

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



**ZEYTİN AÇIL-KOA BAĞLANMA PROTEİNİNİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BÜŞRA BAŞ**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

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



**ZEYTİN AÇIL-KOA BAĞLANMA PROTEİNİNİN  
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BÜŞRA BAŞ**

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

**Doç. Dr. Turgay ÜNVER**

**Doç. Dr. Fatih COŞKUN**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

**Büşra BAŞ** tarafından hazırlanan “ZEYTİN AÇIL-KOA BAĞLANMA PROTEİNİNİN 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. Turgay ÜNVER

Üye  
Doç. Dr. Fatih COŞKUN



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 TÜBİTAK tarafından 110O108 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**ZEYTİN AÇIL-KOA BAĞLANMA PROTEİNİNİN MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BÜŞRA BAŞ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI:DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)**

**BALIKESİR, HAZİRAN - 2016**

Zeytin (*Olea europaea* L.) her dem yeşil, uzun ömürlü, Akdeniz iklimine özgü ve tanen, uçucu yağlar, organik asitler ile rezin açısından zengin bir ağaç türüdür. Bu çalışmada zeytin meyve cDNA kütüphanesinden elde edilen tahmini Açıl-KoA bağlanma proteininin (*ACBP*) karakterizasyonu ve genin işlevinin tespit edilmesi amaçlanmıştır. *ACBP*'nin bitkilerde dört sınıfa ayrılır, moleküler ağırlığı yaklaşık 10 - 73 kDa arasında değişir, hidrofobiktir ve stres yanıtı, bitki embriyo gelişimi, yaprak yaşlanması, patojen direnci ile lipid metabolizmasında rol alır. Zeytin Açıl-KoA bağlanma proteininin (*OeACBP*) biyoinformatik analizi için nükleotid ve protein BLAST, BioEdit, FinchTV, CLC Genomics Workbench, Primer3, SOSUI, SignalP ve TMHMM programları kullanılmış, moleküler karakterizasyon çalışmaları için ise polimorfizm, anlık gösterimli (real-time) PCR, klonlama, transformasyon ve Western Blot yöntemleri uygulanmıştır. Biyoinformatik analizler sonucunda *OeACBP*'nin; 88 aminoasitten oluşan ve en çok glutamik asit, alanin ile lizin içeren, 10 kDa moleküler ağırlığında, hidrofobik, optimum pH değeri 5.85 olan bir protein olduğu tespit edilmiştir. Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonucunda *OeACBP* geninin polimorfik olduğu ve en çok meyvede ifade edildiği tespit edilmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Zeytin, *Olea europaea* L., Açıl KoA bağlanma proteini, *ACBP*.

## ABSTRACT

### MOLECULAR CHARACTERIZATION OF OLIVE ACYL-KoA BINDING PROTEIN

MSC THESIS

BÜŞRA BAŞ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

BIOLOGY

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

BALIKESİR, JUNE 2016

Olive (*Olea europaea* L.) is an evergreen perennial tree that is special to Mediterranean climate and rich in tannins, essential oils, organic acids and resins. In this study it was aimed to characterize a putative acyl KoA binding protein (*ACBP*) that was obtained from a fruit cDNA library, and determine its function. In plants, *ACBP* contains four classes. The protein is hydrophobic and its molecular weight varies from 10 to 73 kDa. The gene has functions in stress response, plant embryo development, leaf aging, pathogen resistance and lipid metabolism. BioEdit, FinchTV, CLC Genomics Workbench, Primer3, SOSUI, SignalP and TMHMM nucleotide and protein BLAST programs were utilized for bioinformatic analyses of *ACBP* while polymorphism, real time PCR, cloning, transformation and Western Blot analyses were applied for molecular characterization studies. The bioinformatic analysis revealed that *OeACBP* was a protein consisting of 88 amino acids (most of the amino acids were glutamic acid, alanine and lysine), 10 kDa molecular weight, hydrophobic, with an optimum pH of 5.85. Molecular characterization studies established that *OeACBP* was polymorphic and it was expressed the most in fruit.

**KEYWORDS:** Olive, *Olea europaea* L., Acyl KoA binding protein, *ACBP*.

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	<b>v</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>SEMBOL LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>viii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zeytin ( <i>Olea europaea</i> L.) .....	1
1.2 Açıl-KoA Bağlanma Proteini ( <i>ACBP</i> ) .....	3
1.2.1 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin ( <i>ACBP</i> ) Genel Özellikleri.....	3
1.2.2 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin Sınıflandırılması .....	4
1.2.3 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin Fonksiyonel Özellikleri .....	9
1.2.3.1 Yağ Asiti Biyosentezindeki Rolü .....	9
1.2.3.2 Bitki Embriyo Gelişimindeki Rolü .....	13
1.2.3.3 Yaprak Dökülmesindeki Rolü .....	14
1.2.3.4 Ağır Metal Direnci ve Oksidatif Stresteki Rolü .....	15
1.2.3.5 Donmaya Karşı Toleranstaki Rolü .....	16
1.2.3.6 Patojen Direncindeki Rolü.....	17
<b>2. MATERYAL VE METOT</b> .....	<b>19</b>
2.1 Biyoinformatik Analiz .....	19
2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması ....	20
2.3 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması.....	20
2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	20
2.5 Agaroz Jel Elektroforezi .....	21
2.6 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama.....	22
2.7 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu .....	22
2.8 RNA İzolasyonu.....	24
2.9 Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi.....	25
2.10 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR).....	26
2.11 Klonlama ve Transformasyon .....	26
2.11.1 Klonlama İçin Primer Dizaynı.....	26
2.11.2 Jelden Kazanım.....	27
2.11.3 PCR Pürifikasyonu .....	28
2.11.4 Ampisilin Hazırlama ( 50 mg/mL) .....	28
2.11.5 LB Agar ve LB Broth Hazırlama .....	29
2.11.6 Kompetan Hücre Hazırlama .....	29
2.11.7 Klonlama .....	30
2.11.8 Çoğaltma Suşuna Transformasyon .....	30
2.11.9 Koloni PCR ve Koloni Tarama .....	30
2.11.10 Plazmit İzolasyonu .....	31
2.11.11 Spektrometre İle Plazmit DNA Miktar Ölçümü.....	31
2.11.12 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu .....	32
2.12 Hücrelerin İndüklenmesi .....	32
2.12.1 IPTG Hazırlama.....	33

2.13	Hücreleri Çöktürme ve Lizis .....	33
2.13.1	Hücreleri Çöktürme .....	33
2.13.2	Protamin Sülfat Hazırlama .....	33
2.13.3	PMSF Hazırlama .....	33
2.13.4	5 mL'lik Lizozim Hazırlama .....	34
2.13.5	Lizis .....	34
2.13.6	Buffer A Hazırlama .....	35
2.13.7	Protein Saflaştırma .....	35
2.13.8	Tampon B Hazırlama.....	36
2.14	SDS Page Jel Elektroforezi ve Western Blot .....	36
2.14.1	SDS Page Jel Elektroforezi.....	36
2.14.1.1	%15'lik Ayırma Jeli Hazırlama .....	36
2.14.1.2	Yığıma Jeli Hazırlama .....	37
2.14.1.3	Yürütme Tamponu Hazırlama .....	38
2.14.1.4	Örnek Hazırlama.....	38
2.14.1.5	Commasie Blue Boyama Tekniği .....	38
2.14.1.6	Gümüş Boyama Tekniği .....	39
2.14.2	Western Blot .....	40
2.14.2.1	10X Koşurma Tamponu Hazırlama.....	41
2.14.2.2	%10'luk SDS Hazırlama.....	41
2.14.2.3	Transfer Tamponu Hazırlama .....	41
2.14.2.4	10X TBS Hazırlama.....	42
2.14.2.5	1X TBS Hazırlama.....	42
2.14.2.6	Blocking Tampon Hazırlama.....	42
2.14.2.7	Anti-body Hazırlama .....	42
2.14.2.8	ECL Hazırlama .....	42
<b>3.</b>	<b>BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1	Biyoinformatik Analiz .....	43
3.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	49
3.3	Polimorfizm Analizi.....	50
3.4	<i>OeACBP</i> 'nin Dokusal Ekspresyon Analizi.....	52
3.5	Klonlama ve Transformasyon .....	53
3.5.1	DH10B'ye Transformasyon .....	53
3.5.2	Koloni PCR .....	54
3.5.1	BL21'e Transformasyon.....	55
3.5.2	Hücrelerin Çöktürülmesi ve Lizis.....	56
3.6	SDS PAGE Jel Elektroforezi .....	57
3.7	Western Blot.....	58
<b>4.</b>	<b>SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>60</b>
<b>5.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>EKLER.....</b>	<b>79</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 1.1: ACBP'nin 3 boyutlu yapısının üstten ve yandan görünümü.....	3
Şekil 1.2: Farklı türlerdeki ACBP'nin aminoasit dizilerinin hizalanması.....	4
Şekil 1.3: Sınıf I – IV arasındaki ACBP'lerinin domain yapısı [37, 42].....	6
Şekil 1.4: Bitki yağ asidi biyosentezinde <i>AtACBP</i> 'nin işlevi [89]. ....	10
Şekil 1.5: Lipid metabolizmasındaki uyarımlarda ACBP'nin rolü [13]. ....	11
Şekil 1.6: Uzun zincirli açıl-KoA ester oluşumunda ACBP'nin rolü [81]. ....	13
Şekil 2.1: SDS-PAGE jel elektroforez sistemi [113]. ....	40
Şekil 2.2: Membrana transfer tekniği [113]. ....	41
Şekil 3.1: <i>OeACBP</i> cDNA dizisinin nBLAST analizi. ....	43
Şekil 3.2: <i>OeACBP</i> 'nin açık okuma çerçevesi (ORF).....	43
Şekil 3.3: <i>OeACBP</i> 'nin pBLAST analizi ve ait olduğu gen ailesi. ....	44
Şekil 3.4: <i>OeACBP</i> 'nin nükleotit kompozisyonu.....	44
Şekil 3.5: <i>OeACBP</i> 'nin aminoasit kompozisyonu. ....	45
Şekil 3.6: <i>OeACBP</i> 'nin hidrofobisite profili. ....	45
Şekil 3.7: Cn3D [104] ile <i>Digitalis lanata</i> ACBP'nin tahmini 3 boyutlu yapısı.46	
Şekil 3.8: Swiss model ile <i>OeACBP</i> 'nin tahmini 3 boyutlu yapısı. ....	46
Şekil 3.9: <i>OeACBP</i> 'nin izoelektrik noktası ve molekül ağırlığı. ....	47
Şekil 3.10: <i>OeACBP</i> 'nin hücredeki yeri.....	47
Şekil 3.11: <i>OeACBP</i> 'nin protein özelliği. ....	47
Şekil 3.12: <i>OeACBP</i> 'nin sinyal peptid analizi. ....	48
Şekil 3.13: <i>OeACBP</i> 'nin transmembran domain analizi. ....	49
Şekil 3.14: <i>OeACBP</i> PCR [107] sonucu. ....	50
Şekil 3.15: Polimorfizm PCR [65] sonucu.....	51
Şekil 3.16: Dizi analizinden gelen güvenilir bir kramotogram. ....	51
Şekil 3.17: Dizi analizinden gelen güvenilir olmayan bir kramotogram. ....	51
Şekil 3.18: Zeytin çeşitlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması. ....	52
Şekil 3.19: Filogenetik ağaç. ....	52
Şekil 3.20: <i>OeACBP</i> 'nin GAPDH'e oranla zeytin organlarındaki ifadesi. ....	53
Şekil 3.21: <i>OeACBP</i> 'nin süperoksit dizmutaza oranla ifadesi. ....	53
Şekil 3.22: DH10B'ye transformasyon sonucu. ....	54
Şekil 3.23: Koloni PCR jel görüntüsü. ....	54
Şekil 3.24: Plazmit izolasyonu için hazırlanan önkültür. ....	55
Şekil 3.25: BL21'e transformasyon sonucu. ....	55
Şekil 3.26: Protein izolasyonu için elde edilen önkültür.....	56
Şekil 3.27: Protein sentezi için hazırlanan kültür.....	56
Şekil 3.28: Çöktürülmüş hücreler.....	57
Şekil 3.29: Commasie Blue ile yapılan SDS PAGE jel görüntüsü. ....	58
Şekil 3.30: Gümüş boyama ile yapılan SDS PAGE jel görüntüsü. ....	58
Şekil 3.31: Western Blot görüntüsü ve kullanılan marker. ....	59

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 1.1:</b> 2006/2007 hasat sezonu zeytinyağı üretimi [7].....	2
<b>Tablo 1.2:</b> 2006/2007 hasat sezonu sofralık zeytin üretimi [7] .....	2
<b>Tablo 1.3:</b> Hücre içi proteomik veri setlerinde <i>Arabidopsis ACBP</i> 'lerinin tanımlanması. ....	8
<b>Tablo 1.4:</b> Çeşitli hücre içi lokalizasyonlarında bitki <i>ACBP</i> 'nin rolü. ....	12
<b>Tablo 2.1:</b> Primerler, nükleotit dizileri ve Tm dereceleri .....	20
<b>Tablo 2.2:</b> PCR koşulları.....	21
<b>Tablo 2.3:</b> Polimorfizm için toplanan zeytin çeşitleri.....	24

## SEMBOL LİSTESİ

<b>ACBP</b>	:	Açıl-KoA Bağlanma Protein
<b>ACP</b>	:	Acyl-carrier-protein (Açıl taşıyıcı protein)
<b>Amp</b>	:	Ampicillin (Ampisilin)
<b>APS</b>	:	Amonyum persülfat
<b>AtACBP</b>	:	<i>Arabidopsis</i> Açıl-KoA bağlanma proteini
<b>BLAST</b>	:	Basic local alignment search tool
<b>bp</b>	:	base pair (baz çifti)
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	:	Kalsiyum klorür
<b>cDNA</b>	:	Complementary DNA (Komplementer DNA)
<b>KoA</b>	:	Coenzyme A (Koenzim A)
<b>Ct</b>	:	Cycle threshold (Döngü eşiği)
<b>DEPC</b>	:	Diethylpirokarbonat
<b>DMSO</b>	:	Dimetilsülfoksit
<b>DNA</b>	:	Deoksiribonükleik asit
<b>dNTP</b>	:	Dinükleotit trifosfat
<b>EDTA</b>	:	Etilendiamintetraasetik asit
<b>ELP</b>	:	Endozepine- like peptide
<b>EtBr</b>	:	Etüdyum bromür
<b>EtOH</b>	:	Etanol
<b>FABP</b>	:	Fatty acid binding protein
<b>GAPDH</b>	:	Gliserol-3fosfat dehidrogenaz
<b>gDNA</b>	:	Genomik DNA
<b>IPTG</b>	:	İsopropil $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosid
<b>kDa</b>	:	Kilo Dalton
<b>LB</b>	:	Luria-Bertani
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	:	Magnezyum klorür
<b>MnCl<sub>2</sub></b>	:	Mangan klorür
<b>NaAC</b>	:	Sodyum Asetat
<b>nBLAST</b>	:	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
<b>NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub></b>	:	Amonyum sülfat
<b>OeACBP</b>	:	Zeytin Açıl-KoA Bağlanma Proteini
<b>ORF</b>	:	Open reading frame (Açık okuma çerçevesi)
<b>OsACBP</b>	:	Pirinç Açıl-KoA bağlanma proteini
<b>PCR</b>	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PMSF</b>	:	Fenilmetilsüfanil florid
<b>RNA</b>	:	Ribonükleik asit
<b>SDS</b>	:	Sodyum dodesil sülfat
<b>TAE</b>	:	Tris Asetik asit EDTA
<b>TAG</b>	:	Triaçilgliserol
<b>TBS</b>	:	Tris-buffered saline (Tris tamponlu tuz)
<b>TEMED</b>	:	Tetrametilendiamin
<b>Tm</b>	:	Melting temperature (Erime sıcaklığı)
<b>UV</b>	:	Ultra-viyole

## ÖNSÖZ

Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji laboratuvarlarında yüksek lisans tezi olarak hazırlamış olduğum bu çalışmanın yürütücüsü ve danışmanım, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a

Ders döneminde bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen Prof. Dr. Gülendım TÜMEN'e,

Laboratuvar ekipman desteği ve ders dönemindeki katkıları nedeniyle başta Prof. Dr. Feray KÖÇKAR, Prof. Dr. Selma SİNAN ve Doç. Dr. Fatih COŞKUN olmak üzere laboratuvar üyelerine değerli yüksek lisans arkadaşlarım Gamze GÜNGÖR, Fatma POYRAZLI, Sinem GÜLTEKİN, Niyazi CÖMERT, Nil OCAK, Özge TOK ve Veysel UZUN'a,

Deneyimin son aşamalarında tüm engin bilgi, tecrübe ve yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümü Fizikokimya Anabilimdalı Araştırma Görevlisi Dr. Pınar TURAN BEYLİ'ye,

Çalışmalarım boyunca bilgi, emek ve ilgileriyle çalışmalarına katkıda bulunan Adıyaman Üniversitesi Eczacılık Fakültesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Görkem DENİZ SÖNMEZ'e,

İyi günümde kötü günümde her daim yanımda olan 7 yıllık kadim dostum, ev ve yüksek lisans arkadaşım Sümeyye ALTUNOK'a,

Desteklerinden dolayı çalışma arkadaşlarım doktora öğrencisi Tuğba AKYÜZ, Eda BAKİ, Ali Can KAYA, Suna BOZKURT ve Özgün SALI'ya,

Toplanan zeytin örneklerinin muhafazası ve izolasyon işlemi için kullanılan sıvı azotun temin edildiği Balıkesir İli Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği'ne,

Yüksek lisans eğitimimin son döneminde tanıştığım ve tanıştığım andan itibaren hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım Ehed Muhammed AYMAZ'a,

Maddi manevi hiçbir desteği esirgemedi beni bu yaşıma kadar getiren canım ailem Arif BAŞ ve Seher BAŞ'a en kalbi teşekkürlerimi sunuyorum.

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.)

Uzun ömürlü, her dem yeşil, çok sayıda ortama uyum sağlayan zeytinin eski zamanlardan beri var olduğu bilinmekte [1] ve Asya'dan Akdeniz havzası ülkelerine üç yoldan yayıldığı düşünülmektedir: birincisi İran üzerinden Pakistan ve Çin'e, ikincisi Anadolu boyunca Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya, üçüncüsü ise; Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a doğrudur [2].

Zeytin yeni dal ve kök gelişimi yapabilen, tomurcuklar bakımından zengin gövde tabanında, eski gövdenin yerini alabilen ve yeniden (2 yıl sonra) gövdenin tabanında oluşturulabilen, yumru bulunması nedeniyle uzun ömürlüdür [1]. Zeytinde genetik gelişim; kendine uyumsuzlukla birlikte, uzun yavru aşaması (10-15 yıl) nedeniyle son derece zordur [1].

İki varyetesi (*Olea europaea* L. var. *europaea* ve *Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr.) Türkiye'de yetişmekte olan *Olea europaea* L. dünyada 67 türü bulunan *Oleaceae* familyasına aittir [3] ve 46 kromozomlu genomu ile çok sayıda çeşidi olduğu bilinir [4].

Zeytin çeşitleri başta yağ (%93) olmak üzere sofralık zeytin olarak da yetiştirilmektedir. Zeytinyağı; soya, fıstık, ayçiçeği, kolza ve pamuk yağı üretiminin önünde olup, dünyada sıvı bitkisel yağ üretiminde 6. sırada gelmektedir [5]. Zeytin yetiştiriciliği birçok ülke ekonomisinde önemli bir yer tutmaktadır. Zeytin üretiminin dünya çapında dağılımı: Okyanusya %0.03, Kuzey ve Orta Amerika %0.86, Güney Amerika %1.70, Asya %12.68, Afrika %15.60, Avrupa %69.13 şeklindedir. Bu üretimin %97'si Akdeniz Havzasına ait ülkelerce sağlanmıştır [6].

**Tablo 1.1:** 2006/2007 hasat sezonu zeytinyağı üretimi [7].

Ülke	Miktar (Bin Ton)	Pay %
Suriye	154	5.4
Türkiye	166	5.8
Tunus	170	5.9
Yunanistan	370	12.9
İtalya	603	21.1
İspanya	1.109	38.8
AB toplamı	2.142	74.9
Dünya toplamı	2.860	100

**Tablo 1.2:** 2006/2007 hasat sezonu sofralık zeytin üretimi [7].

Ülke	Miktar (Bin Ton)	Pay %
Fas	90	4.9
Yunanistan	108	5.9
Suriye	200	10.9
Mısır	210	11.5
Türkiye	260	14.3
İspanya	501	27.5
AB toplamı	707	38.8
Dünya toplamı	1,823	100

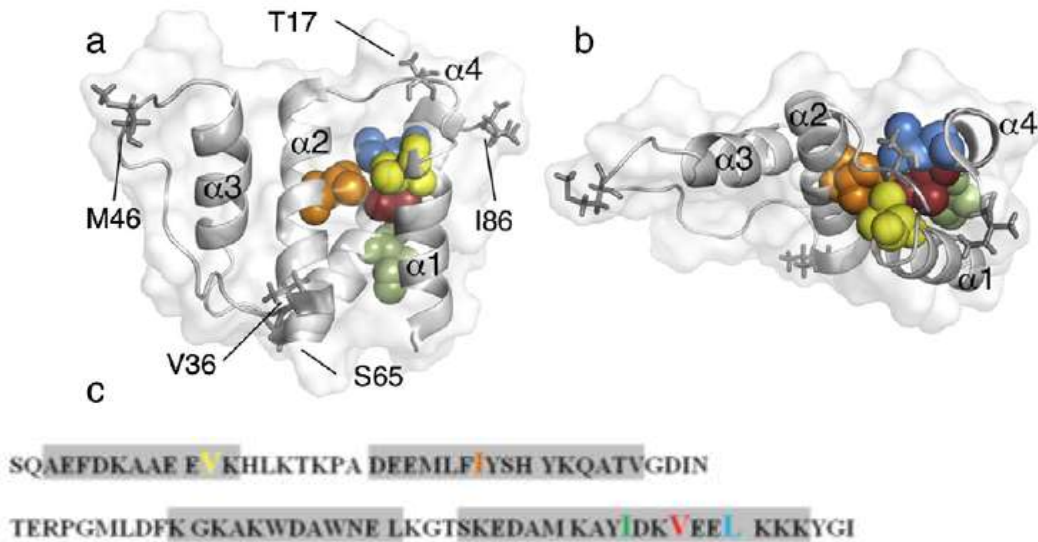
Türkiye’de çoğu bölgeye özel iyi bilinen birçok zeytin çeşidi mevcuttur. Doğu Akdeniz’de özellikle Hatay’da; Saurani, Halhalı, Sayfi, Karamani, Elmacık, Hasebi; Güneydoğu Anadolu’da; Eğri Burun, Halhalı, Kalembezi, Kan Çelebi, Kilis Yağlık, Nizip Yağlık, Yağ Çelebi, Ege’de; Ayvalık, Çakır, Çekişte, Çilli, Domat, Edincik su, Erkence, İzmir sofralık, Kiraz, Memecik, Memeli, Uslu; Marmara’da; Çelebi, Gemlik, Karamürsel su, Samanlı; Akdeniz’de; Büyük Topak Ulak, Sarı Hasebi, Sarı Ulak, Tavşan Yüreği; ve Karadeniz’de Samsun Tuzlamalık, Trabzon Yağlık, Hastos, Butko, Otur çeşitleri yetiştirilmektedir [8].

## 1.2 Açıl-KoA Bağlanma Proteini (ACBP)

### 1.2.1 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin (ACBP) Genel Özellikleri

İlk kez *Saccharomyces cerevisiae* maya modelinde çalışılan ACBP [9], moleküler büyüklüğü 10.4'ten (92 aminoasit) 73.1 kDa'a (668 aminoasit) kadar değişen [10], geniş dağılımlı bir proteindir [11]. Bu protein memelilerde, mayada, *Drosophila*'da, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa*'da karakterize edilmiştir [10]. Şu ana kadar bitkide plazma membranında, veziküllerde, endoplazmik retikulumda, golgide, sitoplazmada, çekirdek zarı ve peroksizomlarda tespit edilmiştir [12].

Dört  $\alpha$ -heliks yapı şeklinde katlanmıştır [13-15]. Düşük pH'da bu dört helikal segmentten  $\alpha 2$  ve  $\alpha 4$ , geçici sarmal yapının oluşumuna karşılık gelen ikincil kimyasal kaymalar gösterir [16, 17]. Bağlanma bölgesi, ACBP'nin yüzeyi üzerindeki hidrofobik oluk içinde yer alır [18]. Açıl zinciri; bağlanma cebine gömülmüş ve bağlayıcı boşluğun kenarında bulunan özel bir aminoasit ile etkileşerek, bağlanma cebi üzerinde bir kapak oluşturan açıl-KoA baş grubu tarafından dışarıdaki sulu ortamdan tamamen korunmuştur [18].



Şekil 1.1: ACBP'nin 3 boyutlu yapısının üstten ve yandan görünümü.

Sarı renk ile hidrofobik merkez ve c'de  $\alpha$  yapıları kutucuk içinde gösterilmiştir [19].

Ökaryotik *ACBP* ailesinde bilinen yaklaşık 24 dizi karşılaştırılmıştır [20]. Bunlardan %25'inin, bütün dizilerin %90'sında aynı olan (korunmuş) 26 dizi pozisyonunun bir alt grubunu içerdiği bulunmuştur [18]. Bu alt gruplar, açıl-KoA esterlerinin çoğunlukla hidrofobik ya da elektrostatik bağlanmasıyla ilgilidir [18].

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
Human 2	MP	AFAEFEKAAEVRHLKTKPSDEEMLFYGHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----
Human 1	MNGDMLLPPASANPGTGEAEFEKAAEVRHLKTKPSDEEMLFYGHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Rat	MSQAEFDKAAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHFKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Mouse	MSQAEFDKAAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHFKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Bovine	ASQAEFDKAAEVRHLKTKPADEEMLFYSHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Pig	MSQAEFEKAAEVRKRLTKPADEEMLFYSHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Dog	SQAEFDKAAEVRKRLTKPADEEMLFYSHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Duck	AELAPQKAAEVRKLSQPSDQEMLDVYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Chicken	SEAPQKAAEVRKLSQPSDQEMLDVYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Frog	MSQAEFDKAAEVRKLSQPSDQEMLDVYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Manduca	MSLQEQDQAAENVKLSLPSDNDLLELYALFKQASAGDADPANRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Yeast	TSQLFEKAAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHYKQATVGDIN	TERPGMLDFTGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
B. napus	NGLKEEFEEHAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
A. thaliana	NGLKEEFEEHAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Cotton	NGLKEEFEEHAEVRKRLTKPTDEEMLFYSHYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----
ELP	MSQTEFEMACASLKLKGFVSDQERLLVVSFYKQATVGDVN	TDPRGLDLAGKARNDANWELAGTSKEDAMRAYINKVEELKKYGI	----	----	----	----	----	----	----	----	----

Şekil 1.2: Farklı türlerdeki *ACBP*'nin aminoasit dizilerinin hizalanması.

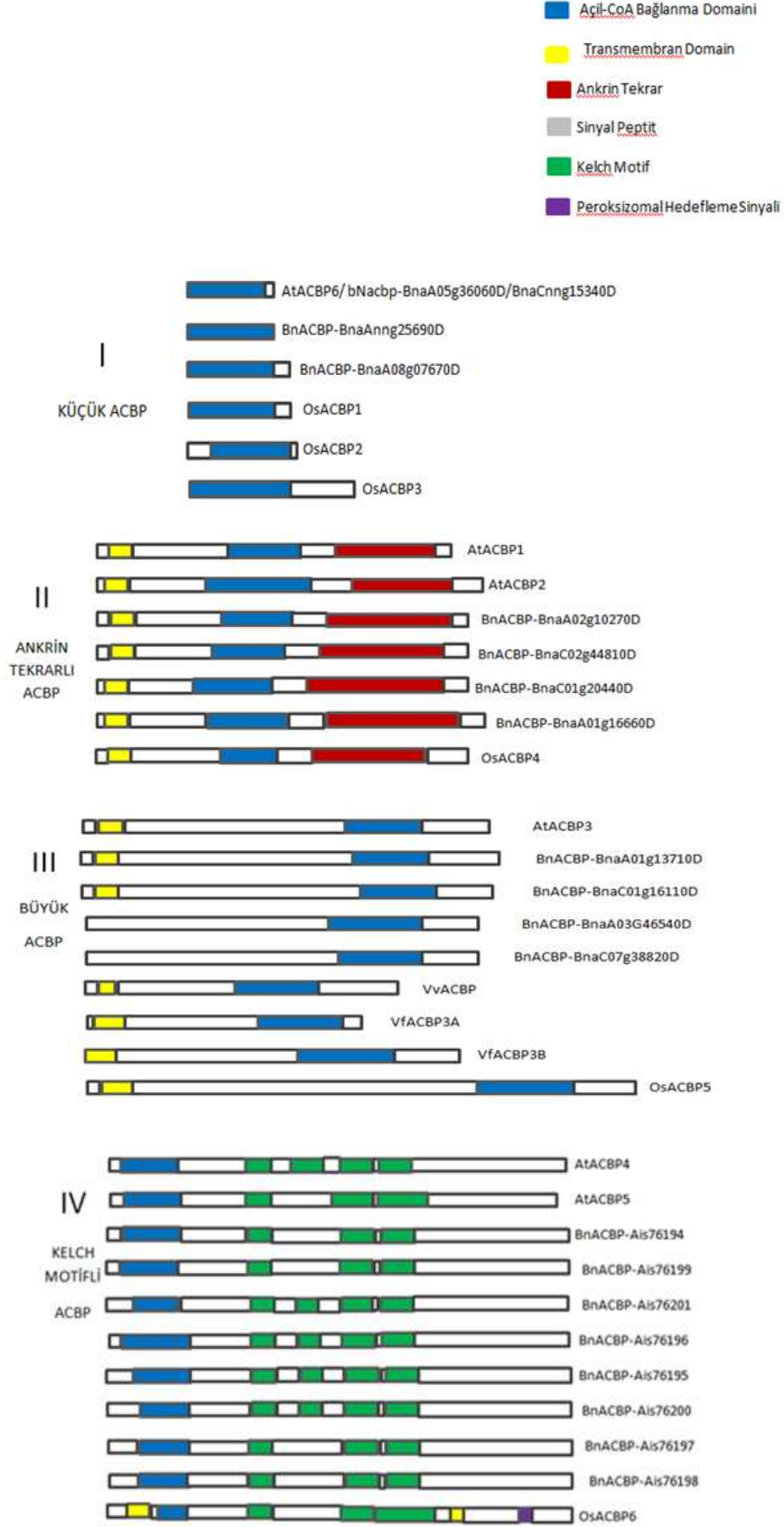
Human-1 [21], human-2 [22], rat [23], mouse [24], bovine [25], pig [26], dog, tortoise, duck, chicken, *Arabidopsis thaliana* [11], frog [27], *Manduca sexta* [11], *Drosophila melanogaster* [28], yeast-1, yeast-2 [29], *Brassica napus* [30], cotton [31], endozepine-like peptide (ELP) [32]. Arya, R. ve ark. edinlenerek hizalama yapılmıştır.

### 1.2.2 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin Sınıflandırılması

*ACBP*, memelilerde en az 4 grupta tanımlanabilir [33]. İlk grup, sıgır karaciğerinden izole edilmiş, genel olarak *ACBP* temel izoformu olarak ifade edilen *l-ACBP*'dir. Sistein içermez ve 86-92 aminoasit dizisinden oluşur. Maya dahil olmak üzere bütün ökaryotik türlerde test edilen ve hemen hemen her dokuda ifade edilen bu temel izoform, muhtemelen tüm diğer daha özel *ACBP* izoformlarının atasıdır [34]. Yapısında dört  $\alpha$ -heliks bulunur [34]. İkinci grup, testis özel izoformu (*t-ACBP*) denilen endozepin benzeri peptit (*ELP*)dir. Üç sistein içeren *t-ACBP* üç farklı türden izole edilmiştir [32, 35]. Tahmini olarak üçüncü grup, 43. pozisyonda tek bir sistein içeren kurbağa beyni ve ördek gen dizisinden çıkarılmış olan *ACBP*'nin beyne özel izoformu, *b-ACBP*'dir. *ACBP*'nin dördüncü grubu, 533 ve daha uzun aminoasit

dizisinden oluşan gruptur. Bu uzun dizililerin bazılarının, membrana bağlı *ACBP* domain proteinleri oldukları öne sürülmüş ve sistein içerirler [33].

Bitki *ACBP*'i dört sınıf ile tanımlanmıştır: Sınıf I; küçük *ACBP*'leri, Sınıf II; ANK-*ACBP*'leri, Sınıf III; büyük *ACBP*'leri ve Sınıf IV; Kelch-*ACBP*'leri [36]. Hemen hemen her bitki türünde bulunan Sınıf I, ortalama 100 aminoasitten oluşur [37]. Bu sınıf, büyüklük ve yapı olarak ilk kez karakterize edilmiş memeli *ACBP*'lerine çok benzerdir. Sınıf II ve IV, *ACBP*'lerine diğer ortak proteinlerle etkileşim olanağı sağlayan, C-terminali ankyrin tekrarları ve kelch motifleri içeren çoklu domain proteinlerdir [38-41]. Belli bir fonksiyon ile ilişkili oldukları öne sürülen bu yarı korunmuş bölgeler diğer alt gruplarda bulunmaz [36]. Sınıf III; çoğunlukla ya transmembran domainin ya da bir sinyal peptidin eşlik ettiği hücre içi lokalizasyonu belirleyen N-terminal ve C-terminal ACB domaini içerir ve de yaklaşık 450 aminoasitten oluşur [36]. Sınıf II, III ve IV'ün proteinleri Sınıf I'dekilerden yaklaşık altı kat daha büyüktür [36]. Orta uzunluktaki, sadece yosun, açık tohumlu ve yeşil alglerde bulunan *ACBP* grubu, Sınıf 0 olarak katagorize edilmiştir [36]. Sınıf 0 yapısal olarak yüksek bitkilerdeki Sınıf III *ACBP*'lerine benzerlik gösterir. Fakat protein uzunluğu (*O. lucimarinus*'da 109 - 208, *P. patens*'de 141 ve *P. sitchensis*'de 163 aminoasit ) Sınıf III'ten (215–682 aminoasit) daha kısadır [36].



Şekil 1.3: Sınıf I – IV arasındaki ACBP'lerinin domain yapısı [37, 42].

Burton, M. ve ark. esinlenerek çizilmiştir.

Monokotil türlerin bir modeli olan pirinçte (*Oryza sativa*) *ACBP* altı sınıfa ayrılmıştır. *OsACBP1* - *OsACBP6* arasında belirlenen pirinç *ACBP*'i altı gen (*Os08g06550*, *Os06g02490*, *Os03g37960*, *Os04g58550*, *Os03g14000* ve *Os03g61930*) tarafından kodlanır [36]. *OsACBP1* ve *OsACBP3*, 91-155 aminoasitten oluşan küçük proteinlerken, *OsACBP4* (336 aminoasit), *OsACBP5* (569 aminoasit) ve *OsACBP6* (655 aminoasit) çok büyük proteinlerdir [36]. *OsACBP5* (C-terminal *ACB* domaini içerir) hariç her birinde *ACB* domaini N-terminal segmentinde bulunur [36]. Filogenetik ağaca göre *OsACBP1* ve *OsACBP3* Sınıf I'e aittir ama 63 aminoasitlik C-terminal uzantısı içeren *OsACBP3* (*OsACBP1* ile %95 oranında benzerdir) *OsACBP1*'den daha uzundur [36]. Ankrin tekrarlarına sahip *OsACBP4*'ün Sınıf II'ye, *OsACBP5*'in Sınıf III'e ve kelch motif içeren *OsACBP6*'nın ise Sınıf IV'e ait olduğu belirlenmiştir [36].

İki çeneklilerden *Brassica napus* (kanola) *ACBP*'i (*BnACBP*), Genoscope veritabanından (<http://www.genoscope.cns.fr/brassicanapus/>) elde edilen verilere göre; küçük, büyük, ankrin tekrarlı ve kelch motifli olmak üzere dört ana grup altında toplanmaktadır [43]. Bu ana gruplar da kendi içlerinde; küçük *BnACBP*'leri, dört (*BnaAnng25690D*, *BnaA05g36060D*, *BnaA08g07670D* ve *BnaCnng15340D*); ankrin tekrarlı *BnACBP*'leri, üç (*BnaA01g16660D*, *BnaC02g44810D* ve *BnaC01g20440D*); büyük *BnACBP*'leri, dört (*BnaA01g13710D*, *BnaA03g46540D*, *BnaC01g16110D* ve *BnaC07g38820D*) ve kelch motifli *BnACBP*'leri ise altı (*Ais76194*, *Ais76195*, *Ais76196*, *Ais76199*, *Ais76200* ve *Ais76201*) gruba ayrılmıştır [43]. Küçük *BnACBP*'lerinin moleküler ağırlığı, 10.03 kDa (*BnaAnng25690D*) ile 10.185 kDa (*BnaA08g07670D*), ankrin tekrarlı *BnACBP*'lerinin moleküler ağırlığı, 37.204 kDa (*BnaC02g44810D*) ile 40.119 kDa (*BnaA01g16660D*), büyük *BnACBP*'lerinin moleküler ağırlığı, 39.285 kDa (*BnaC07g38820D*) ile 41.272 kDa (*BnaA01g13710D*) ve kelch motifli *BnACBP*'lerinin moleküler ağırlığı, 72.696 kDa (*Ais76201*) ile 73,197 kDa (*Ais76200*) arasında değişmektedir [44].

Genom analizleri için model organizma olan *Arabidopsis thaliana*'da *ACBP* gen ailesi altı üyeden oluşmaktadır. Bu *Arabidopsis ACBP*'leri (*AtACBP1* - *AtACBP6*) 10.4 - 73.1 kDa arasında moleküler ağırlığa sahiptir ve açıl-KoA esterleri için farklı afiniteler gösterir [45]. Ayrıca bitki lipid metabolizmasında farklı rollere

sahip oldukları düşünülmektedir [45]. *AtACBP1* ve *AtACBP2* zara bağlı ve *AtACBP3* hücre dışı hedefli bir protein iken; *AtACBP4*, *AtACBP5* ve *AtACBP6* hücre içinde sitoplazma lokalizasyonlu proteinlerdir [45]. *AtACBP1* ve *AtACBP2* Sınıf II, *AtACBP3* Sınıf III, *AtACBP4* ve *AtACBP5* Sınıf IV, *AtACBP6* ise Sınıf I üyesidir [37, 42].

**Tablo 1.3:** Hücre içi proteomik veri setlerinde *AtACBP*'lerinin tanımlanması.

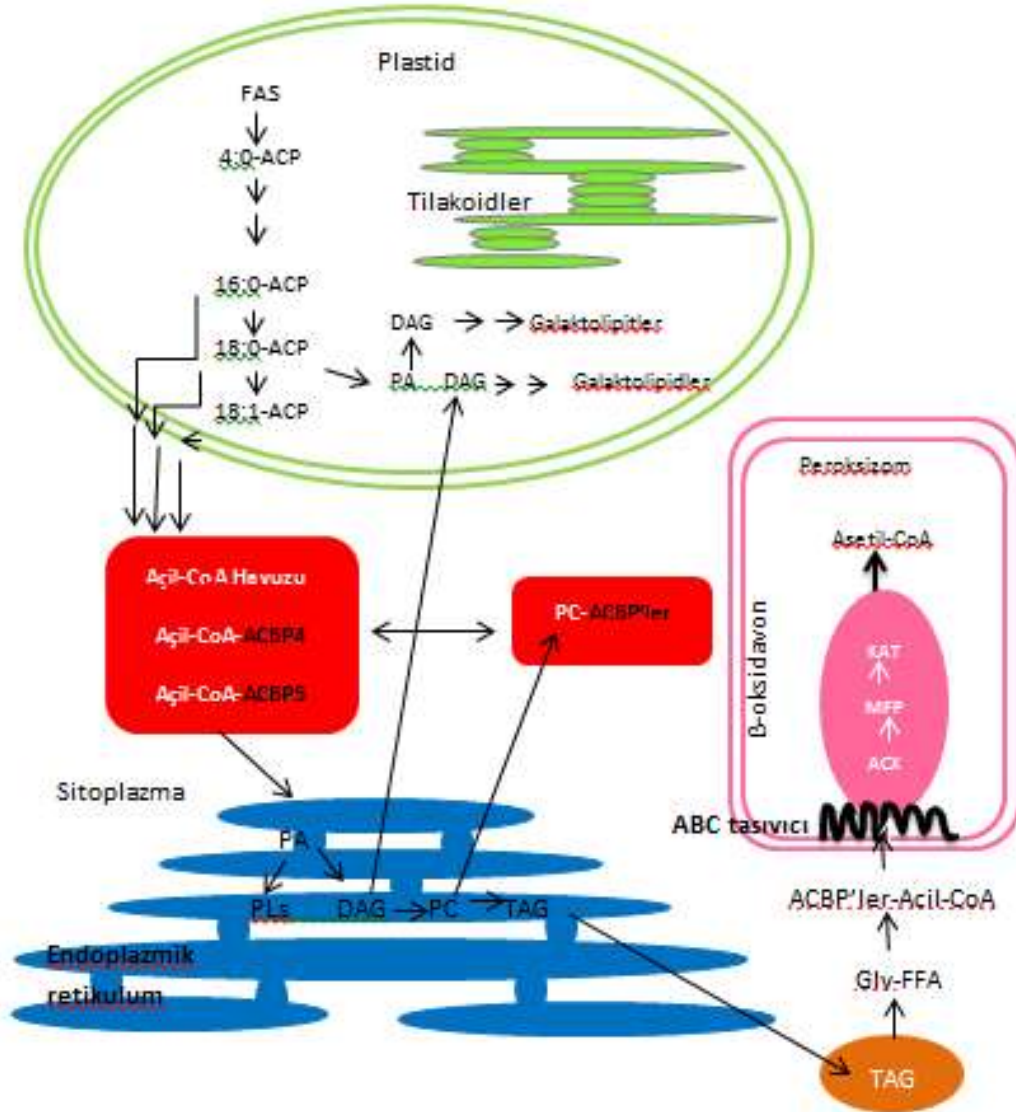
Veriler SUBA3 (<http://suba3.plantenergy.uwa.edu.au/>) [46] ve PPDB (<http://ppdb.tc.cornell.edu/>) [47] veri tabanlarından elde edildi.

Protein (Sınıf)	Belirlenmiş yeri	Hücre içi proteomlarda tanımlanmış yeri	Protein örnekleri	Protein sayıları	Protein yüzdeleri	Referans
<i>AtACBP2</i> (II)	Endomembran	Glioksizom	Solmuş kotiledonlardan izole edilmiş glioksizomal protein parçası	19	14,0	[48]
<i>AtACBP4</i> (IV)	Sitoplazma, çekirdek periferi	Sitoplazma	Hücre süspansiyonundan izole edilmiş sitoplazmik protein parçası	1071	4,6	[49]
		Çekirdek	Hücre süspansiyonundan izole edilmiş çekirdek parçası	345	4,8	[50]
<i>AtACBP6</i> (I)	Sitoplazma	Sitoplazma	Hücre süspansiyonundan izole edilmiş sitoplazmik protein parçası	1071	15,2	[49]
		Plazma membranı	Hücre süspansiyonundan izole edilmiş plazma membranı parçası	1168	13,0	[51]

### **1.2.3 Açıl-KoA Bağlanma Proteininin Fonksiyonel Özellikleri**

#### **1.2.3.1 Yağ Asiti Biyosentezindeki Rolü**

Yağ asidi bağlanma proteinlerinin (*FABP*) açil-KoA esterlerine bağlandığı gözlemlendiğinden beri [52, 53], *FABP*'lerinin uzun zincirli açil-KoA esterlerinin taşınımı ve metabolizmasında önemli bir rol oynadığı ileri sürülmüştür [54]. Ancak, yeni sitoplazmik yüksek afiniteli *ACBP*'nin tanımlanması [55, 56]; sinyal iletimi ve gen regülasyonunda ikinci bir haberci olarak görev alması ve uzun zincirli açil-KoA esterlerinin taşınımı ve metabolizmasının düzenlenmesindeki rolü yeni bir anlayış ortaya çıkarmıştır.

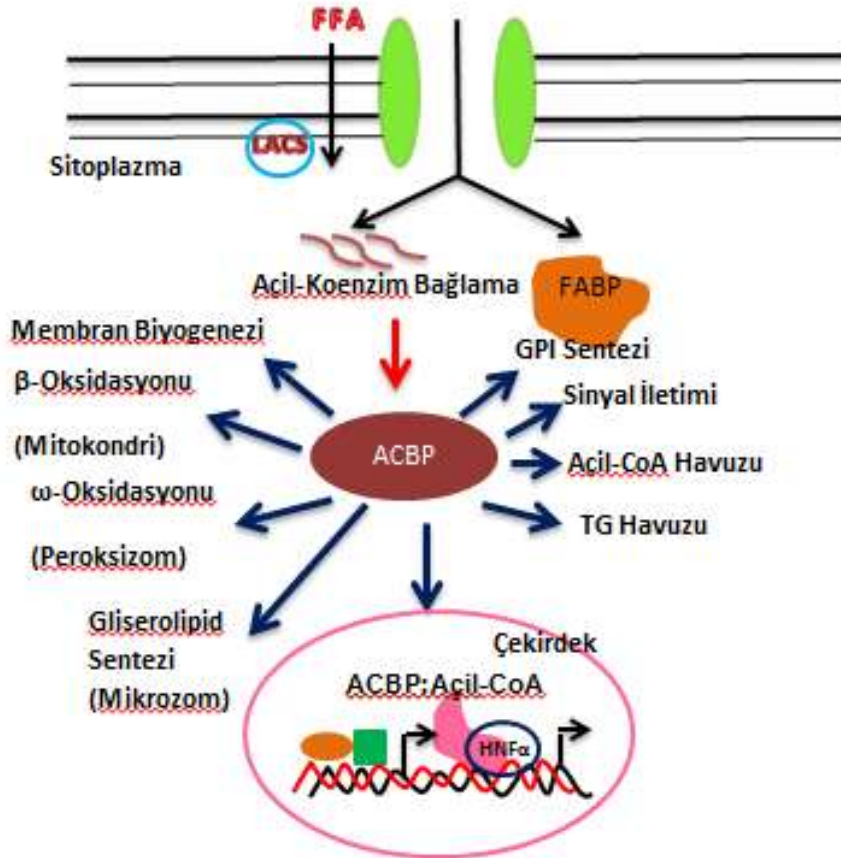


Şekil 1.4: Bitki yağ asidi biyosentezinde *AtACBP*'nin işlevi [89].

Xiao, S. ve ark. esinlenerek çizilmiştir.

1960 ve 70'lerde birçok çığır açan biyokimyasal çalışma, yağ asidi biyosentezi, lipid desatürasyonu (doymamış bağ oluşturma/doygunsuzlaştırma) ve bitki lipid biyokimyasının kurucu babası olarak kabul edilen Paul Stumpf'un vizyonu ile önemli ölçüde ileri sürülen triaçilgliserolün (TAG) sentezi gibi temel süreçleri denemek ve daha iyi anlamak için gerçekleştirilmiştir [57]. Bu çalışmalarda açil-CoA substratları; mikrozomal reaksiyonlar için, açil taşıyıcı protein (*ACP*) bağlantılı substratlar ise plastidsel yağ asidi sentezinde kullanılmıştır [58]. Böylece bu çalışmalar bitki lipid metabolizmasının bir çift yöllü sistem olarak çalıştığını ortaya koymuştur [57]. Fosfolipid ve TAG gibi nötral lipidlerin sentezi için substratın açil-

KoA formlarının gerekli olduğu gösterilmiştir [57]. Somerville ve Browse tarafından kurulmuş ve sonradan ortaya çıkan öncü moleküler genetik çalışmalarda, bitki lipid metabolizması için model organizma olarak *Arabidopsis* kullanılmıştır [59-60]. Özellikle *Arabidopsis*'in ayrı lipid tiplerine benzer değişiklikler yapılan yakından ilişkili enzimlerin tanımlanmasına izin verdiği, yağ asidi değişimlerinin iki bölmeli temelini anlamak için bir moleküler temel sağladığı, ayrıca *Arabidopsis*'te değiştirilmiş farklı yağ ve yağ asidinin desatürasyonunun yapıldığı kanıtlanmıştır [61]. Koordineli yağ asidi iletimi ve ekstraplastidisel gliserolipidlerin sentezi için gereklidir [58].



Şekil 1.5: Lipid metabolizmasındaki uyarımlarda ACBP'nin rolü [13].

Kragelund, B.B. ve ark. esinlenerek çizilmiştir.

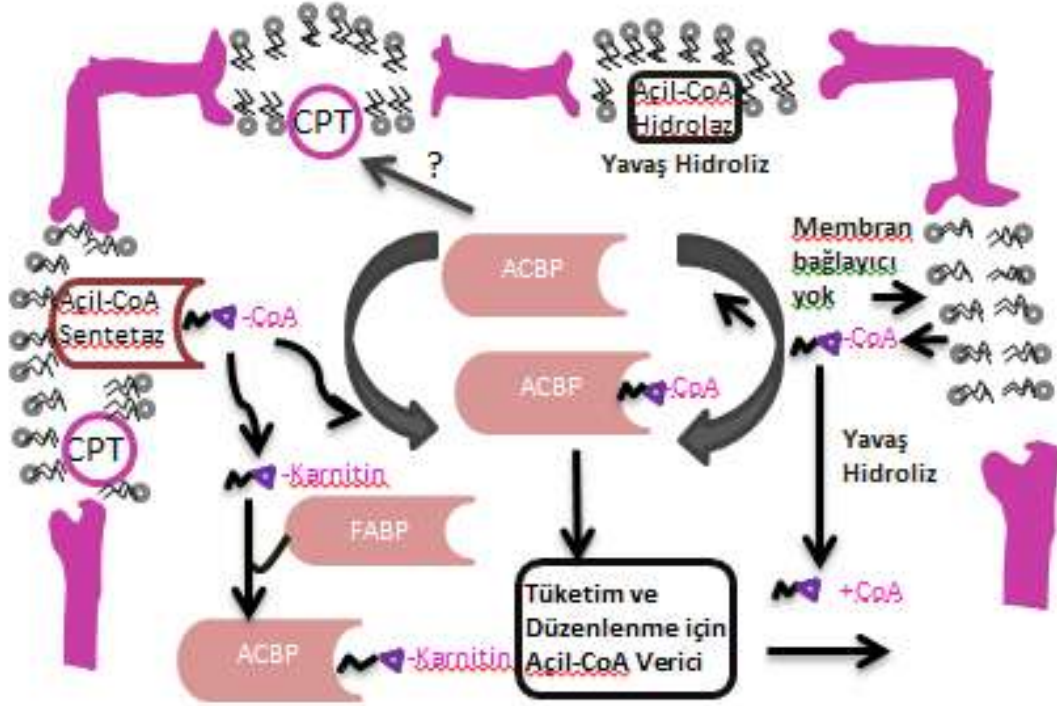
İn vitro bağlanma deneylerinden elde edilen sonuçlar, ACBP'nin gerekli biyolojik in vivo fonksiyonlara sahip olduğunu ve ilgili rekombinant proteinlerin fosfolipidler ve açil-KoA esterlerine karşı farklı bağlanma afinitesi gösterdiği belirtmiştir [10]. Son araştırmalar, *Arabidopsis* ACBP'lerinin aşırı ifadesine

nakavt/baskılama yapılarak, patojen direnci ve donma toleransı, oksidatif stres, ağır metal direnci gibi bitki streslerinin yanı sıra yaprak yaşlanması ve erken embriyogenez de dahil bitki gelişimini etkileyebileceğini, ayrıca fosfolipid metabolizmasındaki rollerini ortaya koymuştur [10-43-58-62-63].

**Tablo 1.4:** Çeşitli hücre içi lokalizasyonlarında bitki ACBP'nin rolü.

Hücre içi lokalizasyon	Fonksiyon	Protein(Sınıf)	İlişkili olduğu yapılar			Referans
			Protein	Lipit	Diğerleri	
Hücre zarı	Tohum çimlenmesi ve fide gelişimi	<i>AtACBP1</i> (II)	PLD $\alpha$ 1	PA		[64]
	Embriyo gelişimi	<i>AtACBP1</i> (II); <i>AtACBP2</i> (II)		Doymamış PC		[58-65-66]
ER	Ağır metal stres direnci	<i>AtACBP2</i> (II)	AtFP6		Pb <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	[67 -68]
	Kadmiyuma bağlı oksidatif stres direnci	<i>AtACBP2</i> (II)	AtLYSOPI2	lysoPC		[40 - 68]
	Oksijen algılama	<i>AtACBP1</i> (II); <i>AtACBP2</i> (II)	RAP2.12			[69]
	Zarlar arası açıl taşımını	<i>AtACBP1</i> (II)				[65]
	Hipoksik stres direnci	<i>AtACBP3</i> (III)		VLC açıl-KoA		[70 - 71]
	Kütikül oluşumu	<i>AtACBP1</i> (II); <i>AtACBP3</i> (III)		VLC açıl-KoA		[72]
Ekstraselüler boşluk	Yaprak yaşlanması	<i>AtACBP3</i> (III)		PE		[73]
	Tohum kabuğu oluşumu	<i>AtACBP1</i> (II)				[65]
	Savunma yanıtı	<i>AtACBP3</i> (III); <i>VvACBP</i> (III)		Araçid onil-KoA		[74 - 75-76]
Çekirdek periferi	Savunma yanıtı	<i>AtACBP4</i> (IV)	AtEBP (RAP2.3) <sup>a</sup>			[41]
Sitoplazma	Açıl düzenlemesi	<i>BnACBP</i> (I)		LC açıl-KoA		[77-78]
	Tohum gelişimi ve çimlenmesi	<i>AtACBP4</i> (IV); <i>AtACBP5</i> (IV); <i>AtACBP6</i> (I)		LC açıl-KoA		[79]
Peroksizom	Yağ asidi $\beta$ -oksidasyonu	<i>OsACBP6</i> (IV)		Linoleoil-KoA		[80]

*ACBP*, uzun zincirli açil-KoA esterlerinin membran bölmelerine ayrılmasını ve hidrolizini önlemek için açil-KoA sentetaz aktivitesini uyarır ve böylece özel amaçlar için kullanılabilir uzun zincirli açil-KoA kaynağı oluşturur.



Şekil 1.6: Uzun zincirli açil-KoA ester oluşumunda *ACBP*'nin rolü [81].

Leung, K.C. ve ark. esinlenerek çizilmiştir.

### 1.2.3.2 Bitki Embriyo Gelişimindeki Rolü

İmmunogold etiketleme analizi ve microarray verileri *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin tohum gelişimi ve olgunlaşması sırasında çeşitli aşamalarda embriyo hücrelerinde biriktiğini ortaya koymuştur. [65-66]. *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin embriyo gelişimindeki biyolojik fonksiyonları, *acbp1* ve *acbp2* T-DNA insersiyonal mutantları kullanılarak ters genetik ile incelenmiştir [66]. Sonuçlar *AtACBP1* ya da *AtACBP2* bozulduğu zaman morfolojik farklılıkların (embriyo gelişimi de dahil) belirgin olmadığını göstermiştir [66]. *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin güçlü ve aşırı ifadesi (*acbp1* mutantında *AtACBP2* ifadesinin ve *acbp2* mutantında *AtACBP1* ifadesinin artışı) tohum gelişimi sırasında bir genin eksilmesine sebep olur [66]. Buna göre *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin *Arabidopsis* embriyogenezi sırasında lipid taşınımında rol oynadıkları öne sürülmüştür [58-66].

### 1.2.3.3 Yaprak Dökülmesindeki Rolü

*Arabidopsis*'in rozet yapraklarında *AtACBP3*'ün ifadesi, karbon açlığı (uzatılmış karanlık şartlar altında) ve dökülme esnasında düşüktür [73-82]. Rekombinant *AtACBP3* doymamış açıl-KoA esterlerinin yanı sıra in vitroda fosfolipidlere (PC, PE) de bağlanır [82-83]. *AtACBP3* ifade seviyesi ve fosfatidiletanolamin (PE) kompozisyonu in vivo da ilişkilendirilmiştir; fosfatidiletanolamin (PE) seviyesi *AtACBP3*-aşırı ifade edicilerinde (*AtACBP3*-OEs) artmışken, RNA parazitsiz transgenik dizileri (*AtACBP3*-KOs) ve *acbp3* mutantında azalmıştır [82]. Bu nedenle, *AtACBP3* PE ile etkileşimi aracılığıyla fosfolipid metabolizmasını etkileyebilir.

*Arabidopsis*'de *AtACBP3*-OEs'de salisilik asit sinyal iletimine bağlı erken yaprak dökülmesi, hızlandırılmış ve geciktirilmiş yaprak dökülmesi fenotipleri görüntülenmiştir [82]. Bunun dışında, *AtACBP3*-OEs ve otofaji yolunda hataya sebep olan *Arabidopsis* mutantları (*atg2*, *atg5*, *atg7*, *atg10* ve *atg18a*) arasında hızlandırılmış dökülmeye bağlı ve açlık (karbon ve nitrojen) kaynaklı yaprak dökülmesinin fenotipinde bir benzerlik kaydedilmiştir [82]. Otofaji yolunda, ubiquitin benzeri protein (ATG8) ve fosfolipidlerden fosfatidiletanolamin (PE) içeren ATG8-PE kompleksi otofagozom oluşumu için gereklidir [84-85]. *AtACBP3*-OE'de otofagozom oluşumu, bir belirteç olarak GFP-ATG8e'nin kullanıldığı çalışmalarda ve monodansilkadaverin (MDC - otofajiyi izlemek için kullanılır) boyamadaki açlık esnasında aksamıştır [82]. Sonuç olarak *AtACBP3* ile PE etkileşim halindedir, ATG8-PE oluşumunu etkiler ve otofaji aracılı yaprak dökülmesini düzenler [82-86].

*Pichia pastoris*, *Dictyostelium discoideum* ve *Saccharomyces cerevisiae*'nın 10kDa'luk *ACBP*'ne benzer olarak *Arabidopsis AtACBP3*'ün hücre dışı lokalizasyonlu olduğu ve diyazepam bağlanma inhibitörü salgılanırken hücre içi yağ asidi metabolizmasının çalıştığı gözlemlenmiştir [87-88]. Bununla birlikte, *AtACBP3*'ün N-terminal yönlendirilmiş sinyal peptit salgılanmasından farklı olarak [82], bu *ACBP*'leri alışılmamış bir salgılama yoluyla hücre dışı boşluğa hedeflenmiştir [87-89]. Ayrıca, bu *ACBP*'lerinin azot açlığı ile salgılanma ve bir araya gelmenin geliştiği esnada otofagozomlar ile ilişkili olduğu bulunmuştur [87-

89]. Bu bulgular, otofaji aracılı yollar ile *ACBP* aracılı yollar arasında evrimsel olarak korunmuş bir etkileşim olduğunu göstermektedir [90].

#### 1.2.3.4 Ağır Metal Direnci ve Oksidatif Stresteki Rolü

Küçük 10 kDa'luk ve *Arabidopsis AtACBP6*'nın homoloğu olan *ACBP* (aynı zamanda DBI;ACBD1 olarak da bilinir) ilk olarak bir insanda karakterize edilmiştir [91-92]. Sadece bir ACB domaininden oluşan *ACBP*, in vivoda  $Pb^{2+}$  toksisitesini düzenleyici ve ağır metal  $Pb^{2+}$  için moleküler hedef olarak tanımlanmıştır [18]. *Arabidopsis AtACBP6*'nın ekspresyonu  $Pb^{2+}$  ile uyarıldığında mRNA herhangi bir indüksiyonunu vermemiştir [63]. Bunun yerine *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin ekspresyonu  $Pb^{2+}$  ile uyarılabilir [63].

İn vitroda tercüme edilmiş *AtACBP1* ve rekombinant *AtACBP1* proteinlerinin dansil aziridin gibi etiketleme boyasının yanı sıra in vitro jel bağlanma denemeleri kullanılarak  $Pb^{2+}$ 'ye bağlandığı ispat edilmiştir [63]. Transgenik *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen *AtACBP1*  $Pb^{2+}$ 'ye 35S promotor karnabahar mozaik virüsünden daha dayanıklıdır [63]. Bunun aksine *acbp1* nakavt mutantlar,  $Pb^{2+}$  içeren büyüme ortamına yabancı tiplerden daha duyarlıdır [63]. Ayrıca, *AtACBP1* aşırı ifade edicileri toprak üzerindeki sürgün dokularında yabancı tipten daha yüksek miktarlarda  $Pb^{2+}$  biriktirir [63]. Bu gözlemler, rekombinant *AtACBP1*'in  $Pb^{2+}$ 'ye in vitroda bağlandığını ve *AtACBP1* aşırı ifade edicilerinin çevreden uzaklaştırılabilir zararlı ağır metaller aracılığıyla uygun maliyetli bir metot olan bitkisel ıslahı için uygunluk gösteren sürgünlerde  $Pb^{2+}$  biriktirdiğini ispatlamaktadır [90].  $Pb^{2+}$  ile bitki ıslahı yapabilen çok fazla bitki proteini tanımlanmamıştır, bu nedenle bu yeteneği ile *AtACBP1* faydalı olabilir [90].

Buna karşılık olarak *AtACBP2*, *AtACBP1* gibi etkili bir şekilde  $Pb^{2+}$ 'ye bağlanmaz [63]. Fakat in vitroda tercüme edilmiş *AtACBP2*  $Cd^{2+}$  ve  $Cu^{2+}$ 'ye bağlanır [67]. Sonuç olarak, *Arabidopsis AtACBP2* aşırı ifade edicileri büyüme ortamında  $Cd^{2+}$ 'ye yabancı tipten daha çok tolere gösterir [67]. Bu özelliği ile yabancı tiplerle karşılaştırıldığında oksidatif stres (hidrojen peroksit) muamelesine daha iyi koruma ile eşlik etmiştir [67]. Rekombinant *AtACBP1* ve *AtACBP2*'nin in vitroda açıl-KoA esterlerine bağlanmaları test edildiği zaman, linoleoil (18:2)-KoA ve linolenoil

(18:3)-KoA'ya bağlandıkları da bulunmuştur [67].Lipid peroksidasyonunda oksidatif stres ve ağır metal sonuçları veren bu gözlemler, fosfolipid membran onarımındaki fonksiyonunu desteklemektedir [63-67].

### 1.2.3.5 Donmaya Karşı Toleranstaki Rolü

Stres ile ilgili olduğu düşünülen *Arabidopsis AtACBP6*'ya karşı çeşitli stres muameleleri, Western Blot ve Northern Blot analizleri ile araştırılmıştır [62]. Bu araştırmaların sonucunda *AtACBP6* mRNA ve proteininin donmaya karşı duyarlı olduğu bulunmuştur [62]. Bir *acbp6* nakavt mutanı kullanılarak yapılan araştırmalar ise, 35S promotor karnabahar mozaik virüsünden elde edilen, *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen ve donmaya yabancıl tipten daha duyarlı olan *AtACBP6*'nın donmaya karşı daha dirençli hale gelmeye başladığını açığa çıkarmıştır [62]. *AtACBP6* aşırı ifade edicilerinin incelenmesi, donma olayının sonrasında fosfolipitlerin fosfatidik aside hidrolizini katalizleyen fosfolipaz Dδ'ya karşılık gelen mRNA'nın uyarıldığını göstermiştir [62-93]. Daha önceki çalışmalarda fosfolipaz Dδ ifadesinin uyarıldığı ve donma esnasında *Arabidopsis*'teki fosfolipaz Dδ aşırı ifadesinde fosfatidik asit biriktiği bildirilmiştir [94]. Bu verilere göre fosfolipitlerin, stres yanıtlarında aracı olarak önemli rol oynadığı anlaşılmış, lipit belirleme analizleri yürütülmüş ve devamında kontrol olarak yabancı tip kullanılarak transgenik *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen *AtACBP6* soğuğa alıştırılmış ortamda donma muamelesine maruz bırakılmıştır [62]. Bu araştırmaların sonucunda transgenik *Arabidopsis*'te aşırı ifade olan fosfolipaz Dδ'da daha önce görülmüş fosfatidik asit seviyeleri, fosfotidilkolindeki modifikasyonlara benzer olan yabancı tip üzerindeki *AtACBP6* aşırı ifade edicilerinde fosfatidik asitin biriktiği ve fosfotidilkolin miktarında bir azalma olduğunu görülmüştür [62-94]. Rekombinant *AtACBP6*'nın fosfotidilkoline bağlandığı aydınlatıldığından beri, bitki fosfolipid metabolizmasında fosfotidilkolinin hücre içi bağlanması ve ileri geri işlenmesinde *AtACBP6*'nın potansiyel bir rolü olduğu kanısına varılmıştır [62-80].

Başka bir *ACBP*'nin (*AtACBP1*) ifadesi donma stresiyle ilişkilendirilmiştir fakat mRNA'sı *AtACBP6*'ninkine hiç benzemez, soğuk muamelesinde aşırı düzenleyici değildir [95]. *AtACBP1* aşırı ifade edicileri donmaya karşı gelişmiş bir

hassasiyet gösterirken *acbp1*'in nakavt mutantları donmaya karşı tolerans tanır [89]. Transgenik *Arabidopsis*'te aşırı ifade edilen *AtACBP1* ve *acbp1* mutantları arasındaki lipid profillerinin karşılaştırılması, fosfatidik asitin aşırı ifade edicilerde arttığını; *acbp1* mutantlarında ise azaldığını ve fosfatidilkolin seviyelerinde tam tersi olduğunu göstermiştir [95]. *AtACBP1* aşırı ifade edicilerinde fosfatidilkolin ve fosfatidik asit değişimleri, donma stresinin negatif düzenleyicisi olan, fosfatidik asit ve fosfatidilkolinin hidrolizini destekleyen, fosfolipaz Dα1 kodlayan mRNA'nın ifadesinin aşırı düzenlenmesiyle ilişkili olduğu bulunmuştur [95,96]. Bununla birlikte, donma toleransını pozitif olarak düzenleyen fosfolipaz Dδ için bir mRNA olduğu [94], *acbp1* mutantlarında arttığı ve *AtACBP1* aşırı ifade edicilerinde azaldığı gözlemlenmiştir [95]. *AtACBP6* aşırı ifade edicilerinde ve *acbp1* mutantında geliştirilmiş donma toleransı, ya fosfolipaz Dδ'nın ifadesinin aşırı düzenlenmesinden ya da fosfolipaz Dα'nın az düzenlenmesinden kaynaklanabilir [62-95].

### 1.2.3.6 Patojen Direncindeki Rolü

AtEBP; ağır metal kadmiyum kaynaklı oksidatif stres, soğuk, kuraklık toleransı, hormon sinyal iletimi ve patojen savunması da dahil olmak üzere biyotik ve abiyotik streslerle ilgili bir bitki transkripsiyon faktörüdür [97]. *Arabidopsis* *AtACBP2* [38] ve *AtACBP4*'ün [41] kelch motifler ve ankrin tekrarları aracılığıyla AtEBP ile etkileşimde oldukları gösterilmiştir. AtEBP ve *AtACBP4*'ün ekspresyonları; fitopatojen *B. cinerea*, etilen ve jasmonat gibi savunma sinyalleri tarafından uyarılmaktadır [89]. Bu nedenle, *AtACBP2* ve *AtACBP4*'ün; AtEBP ile etkileşim yoluyla etilen sinyal iletimi ve/veya bitki savunmasıyla ilgili biyolojik rollere sahip olabilmeleri mümkündür [38-41]. *AtACBP2* ve *AtACBP4*'ün bitki savunması ve gelişiminin düzenlenmesinde yağ asiti türevlerinin sinyallerine ilişkin tahmini rolü olduğu düşünülen fosfolipitlerin [39-66-80-82-98] yanı sıra farklı açıl-KoA esterlerine bağlandıkları tespit edilmiştir [99]. Ayrıca, *AtACBP2*'nin ankrin tekrarları ve *AtACBP4*'ün kelch motifleri, açıl-KoA esterleri bulunduran fakat ACB domainince yoksun enzimler için potansiyel kenetlenme yerleri sağlarlar [89]. Bunların yanı sıra *AtACBP3*, fosfatidiletanolamin bağlanma yeteneği ile ATG8 kararlılığını azaltan, otofagozom oluşumunu düzenleyebilen [34] ve programlanmış

hücre ölümü ile ilişkili olan salisilik asite bağlı bitki doğal bağışıklığıyla ilgili [100] otofaji yoluna katılır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1 Biyoinformatik Analiz

Balıkesir Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında önceden oluşturulmuş olan cDNA klon kütüphanesinden elde edilen "F13F17" isimli cDNA dizisiyle benzerlik gösteren dizileri tespit etmek için öncelikle NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) veri tabanındaki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [101] programının nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi kullanıldı. Sonrasında BioEdit [102] programından Sorted Six-Frame Translation sekmesi ile cDNA dizisinin açık okuma çerçevesi (ORF) belirlendi ve dizinin aminoasit dizisi belirlendi. Belirlenen aminoasit dizisine benzer dizileri elde etmek için BLAST [101] programının pBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool) sekmesi kullanıldı.

Tahmini *OeACBP* dizisinin zeytin taslak genom ve cDNA klon kütüphanesindeki akrabaları ve kopyalarını bulabilmek için CLC Genomics Workbench 7 [103] programı kullanıldı.

Açıl-KoA bağlanma proteininin aktif bölgesini ve bu bölgenin özelliğini tespit etmek için NCBI veri tabanından CDD (Conversed Domain Database) programı ve proteinin tahmini üç boyutlu yapısı ve domain dizilerini belirlemek için Cn3D [104] programı kullanıldı.

*OeACBP* cDNA dizisinin doğruluğunu tespit etmek ve intron analizi yapmak için Ligand Biyoteknoloji ticari firmasından gelen dizileme sonuçları BioEdit [102] programında işlenip, hizalandı.

Tahmini *OeACBP*'nin translasyon sonrası özelliklerini tespit etmek için Expasy ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) [105] web sayfasındaki programlar kullanıldı. SOSUI [106] programı ile genin tahmini hücre içi lokasyonu belirlendi.

## 2.2 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, PCR tüpleri, ependorf tüpleri, beher, erlen gibi cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer tüm malzemeler çalışma öncesinde 121 °C’de 20 dakika 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril edildi.

## 2.3 Primerlerin Dizaynı ve Sulandırılması

PCR [107] deneylerinde kullanılan spesifik primerler (Tablo 2.1) Primer3 Input Version 0.4.0 (bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0) programı kullanılarak tasarlandı. Primerler Macrogen firmasından konsantre halde temin edildi. Temin edilen primerler stok olarak saklamak için üzerinde yazan miktar kadar otoklavlı su ile sulandırıldı. Sulandırılan primerlerden (100 reaksiyon için) 10µL ependorfa alındı üzeri 90 µL saf su ile tamamlanarak PCR’da [107] kullanılmak üzere hazır hale getirildi.

**Tablo 2.1:** Primerler, nükleotit dizileri ve Tm dereceleri

Primerler	Nükleotit Dizileri (5'-3')	Tm Dereceleri
F13F17_F	AATGGCTTTGAAGGAGGAATTTGAAG	60.52
F13F17_R	CAGCATATTCATTGAAAGATGGGTTC	59.08
F13F17_RT_F	TAAGACCTTACCAGAGAGTACTTCCAA	60.11
F13F17_RT_R	CTTAGTGATGTAGTCACTCATTGCTTC	59.81
F13F17_A_F	GGTGATGATGATGACAAGATGGCTTTGAAGGAGGAATTTGA	75.9
F13F17_A_R	GGAGATGGGAAGTCATTATGCTGCTGCTGCTTCCTTCAACT	78.9

## 2.4 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığını ve nükleotit dizisinin doğruluğunu kontrol etmek için PCR [107] yapıldı.

PCR 25 µL’lik total hacimde manuel ve mix (komponentlerin hazır karışımı) olarak iki çeşitte yapıldı. Manuel PCR için; 3µL gDNA, 1 µL F primer, 1 µL R primer, 2.5 µL NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>, 1.5 µL MgCl<sub>2</sub>, 0.5 µL dNTP, 2 µL DMSO, 13 µL dH<sub>2</sub>O ve

0.5 µL Taq DNA polimeraz kullanıldı. Mix PCR için; 2 µL gDNA, 1 µL F primer, 1 µL R primer, 8.5 µL dH<sub>2</sub>O ve 12.5 µL mix (OneTaq® Quick-Loader 2X MM w/Std Buffer) kullanıldı. Primerlerin çalıştığı sıcaklığa göre Tablo 2.2’de belirtilen PCR programı kullanıldı.

**Tablo 2.2:** PCR koşulları

Basamak	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Ön ısıtma	94°C	30 sn	1
Denatürasyon	94°C	30 sn	35
Bağlanma	55°C	1 dk	
Sentez	68°C	1 dk	
Uzama	68°C	5 dk	1
Bekleme	4 °C	15 dk	1

## 2.5 Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının OWL EASYCAST™ B2 sistemi kullanıldı. Elektrofrozde kullanılan agaroz Lonza (Massachusetts, ABD;Katalog No: 50004) markasından, TAE tamponu için gerekli olan Tris-Base MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144) markasından, EDTA ise AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: A5097,0250), MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K35629118 606 ) markalarından temin edildi. 50X TAE hazırlamak için 242 gr Tris-Base, 57.1 mL Gloacial asetik asit, 22 gr EDTA, 1L dH<sub>2</sub>O karıştırıldı ve karışım otokavlandı. Agaroz jel elektrofrezinde kullanmak üzere 100 mL 50X’lik TAE, 5L dH<sub>2</sub>O karıştırılarak 1X TAE hazırlandı. Bu tampona alternatif olarak 54 gr Tris-Base, 27.5 gr borik asit ve 20 mL 0.5 M’lık EDTA pH’ı 8 olacak şekilde 5X TBE tamponu hazırlandı. Bu tampon stok olarak kullanıldı. 200 mL 5X TBE’den alınarak üzerine 800 mL distile suyla tamamlandı ve 1X TBE hazırlandı. Fakat yürütme tamponu için 1X TBE’den 50 mL alınıp üzeri 50 mL distile suyla tamamlanarak 0.5 X TBE’ye seyreltilerek her defasında taze hazırlandı. PCR ürünlerini yürütmek için % 1.2’lik agaroz jel hazırlandı. Bunun için 1.2 gr agaroz tartıldı, erlene konuldu ve üzerine 150 mL 1X TAE eklendi ve mikrodalgada 2 dakika kaynatıldı. Jel soğuyana kadar jel sistemi ve kullanılacak taraklar saf su ile

yıkandı. Jel ılık hale geldiğinde üzerine 1.5 µL EtBr (Etüdyum bromür) eklendi ve 1-2 dakika sonra tarakları takılmış olan jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleşip örneklerin yükleneceği kuyucuklar oluştuktan sonra taraklar çıkarıldı. Sonrasında jelin üzerini kaplayacak şekilde tanka 1X TAE eklendi. İlk kuyucuğa DNA standardı olan Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Katalog No: #SM1333) firmasının GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder ready-to use 6 µL marker yüklendi. Mix ile yapılan PCR sonucu elde edilen ürünlerdenboya ile karıştırılmadan 5 µL, manuel PCR sonucu elde edilen ürünlerden ise 1 µL Fermentas / Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Katalog No: R0611) firmasının 6X DNA Loading Dye ile karıştırıldıktan sonra 5 µL yüklendi. Örnekler 140 volt, 200 amper 40 dakikada yürütüldü. Yürütülen örnekler UV transillüminatöründe görüntülendi ve görüntü kaydedildi.

## 2.6 Polimorfizm İçin Bitki Materyali Toplama

Polimorfizm için zeytin çeşitlerinin yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonun'dan temin edildi ve Balıkesir Damızlık Sığır Yetiştiriciliği Birliği'nden temin edilen sıvı azot içerisinde Balıkesir Üniversitesi Moleküler Biyoloji laboratuvarına getirildi ve uzun süre muhafaza edebilmek için -80 °C'ye kaldırıldı.

## 2.7 Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu

*OeACBP*'nin zeytin çeşitleri (Tablo 2.3) arasında polimorfizm gösterip göstermediğini anlamak için polimorfizm deneyi kuruldu. Bunun için öncelikle polimorfizm amacıyla toplanan zeytin yaprak örneklerinden QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının DNeasy® Plant Mini Kiti ( Katalog No: 69104) kullanılarak gDNA izolasyonu şu şekilde gerçekleştirildi: -80 °C'de saklanan yaprak örnekleri steril havanda sıvı azot eklenerek havaneli ile toz haline getirildi ve ependorfa alındı. Üzerine 400 µL AP1 tampon ve 4 µL RNase A eklendi.Vorteks ile karıştırıldı. Sonra 65 °C'de 10 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon devam ederken ependorf 2-3 kez alt üst edildi. 130 µL P3 tampon ilave edildi, pipetajla karıştırıldı ve 5 dk buzda

inkübasyona bırakıldı. ardından 14000 rpm'de +4 °C'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant mikropipet ile QIAshredder Mini Spin kolona (lila kolon) aktarıldı. 14000 rpm'de +4 °C'de 2 dk santrifüj yapıldı. Kolon atıldı ve supernatant mikropipet ile yeni bir ependorfa alındı. Üzerine süpernatant 1.5 katı kadar AW1 tampon eklendi. pipetaj ile karıştırıldı. Bu karışımın 650 µL DNeasy Mini Spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve karışımın geriye kalanı da DNeasy Mini Spin kolona aktarıldı ve 8000rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. Kolona 500 µL AW2 tampon eklendi. 14000 rpm'de +4 °C'de 2 dk santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir ependorfa alındı ve kolona 100 µL AE tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında beklendi. 8000 rpm'de +4 °C'de 1 dk santrifüj yapıldı. Elde edilen gDNA örnekleri kalıp olarak ve *OeACBP*'ye özel tasarlanan primerler (F13F17\_F, F13F17\_R) kullanılarak PCR [107] kuruldu. PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüledi. Görüntüleme sonucu markera göre olması gereken büyüklükte tek ve parlak bant veren PCR ürünü Ligand Biyoteknoloji ticari firmasına dizilemeye gönderildi. Dizileme sonuçları BioEdit [102] programı ile hizalandı ve polimorfik bölge saptaması yapıldı. Sonrasında Phylogeny.fr (phylogeny.lirmm.fr) programı ile filogenetik ağaç dizayn edildi.

**Tablo 2.3:** Polimorfizm için toplanan zeytin çeşitleri

1. <i>Olea europaea</i> cv. Hojiblanca
2. <i>Olea europaea</i> cv. Cormona
3. <i>Olea europaea</i> cv. Domat
4. <i>Olea europaea</i> cv. Hermandos
5. <i>Olea europaea</i> cv. UB10
6. <i>Olea europaea</i> cv. Negral
7. <i>Olea europaea</i> cv. Memecik
8. <i>Olea europaea</i> cv. Çakır
9. <i>Olea europaea</i> cv. Verdial
10. <i>Olea europaea</i> cv. UB1
11. <i>Olea europaea</i> cv. UB3
12. <i>Olea europaea</i> cv. Kiraz
13. <i>Olea europaea</i> cv. Gemlik
14. <i>Olea europaea</i> cv. Ascolana
15. <i>Olea europaea</i> cv. Leccino
16. <i>Olea europaea</i> cv. İzmir sofralık
17. <i>Olea europaea</i> cv. Uslu
18. <i>Olea europaea</i> cv. Ayvalık
19. <i>Olea europaea</i> cv. Edincik su
20. <i>Olea europaea</i> cv. Memeli
21. <i>Olea europaea</i> cv. Samanlı
22. <i>Olea europaea</i> cv. Gordales
23. <i>Olea europaea</i> cv. Erkence

## 2.8 RNA İzolasyonu

Zeytinin yaprak, meyve, çiçek, sürgün, tomurcuk ve pedisel organlarından QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının RNeasy® Plant Mini kiti (Katalog No: 74904) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. RNA izolasyonu şu şekilde gerçekleştirildi: öncelikle 450 µL RLF ve 5 µL β-merkaptetanol karıştırılarak lizis tampon hazırlandı. Sonra örnekler hiç sıvı azot bitmeden havanda ezildi. Sıvı azotla birlikte ependorfa alındı ve ependorfun kapağı açık bırakıldı. Üzerine lizis tampon eklendi. Sonrasında bu karışım kolona aktarıldı ve 14000 rpm'de 2 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolon atıldı ve kolonun

altındaki tüpte bulunan karışımın yarısı kadar etanol eklendi. Pipetaj yapıldı ve hemen başka bir kolona aktarıldı. 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve kolonun üzerine 700 µL RW1 tampon eklendi. 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve kolonun üzerine 500 µL RPE eklendi. 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Bu sefer 10000 rpm'de 2 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Temiz bir tüpe kolon yerleştirildi ve 10000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Sonrasında kolona 50 µL RNase free water eklendi ve 14000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bunun sonucunda 1. Elüsyon elde edilmiş oldu. Kolon başka bir tüpe aktarıldı ve yine 50 µL RNase free water eklendi ve 14000 rpm'de 1 dk +4 °C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Bunun sonucunda ise 2. Elüsyon elde edilmiş oldu.

## **2.9 Tamamlayıcı (Complementary) DNA (cDNA) Sentezi**

Gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) [108] için RNA'dan Fermentas (Vinius, Lithuania) firmasının RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kiti (Katalog No: K163) kullanım kılavuzu kullanılarak cDNA sentezi yapıldı.

cDNA sentezi şu şekilde gerçekleştirildi: Bir ependorfa 5 µL RNA kondu. Üzerine 1 µL Oligo dT, 6 µL DEPC su eklendi ve 14000 rpm'de 3-5 sn +4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj yapıldı. 70°C'de 5 dakika inkübasyon yapıldı. Sonrasında bir süre buzda bekletildi ve bu aşamadan sonra buzda çalışıldı. İnkübedilen karışıma 4 µL 5X tampon, 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL dNTP eklendi. 14000 rpm'de 3-5 sn +4°C'de soğutmalı santrifüjde santrifüj yapıldı. 37°C'de 5 inkübasyona bırakıldı. İnkübe edilen karışıma 1 µL reverstranskriptaz eklendi ve 42 °C'de 60dk inkübasyon ve son olarak 70 °C'de 10 dakika inkübasyon yapıldı.

## 2.10 Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

*OeACBP*'nin zeytinin hangi organında, ne zaman ve ne kadar sentezlendiğini tespit edebilmek için RT-PCR [108] yapıldı. RT-PCR için BIONEER (Kore) firmasının AccuPower® GreenStar™ qPCR PreMix kiti (Katalog No: K-6210) kullanıldı.

RT-PCR'da [108] daha önceden kopya sayısı belirlenmiş ubiquitin [109], süperoksit dizmutaz [110] ve GAPDH(Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) [111] olmak üzere 3 normalizatör gen kullanıldı. Bu genler ile *OeACBP*'nin Ct değerleri karşılaştırılarak *OeACBP*'nin zeytinde ne kadar sentezlendiğinin tespit edildi. RT-PCR [108] için 1 µL cDNA, 0.5 µL RT primer F, 0.5 µL RT primer R, 18 µL DEPC su kullanıldı.

RT-PCR [108] sonuçları Microsoft Excel'e aktarıldı ve gerekli hesaplamalar yapıldı. Sonuçlar doğrultusunda grafik oluşturuldu ve yorumlandı.

## 2.11 Klonlama ve Transformasyon

Genin zeytindeki işlevini belirlemek için geni protein olarak üretmek gerekir. Bu amaç doğrultusunda öncelikle geni bir vektöre klonlamak, vektöre klonlanan geni bakteriye aktarmak, bakteriyi uygun şartlarda protein sentezi yapabilecek kapasiteye kadar büyütmek gerekmektedir.

### 2.11.1 Klonlama İçin Primer Dizayını

Klonlama öncesinde içinde hem vektörün gen dizisinin bir kısmını hem de *OeACBP* gen dizisinin bir kısmını bulunduran bir çift primer tasarlandı (Tablo 2.1) ve Macrogen firmasından temin edildi.

### 2.11.2 Jelden Kazanım

Vektörün geni içine alabilmesi için ortamda sadece istenilen gen olmalıdır. Bu nedenle klonlama için tasarlanan primerler ile kurulan PCR [107] sonucu elde edilen üründen saf/pürifiye DNA elde etmek gerekir. Bunun için Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının GeneJET Gel Extarction kiti (Katalog No: K0691) kullanım kılavuzu kullanılarak jelden kazanım yapıldı.

Jelden kazanım için öncelikle tasarlanan primer ile zeytin meyve cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak total hacmi 50µL olan bir PCR [107] kuruldu. Kalıp olarak meyve cDNA'sı kullanılmasının nedeni *OeACBP* geninin RT-PCR [108] sonucunda en çok meyvede sentezlendiğinin bulunmasıdır. PCR ürününden 5µL kuyucuğa yüklenerek agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntülendi. Beklenen yerde tek ve parlak bant veren PCR ürününün tamamı agaroz jel elektroforezinde tekrar yürütüldü ve görüntülendi. Görüntüledikten sonra örneğin yüklü olduğu kuyucuk UV ışık altında kesildi ve bir ependorfa konuldu. Sonra üzerine 350 µL Binding tampon eklendi ve 55 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübe olan karışımdan 800µL kolona konur ve 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı döküldü ve kolona 100µL Binding tampon eklendi. Yine 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir tüpe kondu ve kolona 700 µL yıkama tamponu eklendi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı döküldü ve kolona hiçbir şey eklenmeden tekrar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Sonra kolona 50µL Elüsyon tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Saf/ pürifiye DNA elde edildi.

Klonlama ve transformasyon aşamasına geçmeden önce bütün malzemelerin hazır halde bulunması gerekir. Çünkü klonlama aşamasından hemen sonra hiçbeklemeden transformasyon aşamasına geçilir ve yine hemen sonra inkübasyon aşamasına geçilmelidir.

### 2.11.3 PCR Pürifikasyonu

Püfiriye DNA eldesi için jelden kazanım metoduna alternatif olarak Macherey-Nagel (Germany) firmasının NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Kat. No: 1506/005) kitinin prosedürü kullanılarak PCR pürifikasyonu yapılmıştır.

Öncelikle 50 µL total hacimde hazırlanan PCR ürünü agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. İstenilen yerde bant gösteren PCR ürününe 55 µL dH<sub>2</sub>O ilave edildi. toplam hacim 100 µL olarak ayarlandı. Üzerine 200 µL NT1 (Bağlanma tamponu) ilave edildi ve bu karışım kitin içindeki kolona yüklendi. 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı ve kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. Kolona 700 µL NT3 (Yıkama tamponu) eklendi ve 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü ve yine kolona 700µL NT3 (Yıkama tamponu) eklendi ve 11000 rpm'de 30 saniye +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüpteki sıvı döküldü. kolona hiçbir şey ilave edilmeden 11000 rpm'de 1 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki tüp atıldı ve kolon yeni bir tüpe koyuldu. Kolona 30 µL NE (Elüsyon tamponu) konuldu. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 11000 rpm'de 1 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Bu sefer kolon atıldı tüpte kalan sıvı püfiriye DNA olarak -20 °C'de saklandı.

### 2.11.4 Ampisilin Hazırlama ( 50 mg/mL)

Mutasyona uğramış ya da değiştirilmiş hücreleri ampisilin direnci aracılığıyla ayırmak için kullanılır. Bu nedenle hazırlanan besiyerleri ampsilinli olmalıdır. Sigma Aldrich firmasının (St. Louis, Missouri, ABD) ampicillin sodyum tuzundan (Kat. No: A9518-5G) (ampicillin sodium salt) 0.25 gr bir falkona alındı ve 5 mL saf suda çözüldü. Sonrasında steril bir filtreden geçirilerek ependorflara paylaştırıldı. -20 °C'de saklandı.

### 2.11.5 LB Agar ve LB Broth Hazırlama

Mikroorganizmaların ya da hücrelerin büyüme ya da kültür ortamı katı ya da sıvı olabilir. LB (Luria – Bertani) broth büyüme LB (Luria – Bertani) agar ise kültür için kullanılmaktadır.

LB agar hazırlanışında Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının LB Agarı (Katalog No: BP1425-500) kullanıldı. 4 gr LB agar ve 100 mL dH<sub>2</sub>O karıştırıldıktan sonra otoklavda steril hale getirildi. Otoklavdan sonra soğumaya bırakıldı ve ılıyınca üzerine 100 µL ampisilin eklendi. Petrilere döküldü.

LB broth için 10 gr Triptone (Conda; Kat. No: 1612.00), 5 gr Yeast Extract (Conda; Kat. No: 1702.00) ve 5 gr Sodyum klorid (Chem Cruz; Kat. No: sc-203274A) tartıldı ve üzeri 1 L saf su ile tamamlandı. ardından otoklavlanarak steril edildi. Bu işlemden sonra soğuyunca +4 °C'ye kaldırılarak saklandı.

### 2.11.6 Kompetan Hücre Hazırlama

*E.coli* DH10B, *E. coli* BL21 bakterisi suşları tek koloni elde edebilmek için LB agara [amp(-)] ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Sonrasında tek koloni seçilip 5 mL'lik LB brotha [amp(-)] aktarıldı ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. 80 mL'lik LB brotha 2 mL önkültürden eklendi. OD (canlı hücre sayısı) 0.2 olana kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. OD 0.2 olunca 1M MgCl<sub>2</sub>'den 1.6 mL ve 1M glikozdan 888µL eklendi. OD 0.5 oluncaya kadar 37°C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona devam edildi. OD 0.5 olunca buz içinde +4 °C'de buzdolabına kaldırıldı ve 2 sa. bekletildi. Bekleme aşamasında pH 5.5'te 23 mL 1M CaCl<sub>2</sub>, 17 mL 1M MnCl<sub>2</sub> ve 10 mL 1M NaAc karıştırılarak 50 mL'lik tritalasyon tampon hazırlandı. Bekleme süresi bittikten sonra 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pellet 40 mL tritalasyon tamponda çözüldü. Pellet çözülünce 5000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı ve pelletin üzerine hiçbir şey ekmeden tekrar 5000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Pellet 3.4 mL tritalasyon tampon ve 0.6 mL % 15'lik gliserol içeren 4 mL'lik tritalasyon tamponda çözüldü. Her bir ependorfa 50 µL dağıtıldı. - 80 °C'de muhafaza edildi.

### 2.11.7 Klonlama

Klonlama için Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının aLICator LIC Cloning and Expression kiti (Katalog No: K1251) kullanıldı ve klonlama kullanım kılavuzuna uygun yapıldı.

Bunun için bir ependorfa 7µL pürifiye DNA, 2µL LIC tampon, 1µL T4 DNA Polimeraz eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 0.6µL EDTA ve kullanılacak olan vektörden (pLATE 51) [112] 1µL ilave edildi.

### 2.11.8 Çoğaltma Suşuna Transformasyon

Transformasyon için *E. coli*'nin bir çoğaltma suşu olan DH10B kullanıldı. Bunun için yaklaşık 13 µL'lik hazırlanan vektör - pürifiye DNA karışımı -80 °C'de ependorfta muhafaza edilen DH10B'ye aktarıldı. 30 dk buzda bekletildi. Sonra ısı şoku için 42 °C'de 90 sn bekletildi. Tekrar 1-2 dk buzda bekletildi. Üzerine 450 µL LB Broth yavaş yavaş eklendi ve 37 °C'de 1 sa 30 dk çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra 14000 rpm'de 1-2 dk santrifüj yapıldı. Yaklaşık 400 µL kadar sıvı atıldı. Kalan sıvı ile pellet pipetajyoluyla iyice karıştırıldı ve hazırlanan LB agara yayma ekim yöntemiyle ekildi. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### 2.11.9 Koloni PCR ve Koloni Tarama

Bu işlemin amacı büyüyen kolonileri daha çok büyütmek ve protein sentezi yapabilecek duruma getirmektir. Bunun için 1 gece inkübasyon sonrası büyüyen bakteri kolonileri tarandı. Tek tek büyümüş olan kolonilerden 10 tanesi seçildi. Ayrı ayrı PCR tüplerine alındı ve üzerlerine 10'ar µL saf su eklendi. Hazırlanmış olan sulandırma örneklerinden 1 µL alınıp kalıp olarak kullanıldı ve Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının aLICator LIC Cloning and Expression kiti (Katalog No: K1251) primerleri ile PCR [107] kuruldu. Örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve görüntüledi. Görüntüleme sonucunda tek ve daha parlak bant veren PCR ürünü Ligand Biyoteknoloji ticari firmasına dizilemeye gönderildi. Dizileme sonucu içinde *OeACBP* geni tarandı yani vektör

geni içine almış mı ve DH10B suşuna aktarım gerçekleşmiş mi diye kontrol edildi. Dizilemeye gönderilen PCR ürünüde kalıp olarak kullanılan sulandırma örneğinin tamamı, içinde 10 mL LB broth, 10 µL ampsilin bulunan 50 mL'lik falkona eklendi. Falkonun ağzı hafif açık kalacak şekilde çalkalamalı inkübatöre yatay olarak kondu. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### **2.11.10 Plazmit İzolasyonu**

Plazmit izolasyonu için Fermentas (Litvanya) firmasının GeneJET Plasmid Miniprep kiti (Katalog No: K0502) kullanıldı.

Büyütülmüş olan koloni 4000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Sıvı kısım 4 ependorfa paylaştırıldı ve üzerine 150 µL %100 gliserol eklendi. -80°C'de muhafaza edildi.

Falkonda kalan pelletin üzerine 250 µL Resuspension solution eklendi ve pipetaj yoluyla iyice karıştırıldı. Sonra 250 µL lizis solüsyon eklendi ve yavaş yavaş pipetaj yoluyla karıştırıldı. Bu karışım ependorfa aktarıldı. Üzerine 350 µL neutralization solution eklendi ve 3-5 kez alt üst edildi. Sonra 14000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası sıvı kısım kolona aktarıldı ve tekrar 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı atıldı ve kolona 500 µL Wash solution eklendi, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Yine kolonun altındaki sıvı atıldı ve kolona 500 µL Wash solution eklendi, 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolonun altındaki sıvı atıldı ve kolona bir şey eklenmeden 14000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Kolon boş bir tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µL elüsyon tampon eklendi. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. 1. Elüsyon elde edildi. Sonra kolon başka tüpe aktarıldı ve bu sefer üzerine 20 µL elüsyon tampon eklendi. 14000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. 2. Elüsyon elde edildi.

### **2.11.11 Spektrometre İle Plazmit DNA Miktar Ölçümü**

Ölçüm için 96 gözlü plastik hücre kültürü plakası (96 well plastic cell culture plate) kullanıldı. Plakadaki bir kuyucuğa 195 µL saf su kondu ve üzerine 5 µL izole

plazmit eklendi. Diğer bir kuyucuğa sadece 200 µL saf su (KÖR) kondu. Spektrometreye hücre kültür plakası yerleştirildi ve ölçüm yapıldı. Miktar hesaplaması aşağıdaki gibi yapıldı.

$$A(\text{ng} / \mu\text{L}) = \text{ölçüm sonucu} - \text{Kör'ün sonucu}$$

### **2.11.12 Ekspresyon Suşuna Plazmit Transformasyonu**

Bunun için *E.coli*'nin ekspresyon suşu BL21 kullanıldı. 3 - 5 µL izole edilen plazmit aktarıldı. Çoğaltma suşuna transformasyon aşamasında yapılan işlemler sırayla uygulandı. Öncelikle 30 dk buzda, sonra ısı şoku için 42 °C'de 90 sn, ardından birkaç dakika buzda bekletildi. Üzerine 450 µL LB broth yavaş yavaş eklendi. 37 °C'de 1 sa 30 dk çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Sonra birkaç dakika 14000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatanttan yaklaşık 400 µL döküldü. Kalan kısım ile pellet pipetaj yoluyla iyice karıştırıldı ve LB agara yayma ekim yoluyla ekim yapıldı. 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

### **2.12 Hücrelerin İndüklenmesi**

Bir gece inkübasyona bırakılan hücrelerin üremesi sonucunda tek bir koloni seçildi ve içinde 10 mL LB broth ve 10 µL ampisilin [Sigma (Kat. No: A9518-5G)] bulunan 50 mL'lik falkona eklendi. Falkonun ağzı hafif açık kalacak şekilde yatay olarak çalkalamalı inkübatöre yerleştirildi. 37 °C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Üreme sonucunda bir erlene 90 mL LB broth, 12.5 µL ampisilin [Sigma (Kat. No: A9518-5G)] ve 10 mL 1 gece inkübasyona bırakılmış önkültür eklendi. OD 0.6 oluncaya kadar 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı. OD 0.6 olduğunda üzerine 1 mL laktozun kükürtlü bir analogu olan IPTG (İsopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid) [Thermo Scientific (Lithuania; Kat. No: R0392)] eklenerek indüklendi. 37 °C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

### **2.12.1 IPTG Hazırlama**

IPTG (İsopropil  $\beta$ -D-1-tiyogalaktopiranosid) laktozun kükürtlü bir analogu olup ortamda yeterli sayıda canlı hücre bulunduğu anda ortama eklenerek protein sentezini başlatır. 0.24 gr Thermo Scientific (Lithuania; Kat. No: R0392) firmasından temin edilen IPTG bir falkona eklendi ve üzerine 10 mL saf su ilave edildi. Saf suda çözülen IPTG steril bir filtreden geçirildi ve ependorflara paylaştırıldı. -20 °C’de saklandı.

### **2.13 Hücreleri Çöktürme ve Lizis**

İndükleme işleminden sonra protein üreten hücreler çöktürülür, lizis edilir ve üretilen protein hücre artıklarından uzaklaştırılır.

#### **2.13.1 Hücreleri Çöktürme**

Çöktürme işlemi için hücreler 50 mL’lik falkonlara paylaştırıldı. 4000 rpm’de 20 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Pellet lizis işleminin hazırlıkları yapılırken -20 °C’de saklandı.

#### **2.13.2 Protamin Sülfat Hazırlama**

1 mL’lik total hacim için 0.03 gr protamin sülfat (Sigma; Kat No: 041M1437V) tartıldı. Üzeri otoklavlı su ile tamamlandı. Vorteks ve pipetaj yoluyla çözüldü.

#### **2.13.3 PMSF Hazırlama**

PMSF (Fenilmetilsülfonil florid) bir serin proteaz inhibitörüdür. Hücre parçalanmasından yani lizisinden sonra ilgilenilen proteini sindiren proteazları etkisiz hale getirmek için kullanılır. Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, ABD,

KatNo: P7626) firmasından temin edilen PMSF'den 17.4 gr bir falkona eklendi ve 10 mL izopropanol ile çözüldü. -20 °C'de saklandı.

#### **2.13.4 5 mL'lik Lizozim Hazırlama**

1,4-beta-bağlarının hidrolizini katalize ederek, bakteriyel hücre duvarına zarar verir. 0.25 gr lizozim (Sigma ;Kat No: SLBO8654V) tartıldı ve total hacim 5 mL olacak şekilde üzeri otoklavlı su ile tamamlandı. Sonra 1'er mL ependorflara paylaştırıldı. Alüminyum folyo ile sarılarak -20 °C'de saklandı.

#### **2.13.5 Lizis**

Lizis hazırlıkları yapılırken -20 °C'de saklanan örnekler çıkarıldı ve pelletin üzerine 2 mL lizis tampon [QIAGEN(Venlo, Hollanda); Kat. No: 41832775] eklendi. İyice çözüldü. Sonra 100 µL PMSF eklendi. Pipetaj ya da vorteks yoluyla karıştırıldı. 125 µL lizozim eklendi. Pipetaj ya da vorteks yoluyla karıştırıldı. 15 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sonra 1 mL protamin sülfat eklendi ve 10 dk buzda bekletildi. 2 ependorfa örnek paylaştırıldı ve 14000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Süpernatant başka bir ependorfa aktarıldı. Protein elde edildi. -20 °C'de saklandı.

Bu lizis yöntemine alternatif olarak başka bir lizis yapılmıştır: 1 pellet için 2 mL buffer A ve 20 µL PMSF karışımı hazırlandı ve -20 °C'de saklanan pellet bu karışım ile çözüldü. 1 spatül katı lizozim bu karışım ile çözülen örneğin tam ortasında döküldü ve çok kısa bir vorteks yapıldı. Bu aşamada lizozim yerine ultrasonik banyo kullanılarak da parçalama işlemi yapıldı. Ardından 20 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bu esnada 1 mL'lik protamin sülfat hazırlandı (1 mL için 0.03 gr protemin sülfat). Bekleme süresi bittikten sonra bu karışımın üzerine 200 µL protamin sülfat eklendi ve 15 dakika buzda bekletildi. sonrasında artık sümüksü bir yapı kazanan karışım 2 ependorfa paylaştırılarak 14000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj yapıldı. Protein elde edildi.

### 2.13.6 Buffer A Hazırlama

50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol, 0.5 mM TCEP pH 7.5 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

### 2.13.7 Protein Saflaştırma

Elde edilen protein sonrasında şırınga ile filtreden geçirilerek 15 mL'lik falkona aktarıldı ve üzerine "START" yazıldı. Falkonda bir miktar çözelti bırakılarak bu çözelti bazik ponza üzerine eklendi. Bazik ponza ile çözelti iyice çözüldü ve 60 dakika yatay bir şekilde buzda bekletildi. Arada alt üst edildi. Sonrasında 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant başka bir 15 mL'lik falkona alınarak üzerine "FT" (flow through) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W1" (wash) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W2" (wash) yazıldı. Yine kalan pellet 1 mL buffer A ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "W3" (wash) yazıldı. Sonrasında kalan pellet 1 mL buffer B ile çözüldü ve 5 dakika yatay bir şekilde buzda bekletildi. 5 dakikanın sonunda 8000 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "E1" (elüsyon) yazıldı. Kalan pellet 1 mL buffer B ile çözüldü ve 8000 rpm'de +4 °C'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatanttan 200 µL bir ependorfa alındı ve üzerine "E2" (elüsyon) yazıldı.

Bu saflaştırma metoduna alternatif olarak Ni-NTA kolon (Nikel kolon) kullanılarak saflaştırma yapıldı. 1 pellet 5 mL Buffer A ve 50 µL PMSF karışımı ile çözüldü ve ardından ultrasonik banyoda 5 dakika parçalamaya bırakıldı. Ardından çözelti ependorflara paylaştırılarak 14000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant filtreden geçirilerek 15 mL'lik falkona alındı ve üzerine "START" yazıldı. Eş zamanlı olarak bazik ponza tozu Buffer A ile Ni-NTA kolonda yıkandı. Üzerine "START" yazılan çözelti bazik ponzanın üzerine eklendi ve Ni-NTA kolonda 10 dakika bekletildi. 10 dakikanın sonunda kolondan geçirilene süzüntü başka bir falkona alındı ve zerine "FT" yazıldı. Ardından 5 mL Buffer A

bazik ponzanın üzerine eklendi ve hiç beklemeden Nİ-NTA kolondan süzüntü başka bir ependorfa alındı, üzerine "W1" yazıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve falkonun üzerine "W2" yazıldı. Bu işlemin sonunda bazik ponzanın üzerine 2mL Buffer B eklendi, 2 dakika beklendi ve süzüntü başka bir falkona alındı, üzerine "E1" yazıldı. Bu işlem bir kez daha yapıldı ve falkonun üzerine "E2" yazıldı.

### **2.13.8 Tampon B Hazırlama**

50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, 0.5 mM TCEP ve %5 gliserol pH 7.5 olacak şekilde karıştırılarak hazırlandı.

## **2.14 SDS Page Jel Elektroforezi ve Western Blot**

SDS Page jel elektroforezi (Sodium Dodecyl Sulfate - Poly Acrylamide Jel Elektroforez) [113]; SDS ile denatüre olan proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre poliakrilamid jelde ayrılması prensibine dayanır. Western blot [114] ise bir protein solüsyonunda aranılan proteini özel antikorlar ile tespit etmek için kullanılır. Bu işlemler için BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD) firmasının Trans-Blot® Turbo™ RTA Transfer kit, Nitrocellulose (Kat. No: 170-4270) kullanıldı.

### **2.14.1 SDS Page Jel Elektroforezi**

#### **2.14.1.1 %15'lik Ayırma Jeli Hazırlama**

Proteinleri moleküler ağırlıklarına göre ayırmak için kullanılır. Jel 2.5 mL Lower tampon, 3.75 mL Bisakrilamid [Fisher BioReagents® (New Jersey, USA; Kat. No: 105199)], 3.75 mL otoklavlı su, 100 µL % 10'luk amonyum persülfat (APS) [Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD;Kat. No: 1007840)], 10 µL Tetrametilendiamin (TEMED) [Fermentas(Vinius, Lithuania; Kat. No:111383)] karıştırılarak hazırlandı.

Bisakrilamid iki akrilamid zinciri arasında çapraz bağlanmalar oluşturur. Bisakrilamid miktarı arttıkça jelde ısınma fazlaşır, kırılabilirlik artar ve daha kolay yıkanır. APS polimerleşmeyi başlatırken TEMED ise bu olayı katalizler. Bu nedenle jel dökülmeden hemen önce APS ve TEMED eklendi. Jel döküldükten sonra hava kabarcıklarını gidermek ve jeli düzeltmek için jelin üzerine bir miktar izopropanol döküldü. Jel donduktan sonra izopropanol kurutma kağıdı veya saf su ile uzaklaştırıldı.

#### **2.14.1.1.1 Lower Tampon Hazırlama**

1 L'lik (pH 8.8) lower (ayırıcı) tampon için 19.8 gr Tris [MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144)], 0.4 gr SDS [AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: 151-21-3)] karıştırıldı. Üzeri otoklavlı su ile tamamlandı.

#### **2.14.1.1.2 %10'luk APS Hazırlama**

Polimerizasyon olayını başlatır. 0.1 gr APS (Amonyum persülfat) ve 1 mL otoklavlı su ile hazırlandı.

#### **2.14.1.2 Yığma Jeli Hazırlama**

Moleküler ağırlıkları farklı olan proteinleri ayırma jeline kadar yığar. Yığma jeli 2.5 mL Upper tampon, 1.25 mL Bisakrilamid [Fisher BioReagents® (New Jersey, USA; Kat. No: 105199)], 6.14 mL otoklavlı su, 100 µL % 10'luk APS [Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD; Kat. No: 1007840)], 10 µL TEMED [Fermentas(Vinius, Lithuania; Kat. No: 111383)] karıştırılarak hazırlandı. Jel döküldükten sonra kuyucukların oluşması için tarak takıldı.

#### **2.14.1.2.1 Üst Tampon Hazırlama**

1 L'lik Upper tampon için 6.6 gr Tris [MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144)], 0.4 gr SDS [AppliChem (Darmstadt, Almanya; Katalog No: 151-21-3)] karıştırıldı ve üzeri otoklavlı su ile tamamlandı.

#### **2.14.1.3 Yürütme Tamponu Hazırlama**

1 L'lik yürütme tamponu için 100 mL 10X Tris-Glisin SDS tampon [BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD; Kat. No:161-0732)] ve 900 mL otoklavlı su kullanıldı.

#### **2.14.1.4 Örnek Hazırlama**

25 µL'lik ya da 50 µL'lik örnek hazırlandı. 25 µL'lik örnek için 20 µL örnek, 5 µL boya karıştırıldı. 50 µL'lik örnek için ise; 45 µL örnek, 5 µL boya karıştırıldı. Örnek yükleme boyası [BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD) 4X Laemmli örnek tampon; Kat. No:161-0747] Betamerkaptoetanol (Sigma Kat. No: 125K0165) ile muamele edilip kullanıldı. Boya örnek sayısı ile orantılı olacak şekilde hazırlandı. Örnekler boya ile karıştırıldıktan sonra 70°C'de 5 dk bekletildi.

SDS jel elektroforezi için Thermo Scientific (Lithuania) firmasının PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Katalog No: 26619) markerı kullanıldı. Hazırlanan örnekten 20 µL, markerdan 3 µL kuyucuğa yüklendi. Jel önce proteinlerin ayırma jeline kadar yığılması için 90 voltta 20 dk, sonra proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için 120 voltta 90 dk yürütüldü (Şekil 2.2).

#### **2.14.1.5 Commasie Blue Boyama Tekniği**

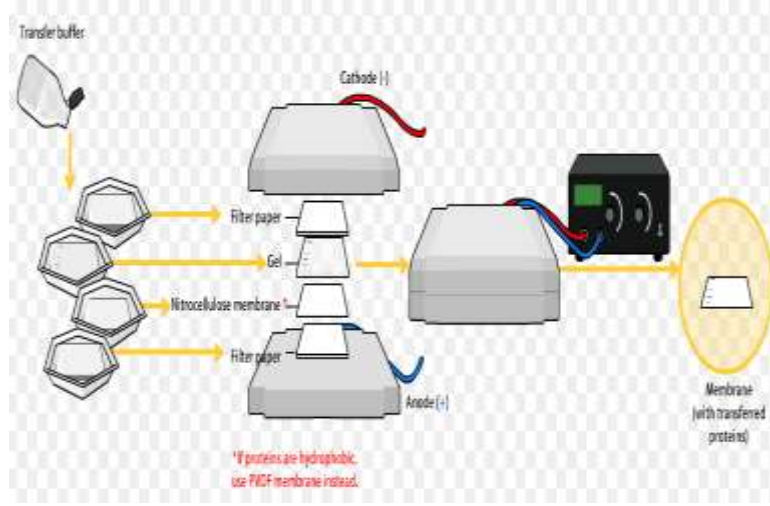
Bu boyama tekniği lizis işleminden sonra gerçekleştirildi. Yürütülen jel bir kaba kondu ve Commasie Blue ile boyandı. 25°C'de çalkalamalı inkübatörde 45 dk

bekletildi. Boya önce su ile sonra SDS renk açma solüsyonu (75 mL asetik asit glacial, 50 mL metanol karıştırılarak üzeri dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlandı) ile yıkandı. Renk açma solüsyonu içinde 25°C'de 1 gece çalkalamalı inkübatörde bekletildi. UV transillüminatöründe moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler görüntülendi ve görüntü kaydedildi.

#### **2.14.1.6 Gümüş Boyama Tekniği**

Commasie Blue boyama yöntemine alternatif olarak protein saflaştırıldıktan sonra yapılan gümüş boyama tekniği uygulandı. Yürütülen jel 10 mL asetik asit, 40 mL etil alkol ve 50 mL dH<sub>2</sub>O ile hazırlanan çözelti içinde 1 saat bekletildi. sonrasında jel dH<sub>2</sub>O ile 1 gece yıkandı. Ertesi gün jel %0.02'lik sodyumtiyasulfat (0.04 gr Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, 200 mL dH<sub>2</sub>O) içinde sadece 1 dakika tutuldu ve 3 kez 30 saniye dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Sonrasında jel +4 °C'de soğuk %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisinde (0.2 gr AgNO<sub>3</sub>, 200 mL dH<sub>2</sub>O ve 40 µL formaldehit ) 20 dakika bekletildi. Jel tekrar 3 kez 30 saniye dH<sub>2</sub>O ile yıkandı ve yıkanan jel yeni bir kaba alındı. 1 dakika dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Jel %3 'lük sodyumkarbonat çözeltisinde (15 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 250 mL dH<sub>2</sub>O ve 125 µL formaldehit) konuldu. Çözelti sarı renk alınca yenisiyle değiştirildi ve bu işlem boyama belirgin olana kadar devam etti. Jel 20 saniye dH<sub>2</sub>O ile yıkandı. Yıkandıktan sonra son işlem olarak jel %5 'lik asetik asit içinde 5 dakika bekletildi. %1'lik asetik asit içinde +4 °C'de saklandı.





Şekil 2.2: Membrana transfer tekniği [113].

### 2.14.2.1 10X Koşurma Tamponu Hazırlama

30.3 gr Tris, 144.4 gr Glisin tartılarak pH 8.3'te dH<sub>2</sub>O ile 1 L tamamlanarak hazırlandı. PVDF membran kullanılarak yapılan transfer işleminde bu tampondan 100 mL kullanılarak üzerine 200 mL metanol, 500 µL %10'luk SDS eklenerek toplam hacim dH<sub>2</sub>O ile 1 L'ye tamamlanarak transfer buffer hazırlandı.

### 2.14.2.2 %10'luk SDS Hazırlama

10 gr SDS pH 7.2'de 100 mL dH<sub>2</sub>O ile çözülerek hazırlandı.

### 2.14.2.3 Transfer Tamponu Hazırlama

Jelin membrana aktarımında kullanıldı. Her membrana aktarımda yeniden hazırlanmalıdır. Bunun için BIO-RAD (Hercules, Kaliforniya, ABD) firmasının Trans - Blot® Turbo™ 5X Transfer tampondan 20 mL, 20 mL etanol ve 1 L'ye tamamlayacak kadar saf su karıştırıldı.

#### **2.14.2.4 10X TBS Hazırlama**

0.2 M'lık Tris'ten [MERCK (Darmstadt, Almanya; Katalog No: K41623287 118, Katalog No: K42846187 144)] 24.22 gr, 1.5 M'lık NaCl'den 87.66 gr tartıldı. Üzerine 1 L'ye tamamlayacak kadar saf su eklendi.

#### **2.14.2.5 1X TBS Hazırlama**

10X TBS'den 40 mL alındı ve üzerine 400 mL'ye tamamlayacak kadar saf su ilave edildi. Uzun süre saklayabilmek için Tween 20 ile muamele edildi.

#### **2.14.2.6 Blocking Tampon Hazırlama**

QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının Blocking reagent (Kat. No: 145039977) 0.1 gr, QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının Blocking reagent tampon (Kat No: 145039712) 2 mL ve 18 mL 1X TBS karıştırılarak hazırlandı.

#### **2.14.2.7 Anti-body Hazırlama**

10 mL 1X TBS içine 5 µL anti-body eklendi. Böylece ½ oranında antikor seyreltilmiş oldu. Bu karışım daha sonra filtrelili şırıngadan geçirilerek seyreltildi. QIAGEN (Venlo, Hollanda) firmasının Penta-His HRP Conjugate (Kat. No: 145041949) anti-body olarak kullanıldı.

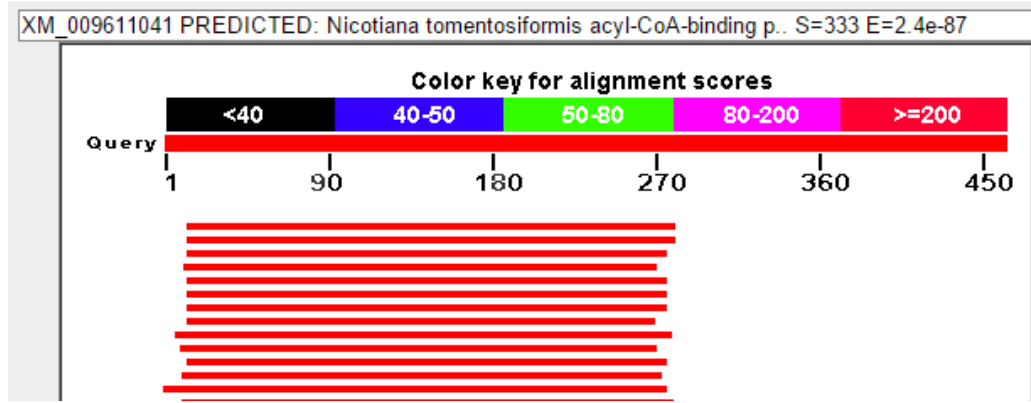
#### **2.14.2.8 ECL Hazırlama**

Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD) firmasının Pierce® ECL (Entry-level peroxidase substrate for enhanced chemiluminescence) Western Blotting Substrate kullanıldı. Bunun için kitin içindeki Detection Reagent 1 Peroxide Solution (Kat. No: 1859701) 3 mL ve Detection Reagent 2 Luminol Enhancer Solution (Kat. No: 1859698) 3 mL alınarak bir falkonda karıştırıldı.

### 3. BULGULAR

#### 3.1 Biyoinformatik Analiz

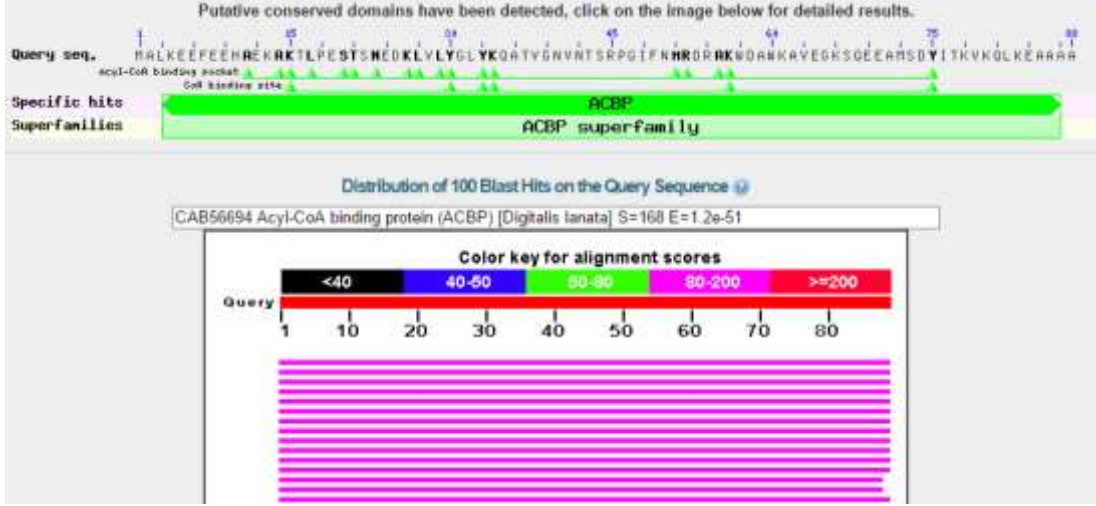
Öncelikle cDNA kütüphanesinde "F13F17" olarak isimlendirilen cDNA dizisinin NCBI veri tabanındaki BLAST [101] programında nBLAST sekmesi kullanılarak Açıl - KoA Bağlanma Proteinine ait olduğu bulundu. (Şekil 3.1) BioEdit [102] programı ile cDNA dizisinin açık okuma çerçevesi bulundu (Şekil 3.2) ve pBLAST sekmesi ile en yakın akrabalık gösterdiği gen ailesi tespit edildi.(Şekil 3.3)



Şekil 3.1: *OeACBP* cDNA dizisinin nBLAST analizi.

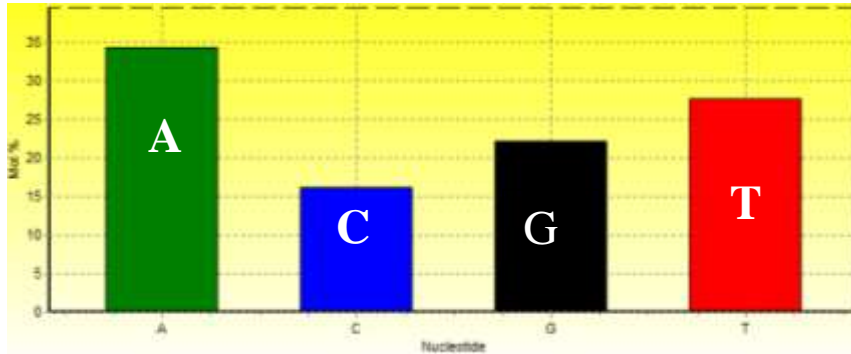
```
AcylCoAbindingProtein(1-499saglam): 14 to 277: Frame 2 88 aa  
MALKEEFEEHAEKAKTLPESTSNEKLVLYGLYKQATVGNVNTSRPGIFNMRDRAKWDANKAVEGKSQEEAMSDYITKVKQLKEAAA
```

Şekil 3.2: *OeACBP*'nin açık okuma çerçevesi (ORF).

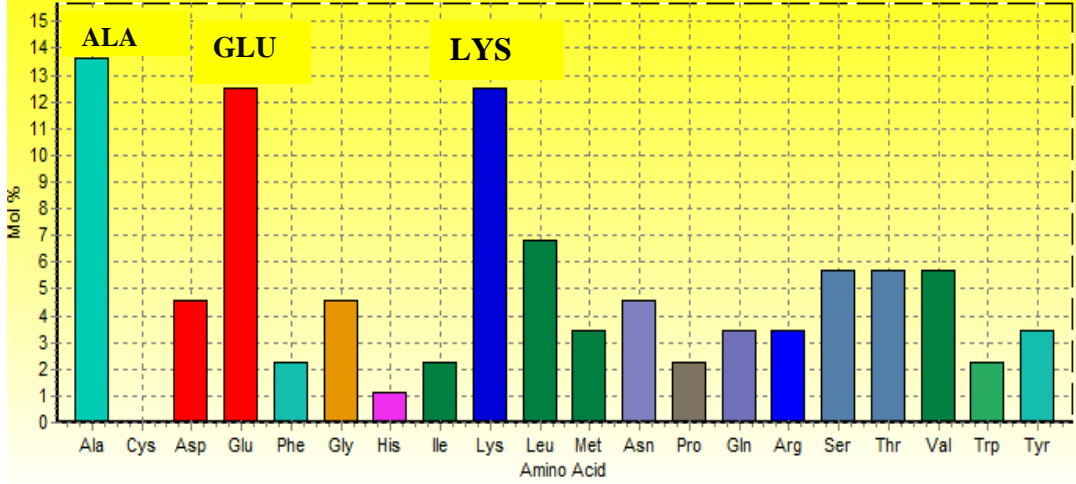


Şekil 3.3: *OeACBP*'nin pBLAST analizi ve ait olduğu gen ailesi.

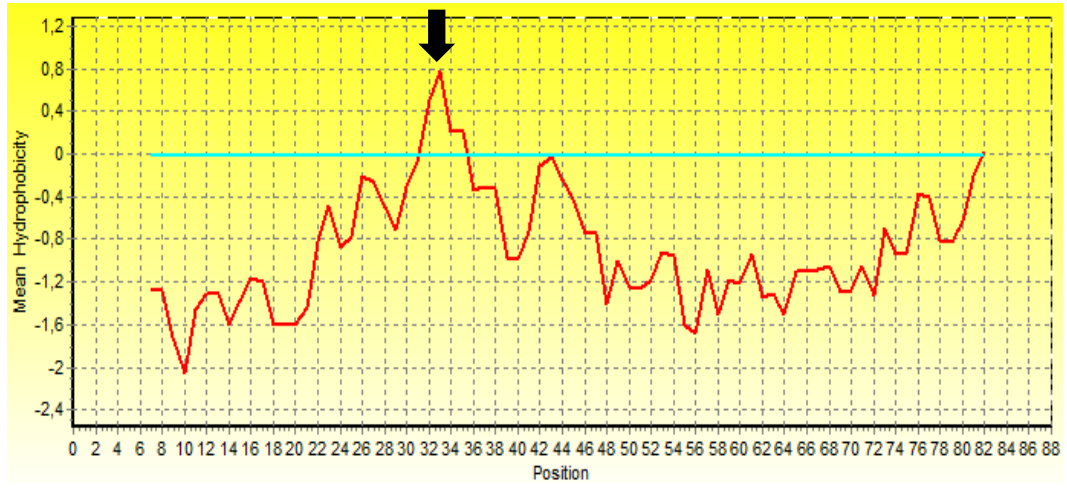
BioEdit [102] programı kullanılarak *OeACBP*'nin nükleotit kompozisyonu belirlendi ve Şekil 3.4'de gösterildi. Analiz sonuçlarına göre 461 nükleotit uzunluğundaki *OeACBP*'nin %38.18 oranında G+C ve %61.82 oranında A+T içerdiği ve en fazla Adenin nükleotiti bulunduğu görüldü. Yine BioEdit [102] programı kullanılarak *OeACBP*'nin aminoasit kompozisyonu belirlendi (Şekil 3.5). *OeACBP*'nin 88 aminoasit içerdiği ve yaklaşık 10 kDa büyüklüğünde olduğu bulundu. Sonuçlara göre; glutamik asit, alanin ve lizin bakımından zengin olduğu görüldü. BioEdit [102] programının Kyte & Doolittle Scale Mean Hydrophobicity Profile [115] sekmesi kullanılarak hidrofobisite profili Şekil 3.6'da gösterildi.



Şekil 3.4: *OeACBP*'nin nükleotit kompozisyonu.

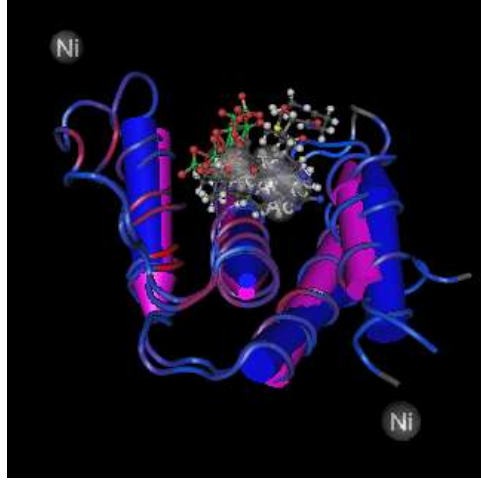


Şekil 3.5: *OeACBP*'nin aminoasit kompozisyonu.

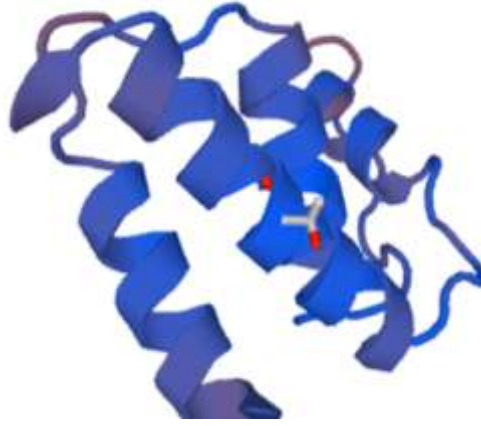


Şekil 3.6: *OeACBP*'nin hidrofobisite profili.

Cn3D [104] programı ile *Digitalis lanataACBP*'nin tahmini 3 boyutlu yapısı belirlenirken, SWISS-MODEL [116] programıyla da *OeACBP*'nin tahmini 3 boyutlu yapısı belirlendi ve Şekil 3.7-8'de gösterildi. Buna göre; 4 tane  $\alpha$ - heliks yapı bulunduğu görüldü. Hücre zarı gibi hidrofobik ortamlarda oligopeptitlerde  $\alpha$  sarmal yapı görülmektedir. Lizin ve alanin aminoasitlerinin sarmal yapı oluşturmaya eğilimi yüksektir. Bu da BioEdit [102] programıyla bulunan hidrofobisite grafiğini destekleyerek *OeACBP*'nin hidrofobik olduğunu gösterir.



Şekil 3.7: Cn3D [104] ile *Digitalis lanata* ACBP'nin tahmini 3 boyutlu yapısı.



Şekil 3.8: Swiss model ile *OeACBP*'nin tahmini 3 boyutlu yapısı.

ExpASy [105] programı kullanılarak *OeACBP*'nin molekül ağırlığı ve izoelektik noktası belirlendi ve Şekil 3.9'da gösterildi. Buna göre *OeACBP*'nin izoelektrik pH değeri 5.85 ve ortalama molekül ağırlığı ise 9.92 kDa olarak hesaplandı.

### Compute pI/Mw

#### User-provided sequence:

```
10      20      30      40      50      60
MALKEEFEEH AEKAKLPES TSNEKLVLY GLYKQATVGN VNTSRPGIFN MRDRAKWDAA
70      80
KAVEGKSQEE AMSDYITKVK QLKEAAAA
```

**Molecular weight (Da):** 9922.19 (average mass), 9916.00 (monoisotopic mass)

**Theoretical pI:** 5.85

Şekil 3.9: *OeACBP*'nin izoelektrik noktası ve molekül ağırlığı.

SOSUI [106] programıyla *OeACBP*'nin hücredeki lokalizasyonunu ve protein özelliği belirlendi. Sitoplazmik ve suda çözünür bir protein olduğu belirlendi. Şekil 3.10 ve 11'de gösterildi.

### SOSUI<sub>GramN</sub> Result

No.	seg.Length	subcellular Localization site	ID
0001	88a.a.	C (cytoplasmic)	_protein

Şekil 3.10: *OeACBP*'nin hücredeki yeri.

### SOSUI Result

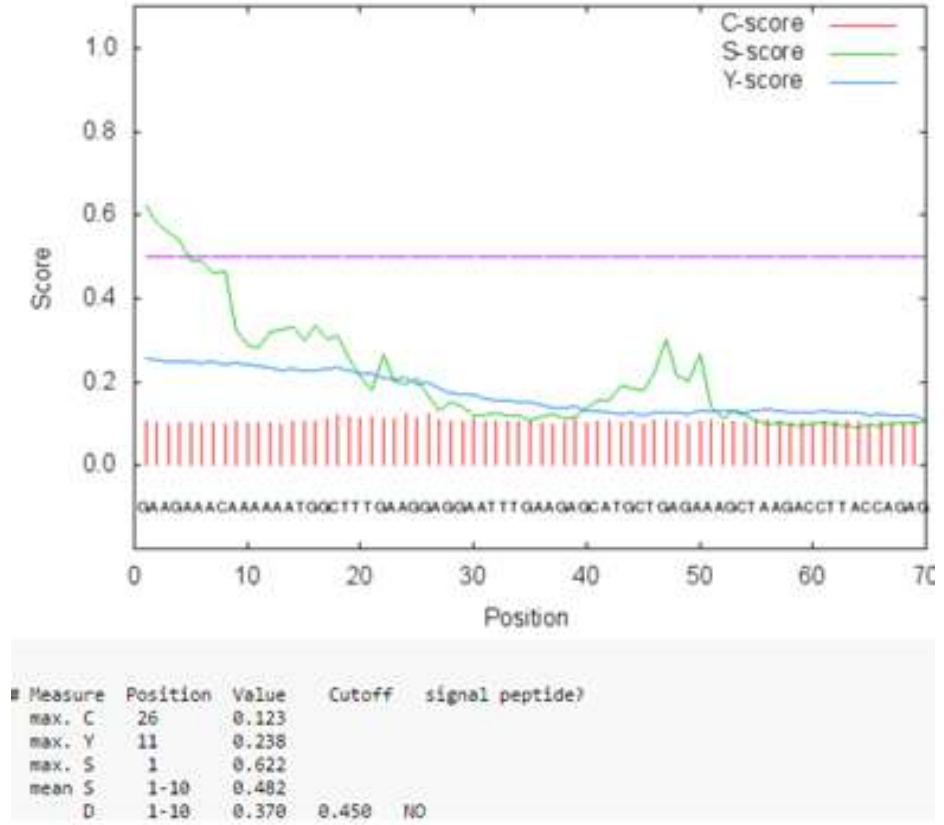
Query title : None

Total length : 98 A. A.

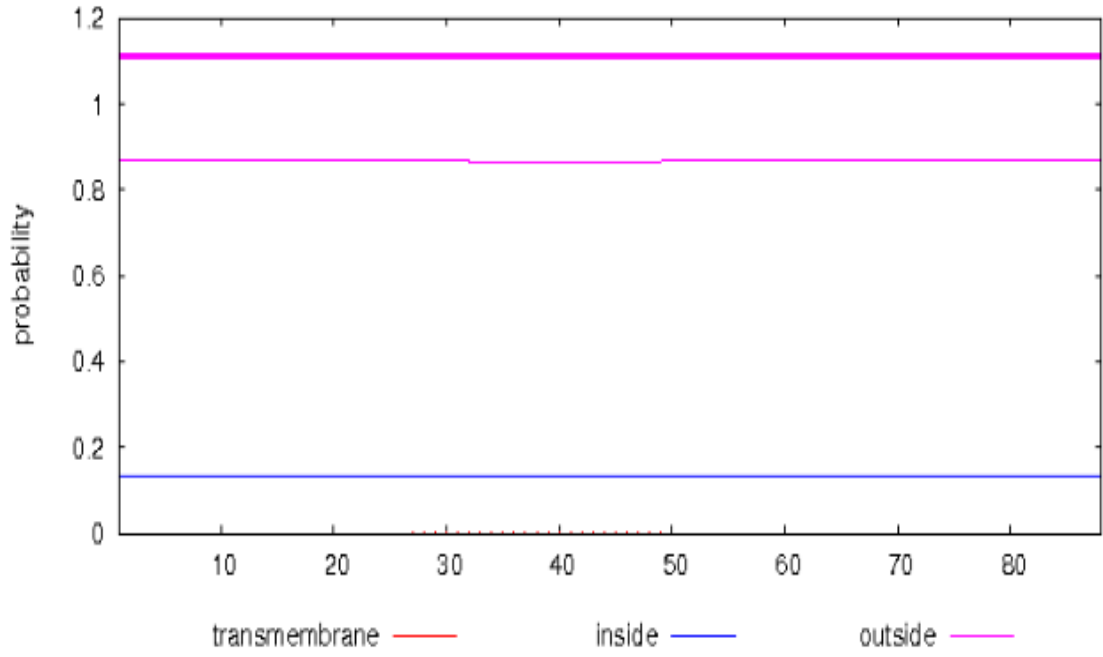
Average of hydrophobicity : -0.838776 **This amino acid sequence is of a SOLUBLE PROTEIN.**

Şekil 3.11: *OeACBP*'nin protein özelliği.

SignalP [117] ve TMHMM [118] programları kullanılarak sinyal peptit ve transmembran domain varlığı araştırıldı ve Şekil 3.12 ve 13’de gösterildi. Buna göre sinyal peptit ve transmembran domain bulundurmadığı görüldü.



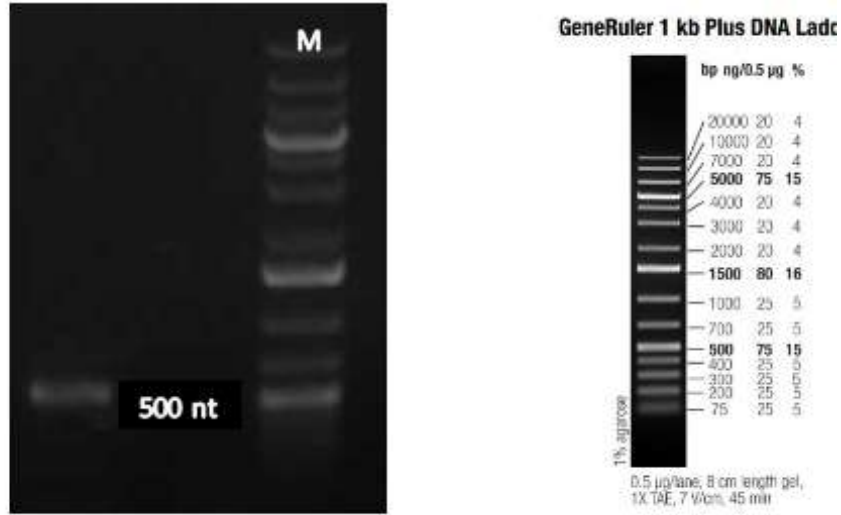
Şekil 3.12: *OeACBP*'nin sinyal peptit analizi.



**Şekil 3.13:** *OeACBP*'nin transmembran domain analizi.

### 3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

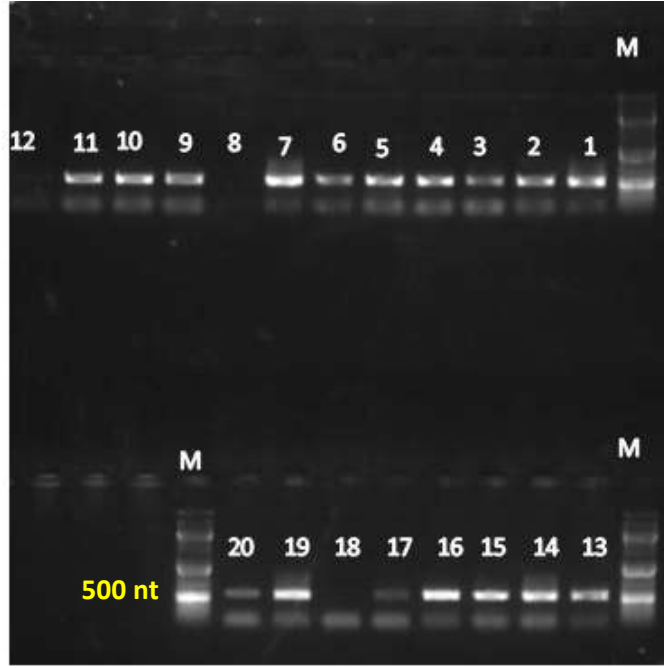
*OeACBP* gen dizisini baştan sona çoğaltacak 1 çift primer tasarlandı (bkz. Tablo 2.1). Tasarlanan primerlerin kontrolü için gDNA kalıp olarak kullanılarak PCR [65] kuruldu. Yaklaşık 500 nt'lik bir bölgede bant gözlemlendi. Bu da *OeACBP*'de intron olmadığını göstermiş oldu. (Şekil 3.14)



Şekil 3.14: *OeACBP* PCR [107] sonucu.

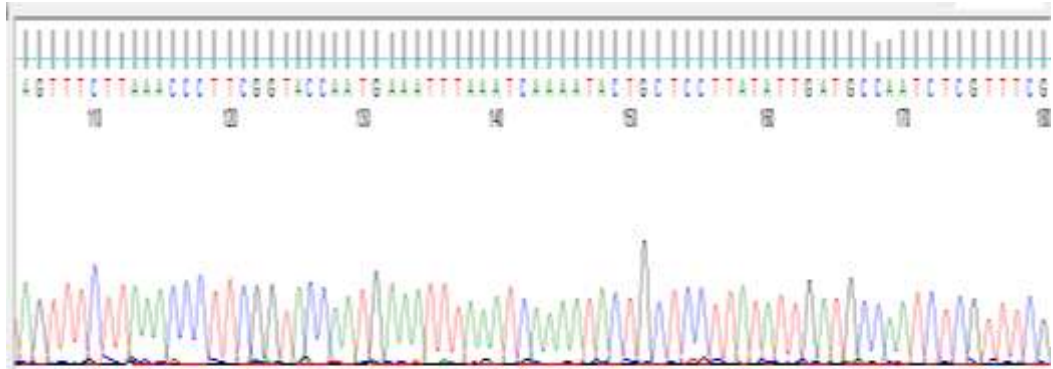
### 3.3 Polimorfizm Analizi

*OeACBP*'nin polimorfik olup olmadığını anlamak için Tablo 2.3'de gösterilen gDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak PCR [107] kuruldu. PCR ürünleri Şekil 3.15'de gösterildiği sırayla jele yüklendi. Sonrasında istenilen yerde parlak bant veren örnekler dizilemeye gönderildi ve dizileme sonuçları FinchTV programıyla kromatogramlar değerlendirildi (Şekil 3.16 ve 17). 23 tane zeytin çeşidinden 16 tanesinin sonucu güvenilir olduğu için polimorfizm analizi 16 tane zeytin çeşidiyle yapıldı. BioEdit [102] programıyla sağlam olan diziler arasında contig yapıldı, polimorfik bölgeler saptandı (Şekil 3.18). Phylogeny.fr programı ile Şekil 3.19'da gösterilen filogenetik ağaç oluşturuldu.

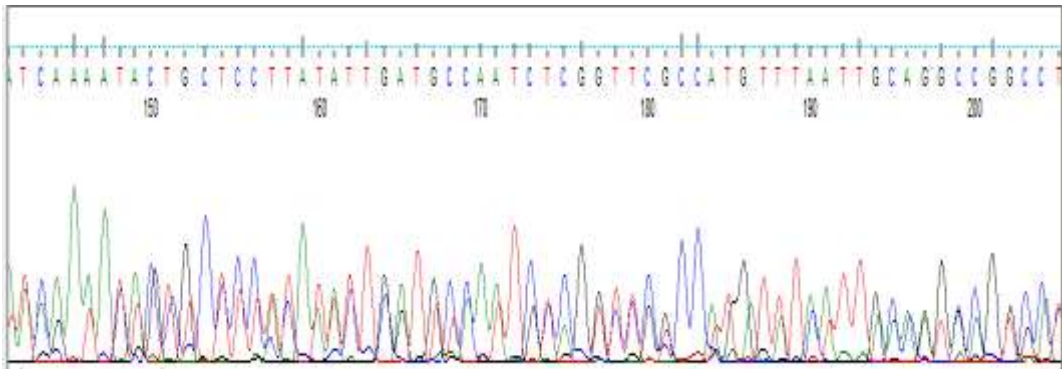


**Şekil 3.15:** Polimorfizm PCR [65] sonucu.

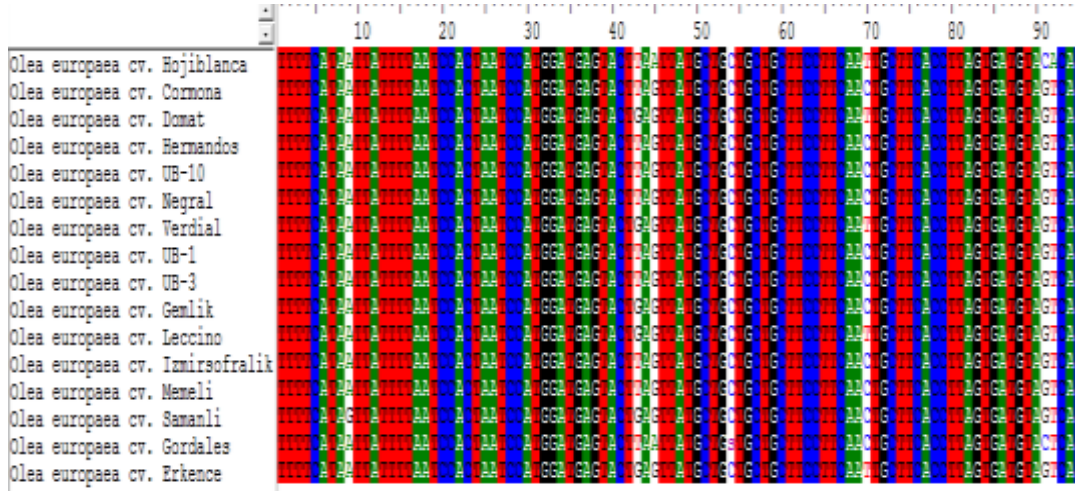
1- Hojiblanca, 2- Cormona, 3-Domat, 4-Hermandos, 5-UB 10, 6-Negral, 7-Memecik, 8-Çakır, 9- Verdial, 10-UB 1,11-UB 3, 12-Kiraz, 13-Gemlik, 14- Ascolana, 15- Leccino, 16- İzmir sofralık, 17- Uslu, 18- Ayvalık, 19- Edincik su, 20- Memeli.



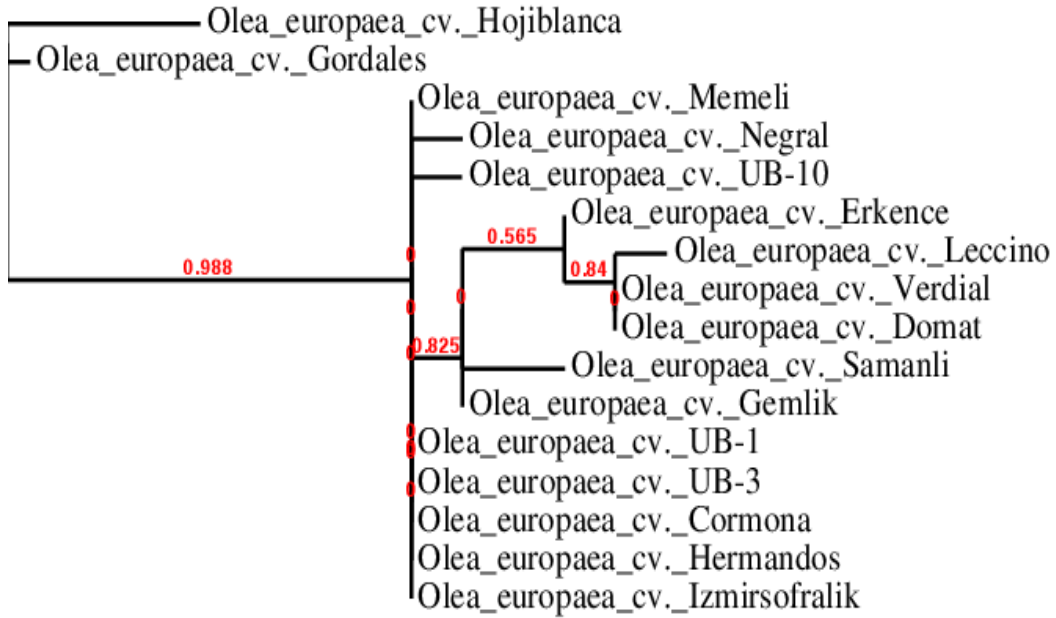
**Şekil 3.16:** Dizi analizinden gelen güvenilir bir kromatogram.



**Şekil 3.17:** Dizi analizinden gelen güvenilir olmayan bir kromatogram.



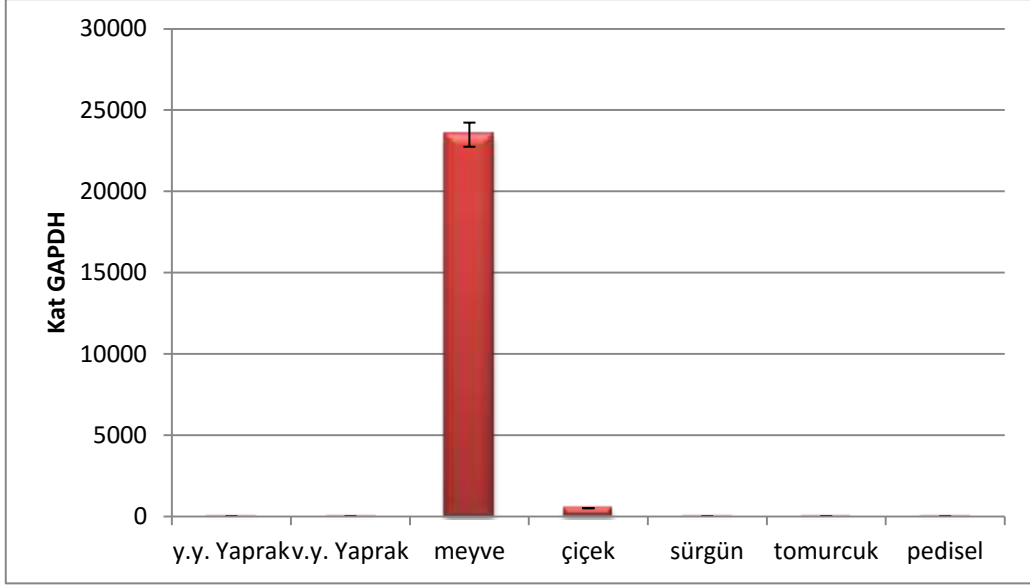
Şekil 3.18: Zeytin çeşitlerinin nükleotid dizilerinin karşılaştırılması.



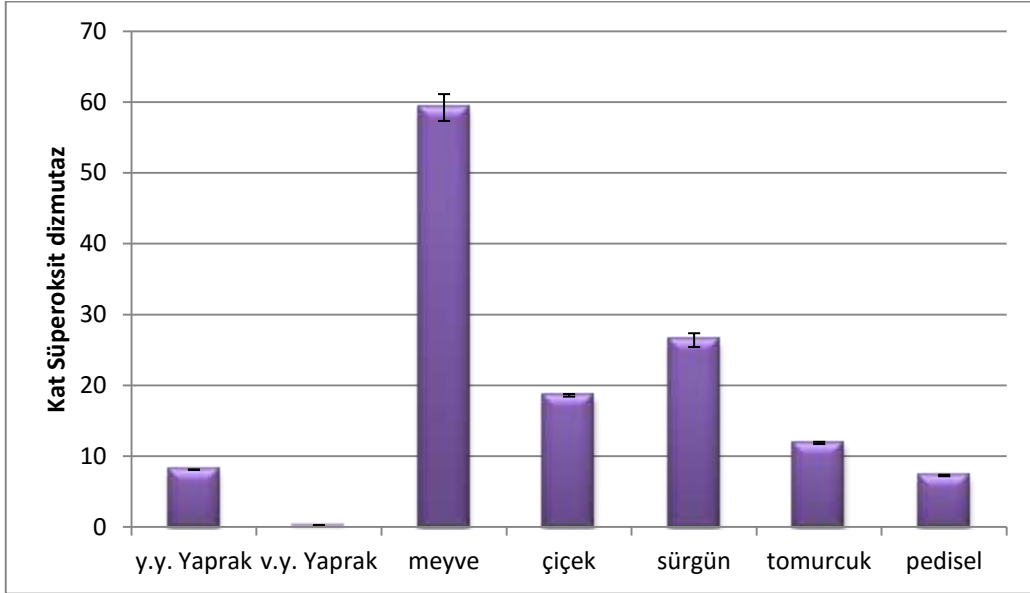
Şekil 3.19: Filogenetik ağaç.

### 3.4 *OeACBP*'nin Dokusal Ekspresyon Analizi

Zeytinin sürgün, meyve, pedisel, tomurcuk, yaprak ve çiçek organlarından izole edilen RNA'lardan elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak Tablo 2.1'de belirtilen primerler ile gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) [108] kurularak dokusal ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Excel'de gerekli tüm hesaplamalar yapıldı ve ekspresyon grafikleri oluşturuldu. Meyvede GAPDH'ten *OeACBP* yaklaşık 25000 kat, süperoksit dizmutaztan yaklaşık 60 kat daha fazla ifade edildiği Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de gösterilmiştir.



Şekil 3.20: *OeACBP*'nin GAPDH'e oranla zeytin organlarındaki ifadesi.



Şekil 3.21: *OeACBP*'nin süperoksit dizmutaza oranla ifadesi.

### 3.5 Klonlama ve Transformasyon

#### 3.5.1 DH10B'ye Transformasyon

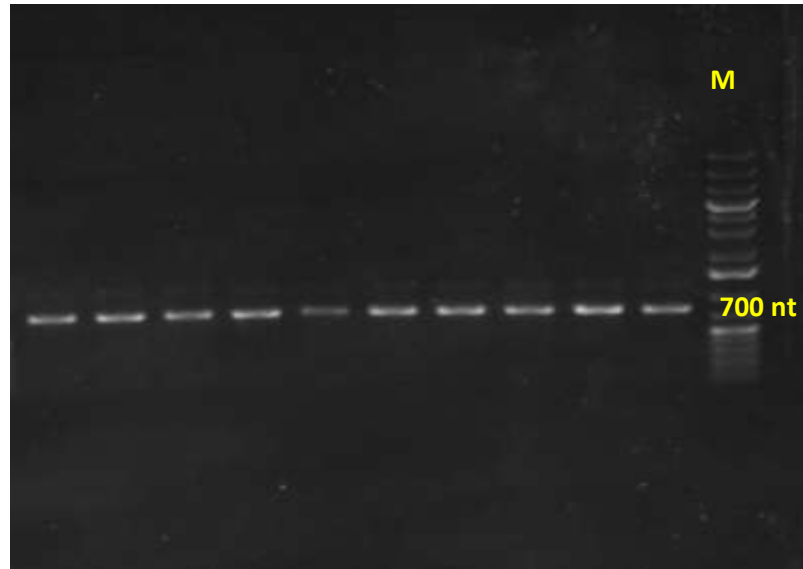
pLATE51'e klonlanan *OeACBP* E.coli'nin çoğaltma suşu DH10B'ye aktarıldı, 1 gece 37 °C'de inkübasyon sonucunda Şekil 3.22'de gösterildiği gibi bir üreme görüldü.



Şekil 3.22: DH10B'ye transformasyon sonucu.

### 3.5.2 Koloni PCR

DH10B transformasyonu sonucunda elde edilen 10 koloni seçilip 10  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O ile sulandırılarak klasik PCR için kalıp DNA olarak kullanıldı. PCR sonucu Şekil 3.23'de gösterildi.



Şekil 3.23: Koloni PCR jel görüntüsü.

Koloni PCR'da en iyi sonuç veren sulandırılmış koloni 10 mL'lik ampisilinli LB Broth'a ekilip 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılarak plazmit izolasyonu için önkültür hazırlandı ve Şekil 3.24'te gösterildi.



**Şekil 3.24:** Plazmit izolasyonu için hazırlanan önkültür.

### 3.5.1 BL21'e Transformasyon

Hazırlanan önkültürden plazmit izolasyonu yapıldı ve BL21'e aktarıldı. Bu ürün ampisilinli agara ekilerek 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Üreme sonucu Şekil 3.25'te gösterildi.



**Şekil 3.25:** BL21'e transformasyon sonucu.

Elde edilen kolonilerden tek bir tanesi seçilerek 10 mL'lik ampisilinli LB Broth'a ekildi ve 1 gece 37 °C'de inkübasyona bırakılarak protein izolasyonu için önkültür hazırlandı (Şekil 3.26).



**Şekil 3.26:** Protein izolasyonu için elde edilen önkültür.

Hazırlanan önkültürün tamamı 90 mL'lik ampsilinli LB Broth'a ekilerek iki saatte bir OD ölçümü yapıldı. OD 0.6 olduğunda IPTG ile indüklenerek protein sentezi başlatıldı (Şekil 3.27).



**Şekil 3.27:** Protein sentezi için hazırlanan kültür.

### 3.5.2 Hücrelerin Çöktürülmesi ve Lizis

1 gece 37 °C'de çalkanarak indüklenen kültürden protein sentezi gerçekleştirmiş olan hücreler çöktürüldü ve Şekil 3.28'de gösterildi. Elde edilen pelletten lizis işlemiyle protein elde edildi.

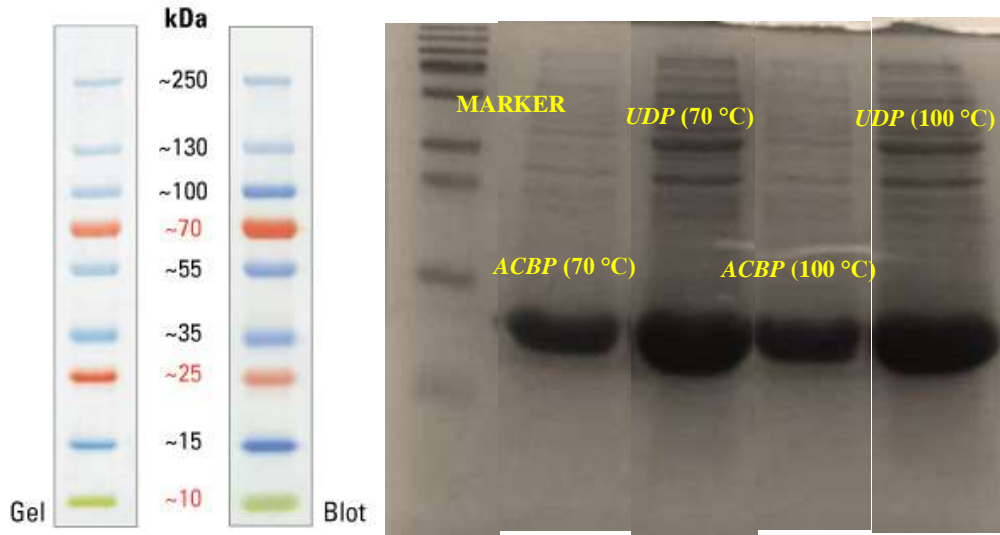


**Şekil 3.28:** Çöktürülmüş hücreler.

### 3.6 SDS PAGE Jel Elektrofözezi

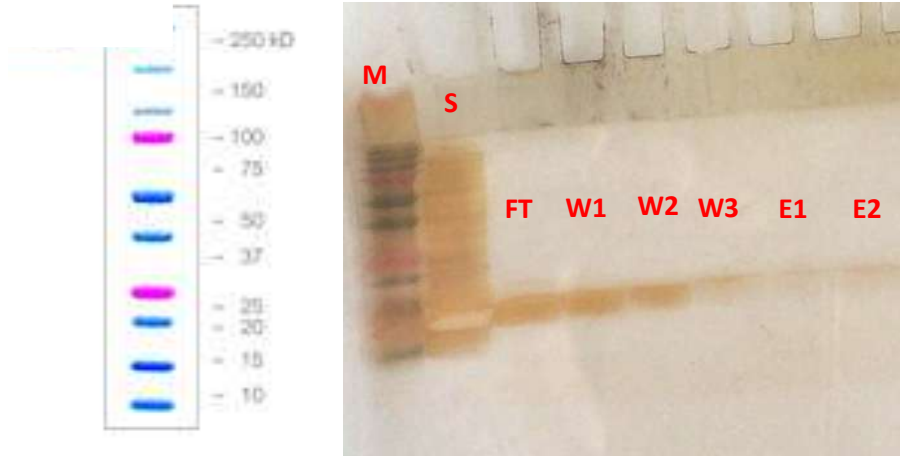
Elde edilen proteininin degrede olup olmadığını anlamak için protein iki şekilde hazırlandı. 10  $\mu$ L protein, 30  $\mu$ L buffer A ve 12  $\mu$ L boya eklenerek hazırlanan örneklerden biri 70 °C'de 5 dakika, diğeri 100 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve kontrol olarak daha önceden çalışılmış *UDP* geni kullanıldı. SDS PAGE jel elektrofözezinde yürütüldü (Şekil 3.29). Commasie Blue ile boyanan jel UV transimilatörde görüntülendi (Şekil 3.30).

Saflaştırma yapılarak gümüş boyama yapıldı. Şekil 3.31'de gösterildiği üzere elüsyonda lizozim olabileceğini düşündüren boyutta bir bant gözlemlendi.



Şekil 3.29: Commasie Blue ile yapılan SDS PAGE jel görüntüsü.

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No: 26616).

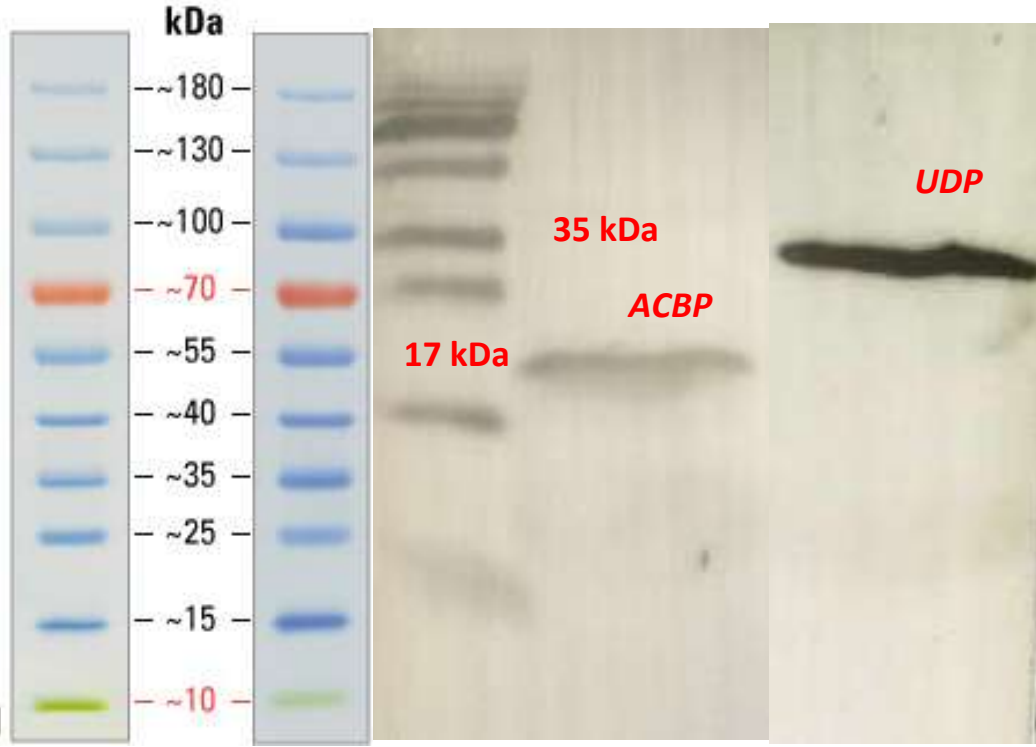


Şekil 3.30: Gümüş boyama ile yapılan SDS PAGE jel görüntüsü.

Precision Plus Protein™ Standarts (Hercules, Kaliforniya, ABD, Kat. No: 161-0374).

### 3.7 Western Blot

Kontrol olarak *UDP* geni kullanılarak yapılan Western Blot sonucu Şekil 3.31'de gösterilmiştir. 34 kDa büyüklüğünde olan *UDP* proteini olması gereken yerde bant gösterdi. 10 kDa büyüklüğündeki *ACBP* proteini yaklaşık 17 kDa büyüklüğünde bir bant gösterdi.



**Şekil 3.31:** Western Blot görüntüsü ve kullanılan marker.

PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Waltham, Massachusetts, ABD, Kat. No: 26616).

#### 4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zeytin cDNA kütüphanesinden alınan "F13F17" olarak adlandırılan gen için yapılan BLASTp sonucuna göre, Açıl-KoA bağlanma proteini gen ailesinin bir üyesi olarak bulunmuştur. Bu gen ailesi bitkilerde dört sınıfa ayrılmıştır (Sınıf I-IV) [36]. Zeytin *ACBP*'nin (*OeACBP*), 88 aminoasit içerdiği ve moleküler ağırlığının yaklaşık 10 kDa olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak *ACBP*'nin sınıflara ayrılması nedeniyle içerdiği aminoasit sayısı ve moleküler ağırlığı 10.4'ten (92 aminoasit) 73.1 kDa'a (668 aminoasit) kadar değişmektedir [10].

İçerdiği aminoasit sayısı ve moleküler büyüklüğü sebebiyle Sınıf I'e [37] dahil olduğu düşünülen *OeACBP*'nin, aminoasitlerden en çok alanin, glutamik asit ve lizin içerdiği belirlenmiştir. Bugüne kadar taranmış literatür bilgilerinde hidrofobik bir protein olarak tanımlanan *ACBP*'nin [18], yapısındaki polar ve yüksüz olan alanin nedeniyle hidrofobik olsa da, polar asidik olan glutamik asit ve polar bazik olan lizin nedeniyle hidrofilik özellik de gösterebildiği tespit edilmiştir.

NCBI veri tabanında yapılan BLASTp sonucunda *OeACBP*'nin, en çok *Digitalis lanata ACBP*'ne benzerlik gösterdiği tespit edilmiş ve Cn3D programıyla proteinin 3 boyutlu yapısı incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda proteinin 4  $\alpha$ -heliks yapı şeklinde katlandığı tespit edilmiş ve yine literatürde de yapısında 4  $\alpha$ -heliks yapı bulundurduğu görülmüştür [13]. *OeACBP*'nin izoelektrik pH değerinin 5.85 olduğu tespit edilmiştir, fakat şu ana kadar ulaşılabilen ve taranan literatür bilgilerinde izoelektrik noktasıyla ilgili bilgiye rastlanmamıştır.

Hücre içi lokalizasyonunu bulmaya yönelik yapılan biyoinformatik analiz sonucunda *OeACBP*'nin, sitoplazmik ve suda çözünür bir protein olduğu görülmüştür. *ACBP*, şu ana kadar bitkide plazma membranında, veziküllerde, endoplazmik retikulumda, golgide, sitoplazmada, çekirdek zarı ve peroksizomlarda tespit edilmiş [12] olsa da, temel görevlerine yönelik yapılan literatür taramaları sonucunda sitoplazmik bir protein olduğu göze çarpmaktadır [55,56].

*OeACBP*'nin yapısında, sinyal peptit ve transmembran domain bulundurmadığı tespit edilmiştir. Sınıf I de yapısında sinyal peptit ve transmembran domain bulunmaz [37,42]. *OeACBP*, yukarıda da belirtilen aminoasit sayısı, moleküler büyüklüğü ve bu domain yapısı sebebiyle Sınıf I'e dahil edilebilir.

460 nükleotitten oluşan *OeACBP*'nin, yapılan klasik PCR [107] sonucu oluşan ürünün dizilenmesiyle, intron içermediği tespit edilmiştir. Bu nedenle intron tespiti için biyoinformatik analize gerek kalmamıştır.

Tablo 2.3'te gösterilen 23 çeşit zeytin ile polimorfizm çalışması yapılmış ve bu çeşitlerden 16 tanesi doğru sonuç vermiştir. Bu 16 çeşit ile polimorfizm analizi yapılmış SNP bölgeleri belirlenmiş ve filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Filogenetik ağaç sonucuna göre, zeytin çeşitleri genetik uzaklık bakımından temel olarak iki gruba ayrılmıştır. İlk grupta Hojiblanca ve Gordales yer alırken, diğer çeşitler geriye kalan çeşitler ikinci grupta dallanma göstermiştir. İlerleyen dönemlerde, *ACBP*'nin yağ biyosentezinde temel bir görevi olduğu bilindiğinden [89], birbirine yakın, aynı grupta ya da benzer olan çeşitlerde yağ kalitesi kontrolü yapılabilir.

*OeACBP*'nin zeytinin hangi organında, normalizatör olarak kullanılan genlere oranla ne kadar fazla ifade edildiğini bulmaya yönelik yapılan Real -Time PCR (RT-PCR) yani dokusal ekspresyon sonucunda, zeytinin meyvesinde GAPDH'ten yaklaşık 25000 kat, süperoksit dizmutaztan yaklaşık 60 kat daha fazla ifade edildiği bulunmuştur. Bu kadar fazla kat ifade edilmesi çok güvenilir görünmese de, yağ biyosentezinde temel görev alan bir genin [89] en çok meyvede ifade edilmesi sonuçları tutarlı halde getirmektedir.

Genden proteine ilkesine dayanılarak yapılan bu tez çalışmasının içerisinde yer alan protein eldesinde üç metot kullanıldı. İlk kullanılan lizis metodundan istenilen kalitede protein elde edilemedi. Bu nedenle iki farklı alternatif lizis yöntemi kullanıldı. Lizozim kullanılarak yapılan ilk alternatif metottan elde edilen sonuçtan tam emin olunamadı. Bunun nedeni ise lizozim ile *ACBP*'nin aynı büyüklüğe sahip olmasıydı. Çıkan sonucun lizozim mi yoksa *ACBP* mi olduğunu anlayabilmek için ikinci alternatif metot olan ultrasonik banyo kullanılarak lizis işlemi gerçekleştirildi. Mateyal ve metot bölümünde bahsedilen bu alternatif lizis yönteminden elde edilen protein kullanılarak SDS PAGE jel elektroforezi yapıldı. Bu

aşamada da iki yöntem kullanıldı. Bunlardan birisi Commasie Blue boyama tekniği diğer ise saflaştırılmış protein ile yapılan gümüş boyama tekniği. Commasie Blue tekniğinde lizozime ait olduğu düşünülen bir bant gözlenmesine rağmen gümüş boyama tekniğinde yeteri kadar net olmayan fakat istenilen yerde bir bant gözlendi. Gümüş boyama tekniğinden tam olarak yeterli sonuç elde edilemediği için protein saflaştırma işleminde değişikliğe gidildi ve Nİ-NTA kolon kullanılarak saflaştırma yapıldı. Bu işlem sonucunda da net olmamakla birlikte istenilen yerde bant gözlendi ve protein varlığından emin olundu.

Western Blot tekniğininin içinde yer alan membrana transfer aşamasında da değişiklik yapıldı. Normal olarak nitroselüloz membrana transfer aşaması 7 dakika yapıldığında herhangi bir sonuç elde edilemezken PVDF membran kullanılarak 1 gece yapılan transfer işlemi sonucunda tek ve net bir bant sonucu elde edildi.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Ruguni, E., ‘‘Olive (Olea europaea L.)’’,(ed: Y.P.S. Bajaj), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*: Vol. 1, Berlin Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 253-254, (1986).
- [2] Breton, C.M., Warnock, P. and Berville, A.T., ‘‘Orijin and History of the Olive’’, (ed: I. Muzzalupo), *Olive Germplasm- The Olive Cultivation, Table Olive and Olive Oil Industry in Italy*, Croatia:InTech, (2012).
- [3] Altinyay, C., Guvenc, A. and Altun, M.L., ‘‘Antioxidant activities of Oleuropen and the Aqueous Extracts of Olea europaea L. varities Growing in Turkey’’, *Turk J. Pharm. Sci.*, 8(1), 23-30, (2011).
- [4] Darlington, C. D. and Wylie, A.P., *Chromosome atlas of flowering plants*, London: Allen and Unwin, (1961).
- [5] Loussert, R. and Brousse G., ‘‘L’Olivier’’, (ed: J-F. Leroy), *Journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée*: Vol. 24(4), Paris: JATBA(Laboratoire d'ethnobotanique et d'ethnozoologie), 345, (1978).
- [6] Food and Agriculture Organization, *FAO Production Yearbook:1982*, Vol, 26, Rome, Italy: FAO, (1983).
- [7] Principe, D. V., *Dünya Zeytin Ansiklopedisi*, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, (1988).
- [8] Kiralan, M., Bayrak, A. and Ozkaya, M., ‘‘Oxidation Stability of Virgin Olive Oils from Some Important Cultivars in East Mediterranean Area in Turkey’’, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 86, 247-252, (2008),
- [9] Gaigg, B., Neegaard, T.B., Schneiter, R., Handsen, J.K., Førgman, N.J., Jensen, N. A., et. al., ‘‘ Depletion of Acyl-Coenzyme A Binding Protein Affects Sphingolipid Synthesis and Causes Vesicle Accumulation and

Membrane Defects in *Saccharomyces cerevisia*”, *Molecular Biology of the Cell*, 12, 1147-1160, (2001).

- [10] Chye, M.L., ‘‘Plant Acyl-KoA Binding Proteins Are Involved in Stress and Development’’, *Progress in Lipid Research*, 50(2), 141-151, (2011).
- [11] Kragelund, B.B., Hujrup, P., Jensen, M.S., Schjerling, C.K., Juul, E., Knudsen, J., et.al., ‘‘Fast and One-Step Folding of Closely and Distantly Related Homologous Proteins of a Four-helix Bundle Family’’, *J. Mol. Biol.*, 256 (1), 187-200, (1996).
- [12] Lung, S.C. and Chye, M.L., ‘‘Deciphering the Roles of Acyl-KoA Binding Proteins in Plant Cells’’, *Protoplasma*, (2015).
- [13] Kragelund, B.B., Andersen, K.V., Medsen, J.C., Knudsen, J. and Poulsen, F.M., ‘‘Three-Dimensional Structure of the Complex Between Acyl-Coenzyme A Binding Protein and Palmitoyl-Coenzyme A’’, *J. Mol. Biol.*, 230, 1260-1277, (1983).
- [14] Andersen, K.V. and Poulsen, F.M., ‘‘Three-Dimensional Structure in Solution of Acyl-Coenzyme A Binding Protein from Bovine Liver’’, *J. Mol. Biol.*, 226, 1131-1141, (1992).
- [15] Andersen, K.V. and Poulsen, F.M., ‘‘Three-Dimensional Structure of Acyl-Coenzyme A Binding Protein from Bovine Liver: Structural Refinement Using Heteronuclear Multi-dimensional NMR Spectroscopy’’, *J. Mol. Biol.*, 3, 271-284, (1993).
- [16] Moding, K., Jurgensen, V.W., Lindorff-Lorsen, K., Fieber, W., Bohr, H.G. and Poulsen, F.M., ‘‘Detection of Initiation Sites in Protein Folding of the Four-Helix Bundle ACBP by Chemical Shift Analysis’’, *FEBS Lett*, 581, 4965-71, (2007).
- [17] Thomsen, J.K., Kragelund, B.B., Teilum, K., Knudsen, J. and Poulsen, F.M., ‘‘Transient Intermediary States With High and Low Folding Probabilities in the Apparent Two-state Folding Equilibrium of ACBP at Low pH’’, *J. Mol. Biol.*, 318, 805-14, (2002).

- [18] Arya, R., Sundd, M. and Kundu, S., ‘‘Structural and Functional Aspects of Acyl-Coenzyme A Binding Proteins (ACBPs): A Comprehensive Review’’, *Journal of Proteins and Proteomics*, 3(1), 67-71, (2012).
- [19] Ozenne, V., Noel, K.J., Heidersson, P.O., Brander, S., Poulsen, F.M., Jensen, M.R., et. al., ‘‘Exploring the Minimally Frustrated Energy Landscape of Unfolded ACBP’’, *J. Mol. Biol.*, 426, 722-734, (2014).
- [20] Kragelund, B.B., Poulsen, K., Andersen, K.V., Baldursson, T., Knoll, J.B., Neergaard, T.B., et. al., ‘‘Conserved Residues and Their Role in the Structure, Function and Stability of Acyl-Coenzyme A Binding Protein’’, *Biochemistry*, 38, 2386-2394, (1999b).
- [21] Gray, P., Glaister, D., Seeberg, A., Guidatti, A. and Costa, E., ‘‘Cloning and Expression of cDNA for Human Diazepam Binding Inhibitor, a Natural Ligand of an Allosteric Regulatory Site of the  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type a Receptor’’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83, 7547-7551, (1986).
- [22] Morquardt, H., Todaro, G. and Shoyob, M., ‘‘Complete Aminoacid Sequence of Bovine and Human Endozepines. Homology With Rat Diazepam Binding Inhibitor’’, *J. Biol. Chem.*, 261, 9727-9731, (1986).
- [23] Knudsen, J., Højrup, P., Hansen, H.O., Hansen, H.F. and Roepstorff, P., ‘‘Acyl-KoA Binding Protein in the Rat. Purification, Binding Characteristics, Tissue Concentrations and Aminoacid Sequence’’, *Biochem J.*, 262(2), 513-519, (1989).
- [24] Owens, G.P., Sinha, A.K., Sikela, J.M. and Hahn, W.E., ‘‘Sequence and Expression of the Murine Diazepam Binding Inhibitor’’, *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 6(2-3), 101-8, (1989).
- [25] Mikkelsen, J., Højrup, P., Rasmussen, M.M., Roepstorff, P. and Knudsen, J., ‘‘Aminoacid Sequence of Acyl-KoA Binding Protein from Cow Liver’’, *Biochem J.*, 245(3), 857-861, (1987).

- [26] Chen, Z., Agerbeth, B., Gell, K., Andersen, M., Mutt, V., Ostenson, C-G., et. al., ‘Isolation and Characterization of Porcine Diazepam-Binding Inhibitor, a Polypeptide not Only of Cerebral Occurrence but Also Common in Intestinal Tissues and With Effects on Regulation of Insulin Release’, *European Journal of Biochemistry*, 174, 239-245, (1988).
- [27] Lihmann, I., Plaquet, J.C., Tostivint, H., Rajimakers, R., Tonon, M.C., Conlon, J.M., et. al., ‘Frog Diazepam-Binding Inhibitor: Peptide Sequence, cDNA Cloning and Expression in the Brain’, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91(5), 6899-903, (1994).
- [28] Kolmer, M., Roos, C., Tirranen, M., Myhlanen, S. and Alho, H., ‘Tissue-Specific Expression of the Diazepam-Binding Inhibitor in *Drosophila melanogaster*: Cloning, Structure and Localization of the Gene’, *Mol. Cell Biol.*, 14(10), 6983-6995, (1994).
- [29] Knudsen, J., Førgeman, N.J., Skøtt, H., Hummel, R., Børsting, C., Rose, T.M., et. al., ‘Yeast Acyl-CoA Binding Protein: Acyl-CoA-Binding Affinity and Effect on Intracellular Acyl-CoA Pool Size’, *Biochem J.*, 302, 917-920, (1994).
- [30] Hills, M.J., Dann, R., Lydiate, D. and Sharpe, A., ‘Molecular Cloning of a cDNA from *Brassica napus* L. for a Homologue of Acyl-CoA-Binding Protein’, *Plant Mol. Biol.*, 25, 917-920, (1994).
- [31] Reddy, A.S., Ranganathan, B., Haisler, R.M. and Swize, M.A., ‘A cDNA Encoding Acyl-CoA-Binding Protein from Cotton’, *Plant Physiol.*, 111, 348, (1996).
- [32] Push, W., Bolvers, M., Hunt, N. and Ivell, R., ‘A Novel Endozepine Like-Peptide (ELP) is Exclusively Expressed in Male Germ Cells’, *Mol. Cell Endocrinol.*, 122, 69-80, (1996).
- [33] Kragelund, B.B., Knudsen, J. and Poulsen, F.M., ‘Acyl-Coenzyme A Binding Protein (ACBP)’, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1441(2-3), 150-161, (1999).

- [34] Knudsen, J., Neegaard, T.B., Gaigg, B., Jensen, H.V. and Hansen, J.K., ‘‘ Role of Acyl-KoA Binding Protein in Acyl-KoA Metabolism and Acyl-KoA-Mediated Cell Signaling’’, *J. Nutr.*, 130, 294-298, (2000).
- [35] Pusch, W., Balvers, M., Bathgate, R. and Ivell, R., ‘‘ Binding of Acylated Peptides and Fatty Acids to Phospholipid Vesicles: Pertinence to Myristoylated Proteins. *Molecular Cloning and Gonadal Expression of a Rat ELP cDNA*’’, Proc. 10<sup>th</sup> European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis Capri, Italy (obs.), 19(1), 122, (1998).
- [36] Meng, W., Su, Y.C.F., Sounders, R.M.K. and Chye, M.L., ‘‘The Rice Acyl-KoA Binding Protein Gene Family: Phylogeny, Expression and Functional Analysis’’, *New Phytologist*, 189, 1170-1184, (2011).
- [37] Burton, M., Rose, T.M., Førgeman N.J. and Knudsen, J., ‘‘Evolution of the Acyl-KoA Binding Protein (ACBP)’’, *Journal of Biochemistry*, 392, 299-307, (2005).
- [38] Li, H.Y. and Chye, M.L., ‘‘Arabidopsis Acyl-KoA Binding Protein ACBP2 Interacts with an Ethylene Responsive Element Binding Protein AtEBP via Its Ankyrin Repeats’’, *Plant Molecular Biology*, 54, 233-243, (2004).
- [39] Gao, W., Xiao, S., Li, H.Y., Tsao, S.W. and Chye, M.L., ‘‘Arabidopsis thaliana Acyl-KoA Binding Protein ACBP2 Interacts with a Heavy-Metal Binding Protein AtFBP6’’, *New Phytologist*, 181, 89-102, (2008).
- [40] Gao, W., Li, H.Y., Xiao, S. and Chye, M.L., ‘‘Acyl-KoA Binding Protein 2 Binds Lysophospholipase 2 and lysoPC to Promote Tolerance to Cadmium-Induced Oxidative Stress in Transgenic Arabidopsis’’, *Plant Journal*, 62, 989-1003, (2010).
- [41] Li, H.Y., Xiao, S. and Chye, M.L., ‘‘Ethylene and Pathogen Inducible Arabidopsis Acyl-KoA Binding Protein 4 Interacts with an Ethylene Responsive Element Binding Protein’’, *Journal of Experimental Botany*, 59, 3997-4006, (2008).

- [42]Lung, S.C. and Chye M. L., "The Binding Versatility of Plant Acyl-KoA Binding Proteins and Their Significance in Lipid Metabolism", *Biochimica et Biophysica Acta*, (in press), (2015).
- [43]Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, IAD., Tang H., Wang, X., et. al., "Early Allopolyploid Evolution in the Past-Neolithic Brassica napus Oilseed Genome", *Science*, 345, 950, (2014).
- [44]Rabonathairy, N.H., Lu, G. and Li, M., "Computational Prediction of Acyl-KoA Binding Proteins Structure in Brassica napus", *PLoS ONE*, 10(6), (2015).
- [45]Xiao, S. and Chye, M.L., "An Arabidopsis Family of Six Acyl-KoA Binding Proteins has Three Cytosolic Members", *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 479-484, (2009).
- [46]Tanz, S. K., Casrleden, I., Hooper, C.M., Nacher, M., Small, I. and Millar, H.A., "SUBA3: A Database for Integrating Experimentation and Prediction to Define the Subcellular Location of Proteins in Arabidopsis", *Nucleic Acid Research*, 1-7, (2012).
- [47]Sun, Q., Zybilov, B., Majeran, W., Frisa, G., Olinares, P.D.B. and Van W.K.J., "PPDB the Plant Proteomics Database at Cornell", *Nucleic Acids Research*, 37, (2009).
- [48]Fukao, Y., Hayashi, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M., "Novel Glyoxysomal Protein Kinase GPK1 Identified by Proteomic Analysis of Glyoxysomes in Etiolated Cotyledons of Arabidopsis thaliana", *Plant Cell Physiol.*, 44, 1002-1012, (2003).
- [49]Ito, J., Batth, T.S., Petzold, C.J., Redding-Johanson, A.M., Mukhopadinyay, A., Verboom, R., et. al., "Analysis of Arabidopsis Cytosolic Proteome Highlights Subcellular Partitioning of Central Plant Metabolism", *J. Proteome, Res.*, 10, 1571-1582, (2011).
- [50]Janes, A.M.E., MacLean, D., Studholme, D.J., Serna-Sariz, A., Andreasson, E., Rathjen, J.P., et. al., "Phosphoproteomic Analysis of

Nucleic-Enriched Fractions from *Arabidopsis thaliana*”, *J. Proteomics*, 72, 439-451, (2009).

- [51] Benschop, J., J., Mohammed, S., O’Flaherty, M., Heck, A.J.R., Slijper, M. and Menke, F.L.H., “Quantitative Phosphoproteomics of Early Elicitor Signaling in *Arabidopsis*”, *Mol. Cell Proteomics*, 6, 1198-1214, (2007).
- [52] Mishkin, S. and Turcotte, R., “The Binding of Long Chain Fatty Acid CoA to Z, a Cytoplasmic Protein Present in Liver and Other Tissues of The Rat”, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 57, 918-926, (1974a).
- [53] Rolf, B., Oudenampsen Kruger, E., Borchers, T., Føergman, N.J., Knudsen, J., Lezius, A., et. al., “ Analysis of the Ligand Binding Properties of Recombinant Bovine Liver-Type Fatty Acid Binding Protein”, *Biochim. Biophys. Acta*, 1259, 245-253, (1995).
- [54] Bass, N.M., “ The Cellular Fatty Acid Binding Proteins: Arabidopsis of Structure, Regulation and Function”, *Int. Rev. Cytol.*, 111, 143-183, (1988).
- [55] Mogensen, I.B., Schulenberg, H., Hansen, H. O., Spener, F. and Knudsen, J., “ A Novel Acyl-CoA Binding Protein from Bovine-Liver”, *Biochem. J.*, 241, 189-192, (1987).
- [56] Mikkelsen, J. and Knudsen, J., “ Acyl-CoA Binding Protein from cow. Binding Characteristics and Cellular and Tissue Distribution”, *Biochem. J.*, 248, 709-714, (1987).
- [57] Stumpf, P.K., “A Retrospective View of Plant Lipid Research”, *Progress in Lipid Research*, 33, 1-8, (1994).
- [58] Napier, J.A. and Haslam, R.P., “As Simple as ACB- New Insight into the Role of Acyl-CoA Binding Proteins in *Arabidopsis*”, *New Phytologist*, 186, 781-783, (2010).
- [59] Ohlroqge, J.B., Browse, J. and Somerville, C.R., “The Genetics of Plant Lipids”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1082, 1-26, (1991).

- [60] Lu, C., Xin, Z., Ren, Z., Miquel, M. and Browse, J., "An Enzyme Regulating Triacylglycerol Composition is Encoded by the RoD1 Gene of Arabidopsis", *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, 106, 18837-18842, (2009).
- [61] Somerville, C. and Browse, J., "Dissecting Desaturation: Plants Prove Advantageous", *Trends in Cell Biology*, 6, 148-153, (1996).
- [62] Chen, Q.F., Xiao, S. and Chye, M.L., "Overexpression of the Arabidopsis 10 kilodalton Acyl-Coenzyme A Binding Protein ACBP6 Enhances Freezing Tolerance", *Plant Physiology*, 148, 304-315, (2008).
- [63] Xiao, S., Gao, W., Chen, Q.F., Romalingam, S. and Chye, M.L., "Overexpression of Membrane-Associated Acyl-KoA Binding Protein ACBP1 Enhances Lead Tolerance in Arabidopsis", *Plant Journal*, 54, 141-151, (2008).
- [64] Du, Z.Y., Chen, M.X., Chen, Q.F., Xiao, S. and Chye, M.L., "Arabidopsis Acyl-KoA Binding Protein ACBP1 Participates in the Regulation of Seed Germination and Seedling Development", *Plant J.*, 74, 294-309, (2013b).
- [65] Chye, M.L., Huang, B.Q. and Zee, S.Y., "Isolation of a Gene Encoding Arabidopsis Membrane-Associated Acyl-KoA Binding Protein and Immunolocalization of Its Gene Product", *Plant J.*, 18, 205-14, (1999).
- [66] Chen, Q.F., Xiao, S., Qi, W.Q., Mishra, G., Na, J., Wang, M., et. al., "The Arabidopsis *acbp1acbp2* Double Mutant Lacking the Acyl-KoA Binding Proteins ACBP1 and ACBP2 is Embryo Lethal", *New Phytol.*, 186, 843-55, (2010).
- [67] Gao, W., Li, H.Y., Xiao, S. and Chye, M.L., "Protein Interactors of Acyl-KoA Binding Protein ACBP2 Mediate Cadmium Tolerance in Arabidopsis", *Plant Signal Behav.*, 5, 1025-1027, (2010b).
- [68] Licausi, F., Kasmacz, M., Weits, D.A., Giuntoli, B., Giargi, F.M., Voisenek, L.A.C.J., et. al., "Oxygen Sensing in Plants is Mediated by an

N-End Rule Pathway for Protein Destabilization’’, *Nature*, 479, 419-422, (2011).

- [69] Xie, L.J., Yu, L.J., Chen, Q.F., Wang, F.Z., Huang, L., Xia, F.N., et. al., ‘‘ Arabidopsis Acyl-KoA Binding Protein ACBP3 Participates in Plant Response to Hypoxia by Modulating Very-Long Chain Fatty Acid Metabolism’’, *Plant J.*, 81, 53-67, (2015).
- [70] Xue, Y., Xiao, S., Kim, J., Lung, S.C., Chen, L., Tanner, J.A., et. al., ‘‘ Arabidopsis Membrane-Associated Acyl-KoA Binding Protein ACBP1 in Invold in Stem Cuticle Formation’’, *J. Exp. Bot.*, 65, 5473-5483, (2014).
- [71] Xia, Y., Yu, K., Gao, Q.M., Wilson, E.V., Navarre, D., Kachroo, P., et. al., ‘‘ Acyl-KoA Binding Proteins are Required for Cuticle Formation and Plant Responces to Microbes’’, *Front Plant Sci.*, 3, 224, (2012).
- [72] Xia, S., Gao, W., Chen, Q.F., Chan, S.W., Zheng, S.X., Ma, J., et. al., ‘‘ Overexpression of Arabidopsis Acyl-KoA Bindig Protein ACBP3 Promates Starvation-Induced and Age- Dependent Leaf Senescence’’, *Plant Cell*, 22, 1463-1482, (2010).
- [73] Leung, K.C., Li, H.Y., Xia, S., Tse, M.H. and Chye, M.L., ‘‘ Arabidopsis ACBP3 is an Extracellularly Targeted Acyl-KoA Binding Protein’’, *Planta*, 223, 871-881, (2006).
- [74] Xiao, S. and Chye, M.L., ‘‘ Overexpression of Arabidopsis ACBP3 Enhances NPR1-Dependent Plant Resistance to Pseudomonas syringae pv Tomato DC3000’’, *Plant Physiol.*, 156, 2069-2081, (2011b).
- [75] Takato, H., Shimidzu, M., Ashizawa, Y., Takei, H. and Suzuki, S., ‘‘ An Acyl-KoA Binding Protein from Grape That is Induced Through ER Stress Confers Morphological Changes and Disease Resistance in Arabidopsis’’, *J. Plant Physiol.*, 170, 591-600, (2013).
- [76] Yurchenko, O.P., Nykiforuk, C.L., Moloney, M.M., Stahl, U., Banas, A., Stymne, S., et. al., ‘‘ A 10 kDa Acyl-KoA Binding Protein (ACBP) from

Brassica napus Enhances Acyl Exchange Between Acyl-KoA and Phosphotidylcholine”, *Plant Biotechnol. J.*, 7, 602-610, (2009).

[77] Yurchenko, O., Singer S.D., Nykiforuk, C.L., Gidda, S., Mullen, R.T., Moloney, M.M., et. al., “ Production of a Brassica napus Low Molecular Mass Acyl-Coenzyme A Binding Protein in Arabidopsis Alters the Acyl-Coenzyme A Pool and Acyl Composition of Oil in Seeds”, *Plant Physiol.*, 165, 550-560, (2014).

[78] Hsiao, A.S., Haslam, R.P., Michaelson, L.V., Liao, P., Chen, Q.F., S, Sooriyaarachci, S., et. al., “Arabidopsis Cytosolic Acyl-KoA Binding Proteins ACBP4, ACBP5 and ACBP6 have Overlapping but Distinct Roles in Seed Development”, *Biosci. Rep.*, 34: e00165, (2014a).

[79] Meng, W., Hsiao, A.S., Gao, C., Jiang, L. and Chye, M.L., “ Subcellular Localization (ACBPs) Indicates that OsACBP6: GFP is Targeted to the Peroxisomas”, *New Phytol.*, 203, 469-482, (2014).

[80] Xiao, S., Chen, Q.F. and Chye, M.L., “ Light-Regulated Arabidopsis ACBP4 and ACBP5 Encode Cytosolic Acyl-KoA Binding Proteins that Bind Phosphotidylcholine and Oleoyl-KoA Ester”, *Plant Physiol. Biochem.*, 47,926-33, (2009).

[81] Føergman, N.J. and Knudsen, J., “ Role of Long-Chain Fatty Acyl-KoA Esters in the Regulation of Metabolism and in Cell Signalling”, *Biochem. J.*, 323, 1-12, (1997).

[82] Leung, K.C., Li, H.Y., Mishra, G. and Chye, M.L., “ACBP4 and ACBP5, Novel Arabidopsis Acyl-KoA Binding Proteins with Kelch Motifs that Bind Oleoyl-KoA”, *Plant Mol. Biol.*, 55, 297-309, (2004).

[83] Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazaka, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., et. al., “Formation Process of autophagosome is Traced with Apg8/Aut7p in Yeast”, *J. Cell Biol.*, 147, 435-46, (1999).

[84] Yashimota, K., Honaoka, H., Sato, S., Kato, K., Tabata, S., Noda, T., et. al., “Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins and Their

Deconjugation by ATG4s are Essential for Plant Autophagy”, *Plant Cell*, 16, 2967-83, (2004).

- [85] Xiao, S. and Chye, M.L., “The Arabidopsis thaliana ACBP3 Regulates Leaf Senescence by Modulating Phospholipid Metabolism and ATG8 Stability”, *Autophagy*, 6, 802-4, (2010).
- [86] Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F. and Malhatna, V., “Unconventional Secretion of Acb1 is Mediated by Autophagosomes”, *J. Cell Biol.*, 188, 527-36, (2010).
- [87] Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F. and Subramani, S., “Unconventional Secretion of Pichia pastoris Acb1 is Dependent on GRASP Protein Peroxisomal Functions Autophagosome Formation”, *J. Cell Biol.*, 188, 537-46, (2010).
- [88] Nickel, W., “Pathways of Unconventional Protein Secretion”, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 21, 621-6, (2010).
- [89] Xiao, S. and Chye, M.L., “New Roles for Acyl-CoA Binding Proteins (ACBPs) in Plant Development, Stress Responses and Lipid Metabolism”, *Progress Lipid Research*, 50, 141-151, (2011).
- [90] Fan, J., Liu, J., Culty, M. and Papadopoulos, V., “Acyl-Coenzyme A Binding Domain Containing 3 (ACBD3; PAP7; GCP60): An Emerging Signalling Molecule”, *Prog. Lipid Res.*, 49, 218-34, (2010).
- [91] Guidotti, A., Forchetti, C.M., Corda, M.G., Konkel, D., Bennet, C.D. and Costa, E., “Isolation, Characterization and Purification to Homogeneity of an Endogenous Polypeptide with Agonistic Action on Benzodiazepine Receptors”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80, 3531-5, (1983).
- [92] Smith, D.R., Kanng, M.W., Quintanilla-Vega, B. and Fowler, B.A., “High-Affinity Renal Lead Binding Proteins in Environmentally Exposed Humans”, *Chem. Biol. Interact.*, 115, 39-52, (1998).

- [93] Wang, X., ‘‘Lipid Signalling’’, *Curr Opin Plant Biol.*, 7(3), 329-36, (2004).
- [94] Li, W., Li, M., Zhang, W., Welti, R. and Wang, X., ‘‘ The Plasma Membrane-Bound Phospholipase D $\delta$  Enhances Freezing Tolerance in *Arabidopsis thaliana*’’,*Nat Biotechnol*, 22, 427–33, (2004).
- [95] Du, ZY., Xiao, S., Chen, QF. and Chye, ML., ‘‘ Depletion of the Membrane-Associated Acyl- KoA-Binding Protein ACBP1 Enhances the Ability of Cold Acclimation in *Arabidopsis*’’,*Plant Physiol.*, 152, 1585–97, (2010).
- [96] Rajashekar, CB., Zhou, HE., Zhang, Y., Li, W. and Wang, X., ‘‘Suppression of Phospholipase D $\alpha$ 1 Induces Freezing Tolerance in *Arabidopsis*: Response of Cold-Responsive Genes and Osmolyte Accumulation’’,*J Plant Physiol.*, 163, 916–26, (2006).
- [97] Buttner, M. and Singh, KB., ‘‘*Arabidopsis thaliana* Ethylene-Responsive Element Binding Protein (AtEBP), an Ethylene-Inducible, GCC Box DNA-Binding Protein Interacts with an ocs Element Binding Protein’’, *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 94, 5961–6, (1997).
- [98] Chye, ML., Li, HY. and Yung, MH., ‘‘Single Aminoacid Substitutions at the Acyl-KoA Binding Domain Interrupt 14[C] Palmitoyl-KoA Binding of ACBP2, an *Arabidopsis* Acyl-KoA-Binding Protein with Ankyrin Repeats’’, *Plant Mol. Biol.*, 44, 711–21, (2000).
- [99] Farmer, EE., Weber, H. and Vollenweider, S., ‘‘Fatty Acid Signaling in *Arabidopsis*’’,*Planta*, 206, 167–74, (1998).
- [100] Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., et. al., ‘‘Autophagy Negatively Regulates Cell Death by Controlling NPR1-Dependent Salicylic Acid Signaling During Senescence and the Innate Immune Response in *Arabidopsis*’’,*Plant Cell*, 21, 914–27, (2009).

- [101] Latschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W. and Lipman, D.J., ‘Basic Local Alignment Search Tool’, *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410, (1990).
- [102] Hall, T.A., ‘BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/Nt’, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98, (1998).
- [103] Reddy, B., Patel, A.K., Singh, K.M., Patil, D.B., Parikh, P.V., Kelawala, D.N., et. al., ‘De Novo Assembly and Transcriptome Characterization of Canine Retina Using High-Throughput Sequencing’, *Genet. Res. Int.*, (2015).
- [104] Porter, S.G., Doy, T., McCarty, R.E., Shearn, A., Shingles, R., Fletcher, L., et. al., ‘Exploring DNA Structure with Cn3D’, *CBE-Life Sciences Education*, 6, 65-73, (2007).
- [105] Claros, M.G. and Von Heijene, G., ‘Tappred II: An Improved Software for Membrane Protein Structure Predictions’, *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 685-686, (1994).
- [106] Hirakawa, T., Boon-Chieng, S. and Mitaku, S., ‘SOSUI: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins’, *Bioinformatics*, 14(4), 378-379, (1998).
- [107] Siebert, P.D., Chenchik, A., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A. and Lukyanov, S.A., ‘An Improved PCR Method for Working in Unclassified Genomic DNA’, *Nucleic Acids Research*, 23(6), 1087-1088, (1995).
- [108] Bodin, L., Beaune, P.H. and Lorient, M.A., ‘Determination of Cytochrome P450 2d6 (Cyp2d6) Gene Copy Number by Real-Time Quantitative PCR’, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 3, 248-253, (2005).
- [109] Alche, J.D., Butowt, R., Castro, A.J. and Rodriguez-Garcia M.I., ‘Ubiquitin and Ubiquitin-Conjugated Proteins in the Olive (*Olea*

europaea L.) Pollen’’, *Sexual Plant Reproduction*, 12(5), 285-291, (2000).

- [110] Carpas, J.F., Fernandez-Ocana, A., Carreras, A., Vaderrama, R., Luque, F., Esteban, F.J., et. al., ‘‘The Expression of Different Superoxide Dismutase Forms is Cell-Type Dependent in Olive (*Ole europaea* L.) Leaves’’, *Plant and Cell Physiology*, 47(7), 984-994, (2006).
- [111] Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A. and Clark, B.J., ‘‘Gapdh as a Housekeeping Gene: Analysis of Gapdh mRNA Expression in Pnael of 72 Human Tissues’’, *Physical Genomics*, 21(3), 389-395, (2005).
- [112] Sonmez, G., ‘‘Zeytin Beta Glukozidaz ve Metalotionein Genlerinin Moleküler Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakterizasyonu’’, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Biyoloji Anabilim Dalı, Balıkesir, (2013).
- [113] Fernandez, J., Gharahdaghi, F. and Mische, S.M., ‘‘Routine Identification of Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) Gels or Polyvinyl Difluoride Membranes Usinf Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-the of Flight-Mass Spectrometry (MALDI-TOF-MS)’’, *Electrophoresis*, 19(6), 1036-1045, (1998).
- [114] Ornberg, R.L., Harper, T.F. and Liu, H., ‘‘Wstern Blot Analysis with Quantum Dot Fluorescence Technology: A Sensitive and Quantitative Method for Multiplexed Proteomics’’, *Nature Methods*, 2, 79-981, (2005).
- [115] Kyte, J.A. and Doolittle, R.F., ‘‘A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein’’, *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132, (1982).
- [116] Guex, N. and Peitsch, M.C., ‘‘SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: An Environment for Comparative Protein Modeling’’, *Electrophoresis*, 18, 2714-2723, (1997).

- [117] Petersen, T.N., Brunok, S., Von-Hejine, G. and Nielsen, H., ‘‘Signal 4:0 : Discriminating Signal Peptides from Transembrane Regions’’, *Nature Methods*, (2011).
- [118] Chen, Y., Yu,P., Luo, J. and Jiang, Y., ‘‘Secreted Protein Prediction System Combining CJ-SPHMM, TMHMM and PSORT’’, *Mammalian Genome*, (2003).

# **EKLER**

## **6. EKLER**

### **EK A Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar**

Baş B., Dündar E., Ünver T. 2015. Açıl-KoA Bağlanma Proteininin Zeytin Taslak Genomundan Biyoinformatik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu. 1. Ulusal Bitki Biyoloji Kongresi. BOLU