, E.B., Cooper Roddeyc, J., Djurovicd, S., and Akshoomoff, N., “Association of common genetic variants in GPCPD1 with scaling of visual cortical surface area in humans” *PNAS*,109(10), 3985–3990, (2012).
- [78] Ohshima, N., Kudo, T., Yamashita, Y., and Mariggìò, S., “New Members of the Mammalian Glycerophosphodiester Phosphodiesterase Family: GDE4 and GDE7 Produce Lysophosphatidic Acid by Lysophospholipase D Activity” *The Journal of Biological Chemistry*, 290(7), 2015.
- [79] Cheng, Y., Zhou, W., El Sheery, N., Peters, C., Li, M., Wang, X., and Huang, J., “Characterization of the Arabidopsis glycerophosphodiester phosphodiesterase (GDPD) family reveals a role of the plastid-localized AtGDPD1 in maintaining cellular phosphate homeostasis under phosphate starvation” *The Plant journal : for cell and molecular biology* 66(5), 781–795, (2011).

- [80] Van der Rest, B., Boisson, AM., Gout, E., Bligny, R., and Douce, R., “Glycerophosphocholine metabolism in higher plant cells. Evidence of a new glyceryl- phosphodiester phosphodiesterase”, *Plant physiology*, 130(1), 244–255, (2002).
- [81] Choi, CS., Sano, H., “Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants”, *Molecular Genetics and Genomics*, 277(5), 589–600, (2007).
- [82] Cheng, L., Bucciarelli, B., Liu, J., Zinn, K., Miller, S., Patton-Vogt, J., Allan, D., Shen, J., and Vance, CP., “White lupin cluster root acclimation to phosphorus deficiency and root hair development involve unique glycerophosphodiester phosphodiesterases”, *Plant physiology*, 156(3), 1131–1148, (2011).
- [83] Nakamura, Y., Koizumi, R., Shui, G., Shimojima, M., Wenk, M., Ito, T. and Ohta, H. “Arabidopsis lipins mediate eukaryotic pathway of lipid metabolism and cope critically with phosphate starvation”, *PNAS*, 106, 20978–20983, (2009).
- [84] Bernfur, K., Larsson, O., Larsson, C., and Gustavsson, N., “Relative Abundance of Integral Plasma Membrane Proteins in Arabidopsis Leaf and Root Tissue Determined by Metabolic Labeling and Mass Spectrometry”, *PLOS ONE*, 1-12, (2013).
- [85] Raghothama, KG., “Phosphate acquisition”, *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 50, 665-693, (1990).
- [86] Lynch, J., “Root architecture and plant productivity”, *Plant physiology*, 109, 7-13, (1995).

- [87] Gu, M., Chen, A., Dai, X., Liu, W., and Xu, G., “How does phosphate status influence the development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis?”, *Plant signaling & behavior*, 6(9), 1300-1304, (2011).
- [88] Nakamura, Y., “Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants”, *Progress in lipid research*, 52(1), 43-50, (2013).
- [89] Patton-Vogt, J., “Transport and metabolism of glycerophosphodiester produced through phospholipid deacylation”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(3), 337–342, (2007).
- [90] Matos, A., Pham-Thi, A., “Lipid deacylating enzymes in plants: old activities, new genes”, *Plant physiology and biochemistry*, 47(6), 491–503, (2009).
- [91] Gibellini, F. and Smith, T. K., “The Kennedy pathway--De novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine”, *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, 62(6), 414-428, (2010).
- [92] Shen, W., Wei, Y., Dauk, M., Tan, Y., Taylor, D., Selvaraj, G. and Zou, J., “Involvement of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase in modulating the NADH/NAD⁺ ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in Arabidopsis”, *Plant Cell*, 18(2), 422–441, (2006).
- [93] Hayashi, S., Ishii, T., Matsunaga, T., Tominaga, R., Kuromori, T., W., et al, “The Glycerophosphoryl Diester Phosphodiesterase-Like Proteins SHV3 and its Homologs Play Important Roles in Cell Wall Organization”, *Plant & cell physiology*, 49(10), 1522-1535, (2008).
- [94] Jones, M., Raymond, M. and Smirnov, N., “Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in Arabidopsis”, *The Plant journal*, 45(1), 83–100, (2006).

- [95] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J., "Basic Local Alignment Search Tool", *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410, (1990).
- [96] Hall, T.A., "Bioedit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt", *In Nucl. Acids Symp Ser*, 41, 95-98, (1999).
- [97] Gasteiger, E., Gattiker, A., Hoogland, C., Ivanyi, I., Appel, R. D., and Bairoch, A., "ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis", *Nucleic Acids Research*, 13(31), 3784–3788, (2003).
- [98] Burge, C., Karlin, S., "Prediction of complete gene structures in human genomic DNA", *Journal of Molecular Biology*, 268(1), 78-94, (1997).
- [99] Crona, J., Ljungström, V., Welin, S., Walz, M. K., Hellman, P., and Björklund, P., "Bioinformatic Challenges in Clinical Diagnostic Application of Targeted Next Generation Sequencing: Experience from Pheochromocytoma", *PloS one*, 10(7), 1-16, (2015).
- [100] Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., Amitai, G., Edgar, R., et al., "CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. Asaf Levy", *Nature*, 520, 505–510, (2015).
- [101] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., C., et al, "Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist", *Nucleic acids research*, 36, 465-469, (2008).
- [102] Rozen, S., Skaletsky, H.J., " Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers", *Methods in molecular biology*, 132, 365-386, (2000).
- [103] "Serin [online]", (16.05.2016), <https://tr.wikipedia.org/wiki/Serin>, (2016).

- [104]“Asetilkolin [online]”, (16.05.2016),
<https://tr.wikipedia.org/wiki/Asetilkolin>, (2016).
- [105]Altınışik, M., “Nörotransmitterler [online]”, (12.05.2016),
<http://www.mustafaaltinisik.org.uk/89-2-19.pdf>, (2016).
- [106] Conti-Fine, B. M., Milani, M., Kaminski, H. J., “Myasthenia gravis: past, present, and future”, *The Journal of Clinical Investigation*, 116(11), 2843-2854, (2006).
- [107] Kaya, N., Gürsel, V., “Lösin Aminopeptidazın Fonksionu ve Klinik Önemi”,*Ankara Üniversitesi Tıp Bülteni*, 18, 87-90, (1986).
- [108] Kılınç, Y., “Orak Hücre Anemisi:Tanı, Takip, Tedavi ve Transfüzyon [online]”, (10.05.2016),
<http://www.talasemifederasyonu.com.tr/pdf/tani/cansinnTedavi-28.pdf>, (2016).
- [109] Çelik, A., “Prolidaz; Önemi ve güncel yaklaşımlar [online], (16.05.2016),
http://www.turkbiyokimyadernegei.org.tr/dosyalar/belgeler/kongre/kahramanmaras2013/Yrd_Doc_Dr_Ahmet_CELIK.pdf, (2013).
- [110]Ası, T., “Karbohidrat Metabolizması [online]”, (16.05.2016),
http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Tablolarla_Biyokimya/TB-Karbonhidrat_Metabolizmasi.pdf,(1999).

EKLER

6. EKLER

EK A Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar

1. BAKİ E., DÜNDAR E., ÜNVER T., 2015 Zeytin Tahmini Gliserofosfodiester Fosfodiesteraz Geninin Moleküler Karakterizasyonu. 1. Ulusal Bitki Biyolojisi Kongresi. BOLU