

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



**ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ VE METALOTİONEİN
GENLERİNİN MOLEKÜLER, FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

GÖRKEM DENİZ SÖNMEZ

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

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



**ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ VE METALOTİONEİN
GENLERİNİN MOLEKÜLER, FİZYOLOJİK VE
BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

DOKTORA TEZİ

GÖRKEM DENİZ SÖNMEZ

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

KABUL VE ONAY SAYFASI

Görkem DENİZ SÖNMEZ tarafından hazırlanan “ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ VE METALOTİONEİN GENLERİNİN MOLEKÜLER, FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 16.08.2013 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR

Üye
Prof. Dr. Anne FRARY

Üye
Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN

Üye
Prof. Dr. Feray KÖÇKAR

Üye
Doç. Dr. Ahmet İPEK



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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Hilmi NAMLI

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 110O108nolu proje ile, Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2011/54 nolu projeler ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ZEYTİN BETA GLUKOZİDAZ VE METALOTİONEİN
GENLERİNİN MOLEKÜLER, FİZYOLOJİK VE BİYOKİMYASAL
KARAKTERİZASYONU
DOKTORA TEZİ
GÖRKEM DENİZ SÖNMEZ
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

(TEZ DANIŞMANI: DOÇ. DR. EKREM DÜNDAR)

BALIKESİR, AĞUSTOS - 2013

Bu çalışmada, zeytin (*Olea europaea* L.) bitkisine ait beta glukozidaz (ZBG) ve tip II metalotiyonein genleri (*OeMT2*), moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda sadece cDNA dizisi bulunan bu iki genin; intron tespiti, biyoinformatik araçlarla analizi, çeşitler arası polimorfizm tespiti, kopya sayısı, zeytin bitkisinde dokusal ve zamansal ekspresyon profili, bakteriyel ekspresyonu, protein karakterizasyonu ve biyolojik aktivite çalışmaları yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesi sonucunda, ZBG geninin 9 adet intron içerdiği belirlenmiştir. 5' UTR bölgesine ait yaklaşık 344 nükleotit uzunluğunda dizi elde edilmiştir. Yapılan polimorfizm çalışmasında ZBG geninin polimorfik olduğu ve Ayvalık çeşidine en uzak Gordales çeşidinin olduğu görülmektedir. Domat, Picual ve Koroneiki çeşitleri ise ZBG geni açısından Ayvalık çeşidine daha yakın görülmektedir. Anlık gösterimli PZR analizleri; ZBG geninin tek kopyalı olduğunu, var yılı ya da yok yılına özgün olmadığını, zeytin dokularından en fazla meyvede ve kasım ve aralık aylarında ifade edildiğini gösterdi. Biyokimyasal karakterizasyon sonuçları ZBG proteininin yaklaşık 67 kDa ağırlığında olduğunu, optimum pH değerinin 8.0, optimum sıcaklığının 37 °C olduğunu, pNPGlu substratına karşı Vmax değerinin 25.25 EU, Km değerinin ise 5.14 mM olduğunu belirledi. Demir ve Mangan ZBG enzimini active ederken, δ-glukanolakton, glukoz, bakır, nikel, kadmiyum ve çinkonun da enzimin inhibitörleri olduğu belirlendi. *OeMT2* geninin 2 adet intron içerdiği ve tek kopya olarak zeytin genomunda temsil edildiği tespit edildi. *OeMT2* geninin hemen hemen tüm zeytin dokularında benzer oranda ifade edildiği ve polimorfik bir gen olduğu kanıtlandı. Proteinin moleküler ağırlığının yaklaşık 22 kDa olduğu ve biyolojik aktivite analizi sonucu bakır ve kadmiyum elementlerini etkin bir şekilde bağladığı tespit edildi.

ANAHTAR KELİMELELER: *Olea europaea* L., zeytin, beta glukozidaz, metalotiyonein, ekspresyon

ABSTRACT

MOLECULAR, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISATION OF OLIVE BETA GLUCOSIDASE AND METALLOTHIONEIN GENES

PH.D THESIS

GÖRKEM DENİZ SÖNMEZ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

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

BALIKESİR, AUGUST 2013

In this study, a β glucosidase gene (*ZBG*) and a type II metallothionein gene (*OeMT2*) from olive (*Olea europaea* L.) were characterized with respect to molecular, physiological and biochemical aspects. Previous studies reported only a cDNA sequence for both of the genes which were investigated in this thesis for intron determination, bioinformatic analysis, polymorphism study among olive cultivars, copy number determination, expression profile (in different tissues with regard to alternate bearing), protein expression, characterization and biological activities. The results revealed the first data about the genes, and revealed that *ZBG* has 9 introns. 344 bp of 5' UTR region of the gene was identified. *ZBG* displayed a polymorphic sequence among cultivars. Domat, Picual and Koroneiki cultivars were the closest cultivars to Ayvalik whereas Gordales was the furthest among the olive cultivars examined. Real - time PCR studies suggested that *ZBG* was represented as a single copy gene in olive genome, has probably no function associated with alternate bearing in olive and highly expressed in fruits, comparing to olive tissue and organs, especially on November and December. Biochemical characterization results suggested that; MW of *ZBG* protein is 67 kDa, optimum pH is 8.0; and optimum temperature of the enzyme is 37 °C, V_{max} is 25.25 EU and K_m value is 5.14 mM. While iron and manganese were the activators of the *ZBG* enzyme, δ -glucanolactone, glucose, copper, nickel, cadmium and zinc were the inhibitors. *OeMT2* gene had 2 introns and it was represented as a single copy gene in olive genome. *OeMT2* gene had more or less the same expression profile in all olive tissue and organs tested. It was also a polymorphic gene. It has a 22 kDa MW and its biological activity revealed that *OeMT2* binds copper and cadmium effectively.

KEYWORDS: *Olea europaea* L.), olive, β - glucosidase, metallothionein, expression

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|---|-----------|
| ÖZET..... | i |
| ABSTRACT | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | vi |
| TABLO LİSTESİ | ix |
| SEMBOL LİSTESİ | x |
| ÖNSÖZ..... | xi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 1.1 Zeytinin Bilimsel Sınıflandırılması | 2 |
| 1.2 Zeytin Ağacının Morfolojisi..... | 3 |
| 1.3 Zeytin Bitkisinde Periyodisite | 4 |
| 1.4 Beta-Glukozidaz Enziminin Biyokimyası..... | 6 |
| 1.4.1 Beta-Glukozidaz Enziminin Genel Özellikleri | 6 |
| 1.4.2 Beta-Glukozidaz Enziminin Sınıflandırılması..... | 7 |
| 1.4.2.1 Substrat Spesifikliğine Göre Sınıflandırılması | 7 |
| 1.4.2.2 Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması..... | 8 |
| 1.4.2.3 Aminoasit Dizilerinin Benzerliklerine Göre Sınıflandırılması..... | 8 |
| 1.4.3 Enzimin Katalizleme Mekanizması | 9 |
| 1.4.4 β -Glukozidaz Enzimlerinin Substrat Özgünlüğü..... | 10 |
| 1.4.5 Bitki β -Glukozidaz Enzimlerinin Önemi..... | 11 |
| 1.4.5.1 Savunma..... | 11 |
| 1.4.5.2 Besin Kalitesinin Artışı | 12 |
| 1.4.5.3 Selüloz Metabolizması | 13 |
| 1.4.5.1 Lignin Biyosentezi | 13 |
| 1.4.1 Zeytin β -Glukozidaz Enzimi..... | 14 |
| 1.5 Metalotiyonein Proteinleri ve Yapısal Özellikleri..... | 15 |
| 1.5.1 Metalotiyonein Proteinleri | 15 |
| 1.5.2 Metalotiyonein Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri | 16 |
| 1.5.3 Fitoşelatinler | 17 |
| 1.6 Ağır Metallerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri | 18 |
| 1.7 Ağır Metal Zehirlenmesi | 19 |
| 1.8 Ağır Metallerin Biyolojik Birikimi | 20 |
| 1.9 Metal Homeostasisinin Mekanizması | 20 |
| 1.10 Çalışmanın Amacı | 22 |
| 2. MATERYAL VE METOD | 25 |
| 2.1 MATERYAL..... | 25 |
| 2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar | 25 |
| 2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Sterilizasyonu ve Kullanıma Hazırlanması | 25 |
| 2.1.3 DEPC'li Suyun Hazırlanması | 25 |
| 2.1.4 Örneklerin Toplanması | 26 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.1.5 | Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri | 26 |
| 2.1.6 | Antibiyotikler | 26 |
| 2.1.7 | Kullanılan Bakteri ve Maya Suşları | 26 |
| 2.1.8 | Çalışmada Kullanılan Vektörler | 27 |
| 2.2 | METOD | 30 |
| 2.2.1 | Bakteriyel Teknikler | 30 |
| 2.2.1.1 | Kültür Ortamlarının Hazırlanması | 30 |
| 2.2.1.2 | Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması | 30 |
| 2.2.1.3 | Bakteriyel Transformasyon | 31 |
| 2.2.1.4 | Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte- Miniprep) | 31 |
| 2.2.1.5 | Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte – Maksiprep)..... | 31 |
| 2.2.1.6 | Plazmit Stoklarının Hazırlanması | 32 |
| 2.2.2 | DNA İle İlgili Teknikler | 32 |
| 2.2.2.1 | Zeytin gDNA İzolasyonu | 32 |
| 2.2.2.2 | Maya gDNA İzolasyonu | 33 |
| 2.2.2.3 | DNA Agaroz Jel Elektroforezi | 33 |
| 2.2.2.4 | DNA' nın Temizlenmesi | 34 |
| 2.2.2.5 | Jelden Geri Kazanılan PZR Ürününün Küt Uçlu Hale Getirilmesi | 34 |
| 2.2.2.6 | Miktar Tayini | 35 |
| 2.2.2.7 | gDNA'nın Etanol ile Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi | 35 |
| 2.2.2.8 | Restriksiyon Enzimleri İle Kesim | 35 |
| 2.2.2.9 | Ligasyon | 35 |
| 2.2.2.10 | PZR Deneyleri | 36 |
| 2.2.2.11 | Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi İçin Uygulanan Deneyler | 38 |
| 2.2.3 | RNA İle İlgili Teknikler | 41 |
| 2.2.3.1 | Total RNA İzolasyonu | 41 |
| 2.2.3.2 | RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi | 42 |
| 2.2.3.3 | cDNA Eldesi | 42 |
| 2.2.3.4 | Anlık Gösterimli PZR Protokolü | 43 |
| 2.2.3.5 | Anlık Gösterimli PZR için Standart Çalışması | 43 |
| 2.2.4 | Bakteriyel Ekspresyon | 43 |
| 2.2.4.1 | Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi | 43 |
| 2.2.4.2 | Hücrelerin Yıkınması | 44 |
| 2.2.5 | Maya İle İlgili Teknikler | 44 |
| 2.2.5.1 | Tamponların Hazırlanması | 44 |
| 2.2.5.2 | Maya Kompetan Hücresinin Hazırlanması | 45 |
| 2.2.5.3 | Mayaya Transformasyon | 45 |
| 2.2.5.4 | <i>Pichia pastoris</i> ' te Ekspresyon | 45 |
| 2.2.6 | Protein Teknikleri | 46 |
| 2.2.6.1 | Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini | 46 |
| 2.2.6.2 | SDS PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi | 47 |
| 2.2.6.3 | Western Blot Basamağı | 48 |
| 2.2.6.4 | Antikoru Hazırlanması ve Proteinlerin Belirlenmesi | 49 |
| 2.2.6.5 | Protein Saflaştırma Basamağı | 50 |
| 2.2.6.6 | Zeytin β -Glukozidaz Proteinini İçin Yapılan Karakterizasyon Deneyleri | 51 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.6.7 Zeytin Metallothionein Proteini (OeMT2) İçin Yapılan Metal Tolerans Deneyleri..... | 54 |
| 3. BULGULAR | 56 |
| 3.1 Zeytin Beta-Glukozidaz Genine Ait Bulgular..... | 56 |
| 3.1.1 Moleküler Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular | 56 |
| 3.1.1.1 Zeytin BetaGlukozidaz Geninin Biyoinformatik Analizi | 56 |
| 3.1.1.2 <i>OebGlu</i> Geninin İntronunun Tespiti | 60 |
| 3.1.1.3 <i>OebGlu</i> Geninin Promotör Bölgesinin Belirlenmesi..... | 62 |
| 3.1.1.4 <i>OebGlu</i> Geninin Farklı Zeytin Çeşitleri Arasındaki Polimorfizmi | 64 |
| 3.1.1.5 <i>OebGlu</i> Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesi | 65 |
| 3.1.2 <i>OebGlu</i> Geninin Fizyolojik Karakterizasyonuna Ait Bulgular | 69 |
| 3.1.2.1 Anlık Gösterimli PZR İle Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi | 69 |
| 3.1.2.2 Zamansal Olarak <i>OebGlu</i> Geninin Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi..... | 71 |
| 3.1.2.3 Farklı Zeytin çeşitleri Arasında <i>OebGlu</i> Geninin Ekspresyon Profilinin Belirlenmesi | 72 |
| 3.1.3 <i>OebGlu</i> Geninin Biyokimyasal Karakterizasyonu | 73 |
| 3.1.3.1 <i>OebGlu</i> Proteininin <i>Pichia pastoris</i> ' te Klonlama Çalışmaları | 73 |
| 3.1.3.2 <i>OebGlu</i> proteininin <i>Escherichia coli</i> ' de ifade edilmesi İle İlgili Bulgular..... | 78 |
| 3.1.3.3 <i>OebGlu</i> Proteininin Karakterizasyon Çalışmaları..... | 83 |
| 3.2 Zeytin Metalotiyonein Genine (<i>OeMT2</i>) Ait Bulgular..... | 93 |
| 3.2.1 <i>OeMT2</i> Geninin Moleküler Karakterizasyonuna Ait Bulgular | 93 |
| 3.2.1.1 <i>OeMT2</i> Geninin Biyoinformatik Analizi..... | 93 |
| 3.2.1.2 <i>OeMT2</i> Geninin İntronunun Belirlenmesi | 96 |
| 3.2.1.3 <i>OeMT2</i> Geninin Polimorfizm Çalışmalarına Ait Bulgular | 98 |
| 3.2.1.4 Anlık Gösterimli PZR ile <i>OeMT2</i> Geninin Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi..... | 102 |
| 3.2.2 <i>OeMT2</i> Geninin Fizyolojik Karakterizasyonuna Ait Bulgular..... | 103 |
| 3.2.2.1 Anlık Gösterimli PZR İle Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi | 103 |
| 3.2.2.2 Zamansal Olarak <i>OeMT2</i> Geninin Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi..... | 103 |
| 3.2.3 <i>OeMT2</i> Proteininin Fizyolojik Aktivitesi..... | 105 |
| 3.2.3.1 <i>OeMT2</i> Proteininin Saflaştırılması | 105 |
| 3.2.3.2 <i>OeMT2</i> Proteininin Fonksiyonunun Aydınlatılması..... | 107 |
| 4. SONUÇ VE ÖNERİLER | 111 |
| 5. KAYNAKLAR..... | 121 |
| 6. EKLER..... | 144 |

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 1.1: Glikozidik bağın gösterilmesi [62]..... | 6 |
| Şekil 1.2: β -Glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı [71]..... | 7 |
| Şekil 1.3: β -Glukozidazların substrat ile etkileşimi [71]..... | 9 |
| Şekil 1.4: β -glukozidik bağın tutan (retaining) β -glukozidazlar ile hidrolizi [85]..... | 10 |
| Şekil 1.5: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CUP metalotiyonein proteininin 3 boyutlu yapısı [149]..... | 16 |
| Şekil 1.6: <i>Salicornia brachiata</i> (SbMT-2) proteininin 3 boyutlu yapısı [156]..... | 17 |
| Şekil 1.7: Metabolik ve besin değeri yüksek elementler ve sınıflandırılmaları [162]..... | 18 |
| Şekil 2.1: pBluescript SK klonlama vektörü (PZR Script cloning kit Stratagene Kat. No: #211188)..... | 27 |
| Şekil 2.2: PZR TM 8/GW/TOPO® vektör haritası PZR TM 8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (İnvitrogen, Kat.No: s K2500-20)..... | 28 |
| Şekil 2.3: pPICZ α C klonlama vektörü Easy Select TM <i>Pichia</i> ekspresyon kiti (Invitrogen, Vilnius, CA, Kat. No: K1740-01)..... | 28 |
| Şekil 2.4: pET21a vektör haritası..... | 29 |
| Şekil 2.5: pLATE51 ekspresyon vektörü aLICator TM LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271)..... | 29 |
| Şekil 3.1: BioEdit [194] progamıyla elde edilen <i>OebGlu</i> geninin nükleotid kompozisyonu..... | 57 |
| Şekil 3.2: BioEdit [194] progamıyla elde edilen <i>OebGlu</i> proteininin aminoasit kompozisyonu..... | 57 |
| Şekil 3.3: <i>OebGlu</i> proteinine ait Expasy biyoinformatik araçlarının kullanılması ile oluşturulmuş Kyte – Doolittle hidrofobosity analizi [202]..... | 58 |
| Şekil 3.4: <i>OebGlu</i> proteininin Molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasının belirlenmesi [202]..... | 58 |
| Şekil 3.5: <i>OebGlu</i> proteininin I-Tasser programı ile oluşturulan 3 boyutlu yapısı[203]..... | 59 |
| Şekil 3.6: <i>OebGlu</i> geninin intronunun belirlenmesi. M: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331(Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: FL1F-FL2R gDNA PZR, 2: FL1F-FL'R cDNA PZR, 3: FL2F-FL1R gDNA PZR, 4: FL2F-FL1R cDNA PZR olarak agaroz jele yüklenmiştir..... | 60 |
| Şekil 3.7: Blast analizi sonucu intronun yerleşimi..... | 60 |
| Şekil 3.8: <i>OebGlu</i> geninin intron ve ekzonlarının dizisi, koyu olarak işaretlenen bölgeler ekzonları temsil etmektedir..... | 61 |
| Şekil 3.9: <i>OebGlu</i> genine ait tail PZRgörüntüsü; M: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331(Fermentas, Vilnius, Lithuania) 1- AD1 TAİL 1, 2- AD1 TAİL 2, 3- AD1 TAİL 3, 4- AD2 TAİL 1, 5- AD2 TAİL 2, 6- AD2 TAİL 3, 7- AD2A TAİL 1, 8- AD2A TAİL 2, 9- AD2A TAİL 3, 10- AD3 TAİL 1, 11- AD3 TAİL 2, 12- AD3 TAİL 3, 13- AD5 TAİL 1, 14- AD5 TAİL 2, 15- AD5 TAİL | |

| | |
|---|----|
| 3, 16- ADMIX TAİL 1, 17- ADMIX TAİL 2, 18- ADMIX TAİL 3 örneklerinden oluşmaktadır..... | 62 |
| Şekil 3.10: Promotör bölgesinin belirlenmesi [196]..... | 63 |
| Şekil 3.11: Farklı çeşitlerin <i>OebGlu</i> geni nükleotid dizisi açısından nükleotid polimorfizminin belirlenmesi. Bootstrap değerleri % 50 ve daha az olanlar belirtilmemiştir. Bootstrap analizi için 1000 kopya denenmiştir. | 65 |
| Şekil 3.12: Zeytinden izole edilen genomik DNA' nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi..... | 66 |
| Şekil 3.13: Southern blot için hazırlanan transfer düzeneği | 67 |
| Şekil 3.14: Prob3 primerleri ile southern blot probunun görüntüsü | 67 |
| Şekil 3.15: <i>OebGlu</i> geninin anlık gösterimli PZR ile kopya sayısını belirten grafik | 69 |
| Şekil 3.16: Farklı dokulara ait anlık gösterimli PZR grafiği | 70 |
| Şekil 3.17: Farklı aylarda toplanan meyve örneklerinde <i>OebGlu</i> geninin ekspresyon seviyesinin gözlenmesi..... | 70 |
| Şekil 3.18: <i>OebGlu</i> geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği..... | 71 |
| Şekil 3.19: <i>OebGlu</i> geninin “yok” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği..... | 72 |
| Şekil 3.20: "var" ve "yok" yıllarını beraber gösteren kopya sayısı grafiği..... | 72 |
| Şekil 3.21: <i>OebGlu</i> geninin farklı zeytin çeşitleri arasındaki ekspresyon profilinin anlık gösterimli PZR grafiği..... | 73 |
| Şekil 3.22: <i>OebGlu</i> geninin pPICZalfaC vektörüne klonlanmak amacıyla amplifikasyonu | 74 |
| Şekil 3.23: Koloni taraması sonucu taranan 16 koloniye ait numaralandırılmış PZR görüntüsü, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) | 75 |
| Şekil 3.24: Rekombinant plazmidin ClaI ve Not I restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) | 75 |
| Şekil 3.27: <i>OebGlu</i> PZR jel görüntüsü, Markır: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania) | 78 |
| Şekil 3.28: Rekombinant kolonilerin belirlenmesi amacıyla yapılan 9 adet koloniye ait koloni PZR jel görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1-9 sırayla taranan koloni numaraları | 79 |
| Şekil 3.29: Rekombinant Topo TA plazmidinin EcoR1 ve HindIII enzimleriyle kestikten sonraki restriksiyon jel görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1-10 sırayla kesilen aynı plazmide ait örnekler, 11: Kontrol olarak kullanılan halkasal plazmid | 79 |
| Şekil 3.31: Restriksiyon enzimleri ile kesilen <i>OebGlu</i> ve pET21a' nın miktar tayini jel fotoğrafı, M Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: Kesilen ve saflaştırılmış <i>OebGlu</i> , 2: Kesilen ve saflaştırılmış pET21a vektörü..... | 81 |
| Şekil 3.32: <i>OebGlu</i> genini pLATE51 vektörüne klonlama amacı ile yapılan PZR' a ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)..... | 82 |

| | |
|---|-----|
| Şekil 3.33: Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni taramasına ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)..... | 83 |
| Şekil 3.34: Rekombinant OebGlu proteininin ifadesine ait SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü, M:Markır Fermentas Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker , (Fermentas, Lithuania),1:İndüklenmemiş OebGlu+pLATE 51, 2: 1 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51, 3: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 ham ekstrakt, 4: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 protamin sülfat sonrası süpernatant, 5: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 pellet, 6: İndüklenmemiş kontrol plazmit, 7: 1saat indüklenmiş kontrol plazmit, 8: 3 saat indüklenmiş kontrol plazmit 51 protamin sülfat sonrası süpernatant | 84 |
| Şekil 3.35: Rekombinant OebGlu proteine ait Western blot analizi, M: Markır PageRuler™ Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, Lithuania),1: İndüklenmemiş control, 2: OebGlu | 84 |
| Şekil 3.37: OebGlu enziminin 4-MUG substratına karşı aktivitesi..... | 86 |
| Şekil 3.38: OebGlu enzimine ait optimum sıcaklık grafiği | 87 |
| Şekil 3.45: I-Tasser programı ile oluşturulan OeMT proteinine ait üç boyutlu yapısı [203] | 95 |
| Şekil 3.46: <i>OeMT2</i> proteinine ait SOSUI sinyal peptid analizi [201] | 96 |
| Şekil 3.47: <i>OeMT2</i> geninin intronunun belirlenmesi amacıyla yapılan PZR' a ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır, 1: cDNA PZR, 2: gDNA PZR, olarak agaroz jele yüklenmiştir. | 97 |
| Şekil 3.48: İtronların varlığını gösteren NCBI blast analizi görüntüsü..... | 97 |
| Şekil 3.49: <i>OeMT2</i> geninin intron ve ekzonlarına ait nükleotid dizileri, Gri boyalı alanlar intronları, siyah kutucuk içerisine alınmış bölgeler ise başlangıç ve bitiş kodonlarını göstermektedir. | 98 |
| Şekil 3.55: <i>OeMT2</i> geninin farklı zeytin dokularındaki ekspresyon seviyelerinin anlık gösterimli PZR ile belirlenmesi..... | 103 |
| Şekil 3.56: <i>OeMT2</i> geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği | 104 |
| Şekil 3.57: <i>OeMT2</i> geninin “yok” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği..... | 104 |
| Şekil 3.58: <i>OeMT2</i> geninin ekspresyon seviyesinin "var" ve "yok" yıllarına ait kıyaslaması | 105 |
| Şekil 3.59: Nİ-NTA yöntemi ile saflaştırılmış OeMT proteinine ait SDS PAGE elektroforezi, M; PageRuler Plus Prestained Protein Markır (10–260 kDa) Fermentas, 1; ham ekstrakt, 2; saflaştırılmış rekombinant OeMT2 proteini olacak şekilde yüklenmiştir..... | 106 |
| Şekil 3.61: Metal içermeyen besiyerinde bakterilerin büyüme eğrisini belirten grafik | 107 |
| Şekil 3.65: 0.5 mM CdCl ₂ içeren katı besiyerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin petri görüntüsü | 109 |
| Şekil 3.66: 1 mM CuSO ₄ içeren katı besiyerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin petri görüntüsü | 110 |
| Şekil 3.67: ICP analizi sonucu elde edilen metal iyon içerikleri..... | 110 |

TABLO LİSTESİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Tablo 2.1: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için yapılan aktivite tayininde kullanılan tamponlar | 53 |
| Tablo 3.1: OebGlu proteininin özellikleri | 59 |
| Tablo 3.2: ZBG moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan primerler | 64 |
| Tablo 3.3: Anlık Gösterimli PZR ile Kopya Sayısı Belirleme Analizinde Kullanılan Kontrol Primerleri | 68 |
| Tablo 3.4: OEBGLU geninin klonlama çalışmalarında kullanılan primerler .. | 74 |
| Tablo 3.5: OebGlu proteininin aktivite ölçümüne ait veriler | 77 |
| Tablo 3.6: pET21a vektörüne klonlama amaçlı kullanılan primerler | 78 |
| Tablo 3.7: pLATE51 vektörüne yapılacak klonlama çalışmalarında kullanılan primerler | 82 |
| Tablo 3.8: OebGlu enziminin rölatif aktivitesi | 86 |
| Tablo 3.9: OebGlu enziminin amonyum sülfat çöktürmesine ait değerler | 89 |
| Tablo 3.10: OebGlu enziminin pNPG substratı kullanılarak, Km ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S] | 90 |
| Tablo 3.11: Zeytin β glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi araştırılan maddelerin IC ₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar. | 91 |
| Tablo 3.12: OebGlu enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılan maddeler için kullanılan grafikler | 93 |
| Tablo 3.13: <i>OeMT2</i> deneylerinde kullanılan primerler ve kullanım amaçları .. | 96 |

SEMBOL LİSTESİ

| | | |
|-------------------------------------|---|---|
| AD | : | Arbitrary degenerate |
| bp | : | base pair (baz çifti) |
| BLAST | : | Basic local alignment search tool |
| Cd⁺² | : | Kadmiyum |
| Cu⁺² | : | Bakır |
| BSA | : | Bovin serum albumin |
| Ct | : | Cycle treshold |
| cDNA | : | Complementary DNA (Komplementer DNA) |
| dNTP | : | Dinükleotit trifosfat |
| DNA | : | Deoksiribonükleik asit |
| DEPC | : | Dietilpirokarbonat |
| EDTA | : | Etilendiamintetraasetik asit |
| EGTA | : | Etilen glicol tetraasetik asit |
| EtOH | : | Etanol |
| GAPDH | : | Gliserol-3fosfat dehidrogenaz |
| gDNA | : | Genomik DNA |
| kDa | : | Kilo Dalton |
| ICP | : | Inductively Coupled Plasma |
| IPTG | : | İsopropil β-D-1-tiyogalaktopiranosid |
| LB | : | Luria - Bertani |
| MgCl₂ | : | Magnezyum Klorür |
| NH₄SO₄ | : | Amonyum Sülfat |
| NaAc | : | Sodyum Asetat |
| <i>OeMT2</i> | : | Zeytin tip II metalotiyonein geni |
| oNPGal | : | o- nitrofenil-β-D galaktopiranosid |
| oNPGlu | : | o- nitrofenil-β-D-glukopiranosid |
| ORF | : | Open reading frame (Açık okuma çerçevesi) |
| PCR | : | Polymerase chain reaction |
| pNPGal | : | p- nitrofenil-β-D galaktopiranosid |
| pNPGlu | : | p-nitrofenil-β-D-glukopiranosid |
| PZR | : | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RNA | : | Ribonükleik asit |
| SSC | : | Sodyum sitrat |
| SDS | : | Sodyum dodesil sülfat |
| SDS-PAGE | : | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi |
| TE | : | Tris-EDTA |
| TAIL | : | Thermal Asymmetric Interlaced |
| TAE | : | Tris asetik asit |
| TBE | : | Tris borik asit |
| Tm | : | Melting temperature (Erime sıcaklığı) |
| UTR | : | Untranslated Region (translasyona uğramayan bölge) |
| UV | : | Ultra-viyole |
| YNB | : | Yeast Nitrogen Base (Maya azot bazı) |
| YPDS | : | YNB - Pepton - Dextroz - Sorbitol |
| ZBG | : | Zeytin β-glukozidaz geni |
| Zn⁺² | : | Çinko |

ÖNSÖZ

Doktora tezi olarak hazırladığım bu çalışma, Balıkesir Üniversitesi Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi Biyoloji ve Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında yapılmış, danışmanım Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR tarafından yürütülmüştür.

Tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, her anlamda destek ve yardımını hissettiğim danışman hocam sayın Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitesinde bulunan ve her zaman desteğini, şefkatini ve yardımlarını hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Güleendam TÜMEN' e ve değerli fikirlerini paylaştığım Prof. Dr. Anne FRARY' e çok teşekkür ederim.

Çalışma konumun belirlenmesinde ve deney çalışmalarımda büyük emeği olan sayın hocam Prof. Dr. Yusuf TURAN' a,

Hiç sıkılmadan her zaman sıkıntılarımızla ilgilenen ve laboratuvar malzemelerini ve tecrübelerini her daim paylaşmaktan çekinmeyen Prof. Dr. Feray KÖÇKAR ve öğrencilerine,

ICP analizlerinde büyük yardımı olan Feyzullah TOKAY ve BÜTAM' a,

Bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, bilime ve çalışmaya karşı olan bitmek tükenmek bilmeyen sevgisiyle beni imrendiren sayın Doç. Dr. Selma Sinan'a, aynı laboratuvarı paylaştığımız sayın Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN'a ve öğrencilerine,

Bu süreçte karşılaştığım her türlü sıkıntıya ortak olan ve azmini örnek aldığım sevgili dostum Yard. Doç. Dr. Hatibe ERTÜRK KARA'ya,

2211 Yurt İçi Doktora Bursu kapsamında mali destek aldığım TÜBİTAK' a,

Sıkıntılı doktora deneyleri sürecini eğlenceli hale getiren, her zaman yardımını ve dostluğunu hissettiğim Öznur SUAKAR' a, neşe ve destekleriyle laboratuvarı evimiz haline getiren değerli arkadaşlarım Gülçin ÇETİN, Tuğba ÇAKMAK, Şakir AKGÜN ve Özgün SALI' ya,

Sevgi ve ilgisiyle bana her zaman destek olan, sevgili eşim, hayat arkadaşım Serdar SÖNMEZ' e ve ailesine,

Hayatımın her aşamasında bana destek olan, yardımlarını esirgemeyen ve her zaman sabır gösteren canım ailem Suzan DENİZ, Yener DENİZ ve Yiğit DENİZ' e

Doğumuyla hayatıma neşe ve anlam kazandıran, en büyük şansım biricik oğlum Burak Efe SÖNMEZ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

1. GİRİŞ

Zeytin ağacı (*Olea europaea* L.), dünya üzerinde bilinen ve en eski tarımı yapılan ağaçlardan biridir. Zeytin meyvesi tipik bir Akdeniz mahsülü olarak tanımlanır fakat günümüzde ekonomik değerinin yüksek olması, yüksek besin değerlikli yağ kaynağı olması, kuraklığa dayanıklı ve uzun yıllar meyve vermesinden dolayı birçok bölgede kültürü yapılmaktadır [1, 2].

Santorini Adası'nda bulunmuş olan zeytin fosilleri, tarihte zeytin ağacına ait elde edilmiş en eski bulgulardır. Zeytinyağının M.Ö.4500 yıllarında Akdeniz' de kurulmuş olan Girit Medeniyeti'nde kullanıldığına dair veriler mevcuttur [3]. Bu izler bir anlamda zeytinciliğin M.Ö.4000'li yıllarda Mezopotamya olarak adlandırılan ve Gaziantep, Mardin, Kahramanmaraş illerinin yer aldığı bölgelerde kültüre alındığını da doğrulamaktadır. Zeytinin kültür bitkisi olarak yetiştirilmesi Akdeniz medeniyetleri sayesinde gelişmiştir ve günümüzde Akdeniz havzasında 9400 milyon dönümden fazla alanda yetiştiriciliği yapılmaktadır [4, 5].

Anavatanının, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ni içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya olduğu düşünülen zeytinin, ülkemize güneydoğudan başlayarak Suriye'den Akdeniz kıyıları boyunca yayıldığı kabul edilmektedir. Zeytin ülkemizde, Güneydoğu Anadolu'da Mardin'in güney kesimlerinden başlayarak, Akdeniz, Ege ve Marmara kıyı kesimleri ile alçak kesimleri takip ederek Karadeniz kıyılarında da yayılma alanları bulabilmiştir. Kıyı bölgeleri dışında, yükseltilerinin az oluşu nedeniyle zeytinin yetişebilmesi için gerekli elverişli iklim şartlarına sahip iç kesimlerde de (Adıyaman, Kahramanmaraş, Karaman, Isparta, Burdur, Denizli, Bilecik, Eskişehir) sınırlı miktarlarda zeytinlikler bulunabilmektedir [6].

Zeytinin yayılışının iki yoldan olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a, diğeri ise Anadolu boyunca Ege Adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya doğrudur [7-9]. Zeytin, dünyada Akdeniz havzasında yer alan ve Akdeniz iklim özelliklerini gösteren yaklaşık 40 ülkede ekonomik anlamda tarımı yapılan bir meyvedir [10].

Zeytin meyvesi çeşitli şekillerde işlenmek suretiyle tüketilir. Bu işlem, basit salamuraya yatırma, acılığın fermentasyon yoluyla giderilmesi veya kimyasal bileşiklerle tatlandırmaya gibi süreçlerini kapsar. Zeytin ağacının meyvesive odununa ek olarak yağı da kozmetik sanayisinde ve tıp alanında da yüzyıllardan beri kullanılmaktadır [11]. Zeytinin insan sağlığına ve beslenmesine olan öneminin yanında doğal hayata olan faydaları da dikkate alınarak zeytin yetiştiriciliğine büyük bir ivme kazandırılarak günümüze kadar gelmesi sağlanmıştır. Dünyada zeytincilik yapılan alanların %9'u, dane zeytin üretiminin %8'i, zeytinyağı üretiminin %5'ine, sofralık zeytin üretiminin %14'üne ve ağaç varlığının %17'si Türkiye' ye aittir. Türkiye'de zeytincilik yapılan alanlar ise işlenen toplam tarım alanlarının %3,4'ünü oluşturmaktadır [12]. Ülkemiz dünya zeytinyağı piyasasında beşinci sırada yer almakta ve 70 farklı ülkeye zeytin ihraç etmektedir. Bu pazarda en çok pay %70 ile İspanya'ya aittir. Türkiye'nin toplam zeytinyağı üretiminin yaklaşık %80'i Ege bölgesine ait olup, bu üretimin yaklaşık %76'sı yağlık olarak derlendirilmektedir [13]

1.1 Zeytinin Bilimsel Sınıflandırılması

Zeytin bitkisi, 30 cinse sahip olan Oleaceae familyasına üyedir. *Olea* cinsi, çoğunlukla güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan yetişebilen, kuraklığa dirençli çeşitli tür ve alt türleri içermektedir. $2X = 46$ kromozoma sahiptir. Bunların çoğu çalılar veya ağaçlardan oluşmaktadır. Bu cinse mensup taksonlardan yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytinin de dahil olduğu *Olea europaea* L; çoğu ekotip olmak üzere 2600' den fazla çeşide sahiptir. Zeytinin sınıflandırması aşağıdaki şekildedir [14];

Alem : Bitkiler

Alt alem : Tracheobionata

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Sınıf : Magnoliopsida

Üsttakım : Asteranae

Takım : Lamiales

Aile : Oleacea

Cins : *Olea* L.

Tür : *Olea europaea* L.

1.2 Zeytin Ağacının Morfolojisi

Zeytin, boylu bir çalı veya 10-20 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her dem yeşil yapraklı bir ağaçtır. Genis, kıvrımlı, düzensiz bir gövdesi vardır. Ağaç yaslandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Verimli topraklarda taç açık ve asimetrik, verimsiz topraklarda ise daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve hemen hemen üç köşelidir [15].

Mızraksı, çok kısa saplı, deri gibi sert yaprakları sürgünlere karşılıklı çiftler halinde dizilmiştir. Yaprakları basit, tam kenarlı ve kenarlar alt yüze doğru hafif kıvrıktır. Yaprığın boyu 2086 mm, genişliği de 5 - 17 mm'dir. Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprığın üst yüzü koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır [16].

Kuzey yarımkürede zeytinin vejetatif tomurcukları Mart ayının sonunda ortaya çıkar, ve ilkbaharın sonlarına doğru Nisan - Mayıs aylarında ise çiçek açmaya başlar. Sıcaklığın 12 °C üzerine çıkması bu durumu teşvik edici bir etkidir. Meyve yaz mevsimi boyunca gelişmeyi sürdürür ve meyve yüküne bağlı olarak Eylül - Ekim aylarında yeşil zeytin oluşur. Eylül ve Ekim ortalarında meyveler sulanır. Ekim ayından sonra renklenme başlar ve çoğu çeşitte kış aylarında tam olgunluğa ulaşılır [17]. Zeytin ağacının gelişiminde ılık iklimlerde yaz aylarında bir azalma görülürken, serin iklimlerde ise sürgün gelişiminin en fazla olduğu dönemlere denk gelmektedir. Topraktaki nemin uygun veya suyun bol olduğu durumlarda sonbahardaki günlük sıcaklıklardaki azalma ağaç gelişiminin hızlanmasına neden olmaktadır. [18, 19]

1.3 Zeytin Bitkisinde Periyodisite

Periyodisite, bir yılın verimli, takip eden diğer yılın ise daha az verimli olarak gözleendiği ve birçok meyve ağacı türünde gözlenen bir fenomendir [20-22]. Zeytinde ise meyve üretimi açısından iki yıl arasındaki bu verimlilik farkı oldukça fazladır [23]. Periyodisite özelliği gelişme miktarı ve hormonal faktörlerle ilgili olmakla birlikte meyve büyüklüğü, kuvvet ve yıllık vejetatif gelişme miktarı ile de ilişkilidir. Bu nedenle, verimli bir yılda genç sürgün gelişimi sınırlı olmaktadır [24]. Yapılan pek çok çalışmada, besin rekabetinin periyodisiteye sebep olduğu ve meyve ağırlığını üzerinde oldukça güçlü bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir [25-27]. Verimli bir yıldan sonra, kısa ve gelişmesi engellenmiş sürgünler üzerindeki gözlerin büyüme potansiyeli genellikle düşük olmaktadır [28]. Böylece aynı uzunluktaki sürgünler, verimli bir yıldan sonra daha fazla somak geliştirmektedirler. Somaklar üzerindeki çiçeklerin bulunması aynı zamanda ağacın daha önceki ürün verimine göre de farklılık göstermektedirler. Meyve tutum yüzdesi çiçek, somak sayısına bağlı olsa bile bazı yıllarda verimdeki dalgalanma meyve sayısındaki değişikliğe göre daha azdır. Bu durum meyvelerin sayıları ile büyüklükleri arasındaki yakın ilişkiye dayanmaktadır [29]. Meyve sayısı daha az olduğunda daha büyük meyve oluşumuna neden olur ve böylece dalgalanmanın derecesi daha düşük olmaktadır. Meyve sayısı ve büyüklüğü arasındaki ilişki sadece meyvelerin miktarına değil aynı zamanda onların dağılımına da bağlıdır[30-32].

Mevcut ürün miktarı, bir sonraki yıldaki farklılaşmayı ve meyve tutumunun derecesini belirleyen en önemli faktördür. Fazla miktarda ürüne sahip olan ağaçlarda önemli bir vejetatif gelişme gözlene bile, bir sonraki yılın ürün miktarı az olmaktadır. Bu durumda somaklar oluşmaz ve kış koşulları uygun olsa bile oluşan çiçekler meyve bağlamayacak ya da sadece birkaç tane meyve bağlayacaktır. Hasat zamanının Aralık-Ocak aylarına kadar ertelenmesi ise ertesi yıldaki ağacın verim gücünü etkileyerek bir sonraki verim üzerine azda olsa olumsuz bir etkilemektedir [33].

Zeytin ağacında gözlenen birçok fizyolojik işleyişin sonucunda periyodisiteye neden olarak içsel hormonların etkili olduğu görülmüştür [34, 35]. Somakta meyve tutacak ilk çiçeğin somaktaki diğer meyvelerin normal tutumunu engellediği pek çok çeşitte kanıtlanmıştır [36]. Ayrıca yapılan tohum öldürme çalışmalarında ağaç üzerinde kalan tohumuz meyve miktarının azlığı ya da çokluğunun ertesi sezon için çiçek gözü

indüksiyonu üzerinde sadece embriyolarda bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [37, 38].

Yapılan çalışmalarda meyve yükünün fazla olduğu “var” ve yok denecek kadar az olduğu “yok” yıllarının sonunda yapraklarda ve tomurcuklarda bulunan mineral, büyüme düzenleyiciler ve fenolik metabolitlerin birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir.[39, 40]. Mineral içeriğinin çiçek tomurcuklarının farklılaşarak tekrar oluşmasında gerekli bir etmen olduğu; “var” yılında sodyum ve potasyum içeriğinin önemli ölçüde azalmasına ancak “yok” yılında bu değerlerin yüksek olmasına dayanmaktadır [41]. Yaz sezonundaki büyüme sırasında ya da meyve düşme zamanında hormon uygulamalarının diğer çeşitlerde olduğu gibi zeytinde de çiçek tomurcuklarının indüklenmesini azalttığı ispatlanmıştır [31, 42, 43]. Ayrıca “var” ve “yok” yıllarındaki zeytin ağacı yapraklarında bulunan fenolik içeriğin de farklı olması, fenolik metabolitlerin birikiminin ve sekonder metabolit miktar ve çeşitlerinin de meyve gelişiminde ve içeriğinde önemli bir etmen olduğu sonucunu çıkarmaktadır [44].

Araştırmalar, sıcaklığın çevresel koşullar içinde çiçek farklılaşmasında en önemli etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur [45-47]. Durgun sıcaklıkların gözlemlendiği kış aylarında potansiyel çiçek tomurcuklarının farklılaşma oranı yüksek iken olumsuz sıcaklık değişimleri, periyodisitenin indüklenmesini teşvik eder. Dondurucu kışlar da tüm ağaçlarda tomurcukların miktarını azalmaktadır [39, 48, 49]. tamamen meyve üretiminin yüksek oranda eşitlenmesine neden olur ve sonuçta takip eden yıldaki ürün için düşük oranda çiçek tomurcuklarının oluşmasına ve dolayısıyla periyodisitenin başlamasına neden olur [50].

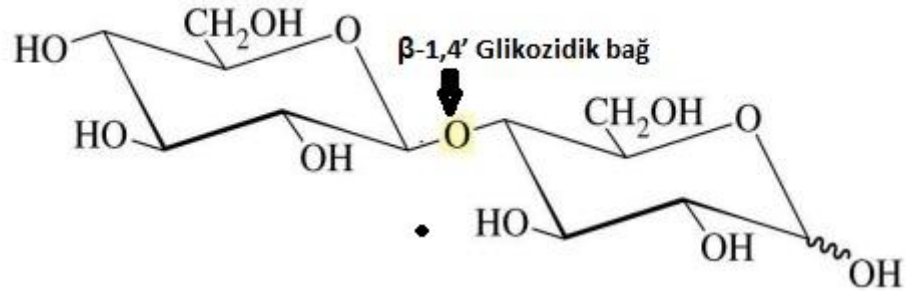
Ticari ve ekonomik önemi oldukça fazla olan zeytin ağacı için meyve kalitesi ve ağacın meyve tutumu oldukça önemli kriterlerdir. Periyodisite sonucu ortaya çıkan ürün açısından verimsiz bir yıl, birçok ticari ve ekonomik probleme sebep olmaktadır [51]. Bu etmenleri en aza indirmek amacıyla verimsiz yılda az olan meyvenin gelişmesini önleyerek [43] “var” yılındaki meyve yükünü azaltılmaya çalışılır [52, 53]. Bunun dışında budama yöntemi de “var yılı” öncesinde uygulanabilir. Ayrıca meyve sayısını azaltmak ve daha fazla vejetatif gelişmeye ve “yok yılı” için daha iyi çiçek gözü farklılaşması sağlamak için “var” yılında küçük meyve seyreltmesi de yapılabilir [54]. Çok miktardaki küçük meyvelerden oluşan bir ürün, az sayıdaki büyük meyveli ürüne oranla periyodisiteyi daha fazla teşvik etmektedir. Ana dalda bilezik almanın

periyodisiteyi azaltan başka bir yöntem olup, kış farklılaşmasını sınırlayan şartlar altında fayda sağladığı görülmüştür. [55, 56].

1.4 Beta-Glukozidaz Enziminin Biyokimyası

1.4.1 Beta-Glukozidaz Enziminin Genel Özellikleri

β -glukozidazlar ya da diğer bir deyişle β -glukozid glukohidrolazlar (EC 3.2.1.21) D-glukoz ve bir aglikon ya da farklı bir şeker arasındaki β -O-glukozidik bağlarını hidrolizleyerek glukoz ve bir aglikonun açığa çıkmasını sağlayan enzimlerdir. β -glukozidazlar; mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar gibi oldukça geniş çapta bir canlı grubunda bulunmaktadır [57-61].

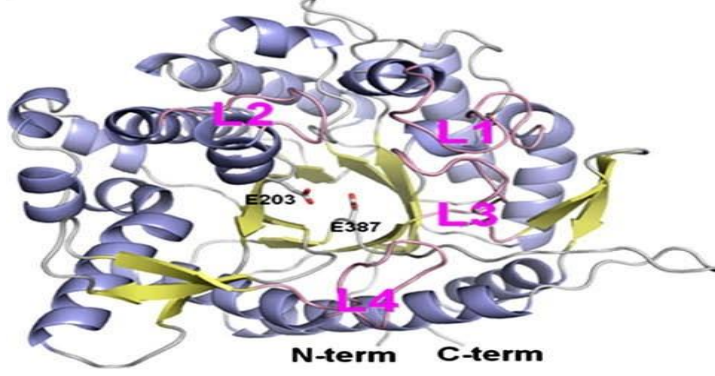


Şekil 1.1: Glukozidik bağın gösterilmesi [62]

Aile 1 β -glukosidaz monomerlerinin her birinin temel yapısında yüksek korunumlu peptid motifleri bulunmaktadır. Bunlar SAYQI, YRFSI, TFNEP, LGLNYY, YITENG ve DNFEW'dir. Bunlardan TFNEP ve YITENG enzimin aktif bölgesinin bir parçasını oluştururlar ve şekil 1.2' de gösterildiği gibi iki adet katalitik glutamat içerirler [63-66].

Birçok β -glukozidaz; β -glukozidik bağlara özgün olma, asidik pH' da (5-6) en yüksek aktivite gösterme, alt ünitesinin moleküler ağırlığının 55-66 kDa olması gibi birçok ortak özelliğe sahiptirler. Sıcaklıkla ilgili yapılan stabilite çalışmalarında da β -glukosidazların 55-60 °C'nin üzerinde geri dönüşümsüz olarak inaktive oldukları

bulunmuş ve bazı çalışmalar neticesinde de 50-55°C’lerde en yüksek aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir [67-70].



Şekil 1.2: β -Glukozidaz enzimlerinin genel üç boyutlu yapısı [71].

1.4.2 Beta-Glukozidaz Enziminin Sınıflandırılması

1.4.2.1 Substrat Spesifikliğine Göre Sınıflandırılması

Uluslararası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği (IUBMB) tarafından oluşturulan (1984) isimlendirme sistemi, enzimin katalizlediği reaksiyonun tipine ve substrat spesifikliğine dayanmaktadır. Bu sisteme göre *O*-glikozil hidrolazlar EC.3.2.1.X alt sınıfında yer alırlar.”X” burada substrat özgünlüğünü nitelendirir [72, 73]. β -glukozidaz (EC 3.2.1.21) ve β -galaktozidaz (EC 3.2.1.23) enzimlerinin isimlendirmesi arasındaki fark, substrat tercihinine göre değişir. Bu sınıflandırma sisteminin dezavantajı ise; birden fazla substrat üzerinde etkili enzimler için uygun olmamasıdır. Örneğin sellülazlar ksilan, ksiloglukan, β -glukan ve birçok ticari substrat üzerinde etkilidir [74, 75].

1.4.2.2 Etki Mekanizmasına Göre Sınıflandırılması

“*Ekzo*” and “*endo*” terimleri glikozid hidrolazların bir polisakkarit üzerindeki hareketi ile ilgilidir. “Ekzo-glikozidazlar” bir oligosakkarit zincirinden tek bir glikozidik rezidüyü indirgen olmayan uç kısımdan kesen enzimlerdir. “Endo-glikozidazlar” ise; bir glikozidik zincirdeki internal bağlantı noktalarından kesen, bir oligosakkarit rezidüsünü serbest bırakan enzimlerdir [76].

“*Ekzo*” and “*endo*” ayırımı oldukça güçlü bir ayırımdır fakat *endo* ve *ekzo* özellikleri birlikte katalizleyen enzimleri kategorize etmek için bu sınıflandırma sistemi yetersiz kalmaktadır. Örneğin sellobiyohidrolazlar hem polisakkarit substratlara bağlanırken hem de bir dizi katalitik tepkime sonrası polimer zincir substratı serbest bırakamazlar [77, 78].

1.4.2.3 Aminoasit Dizilerinin Benzerliklerine Göre Sınıflandırılması

Enzimlerin aminoasit dizileri ve yapıları birbirleriyle ilişkili iki önemli faktör olması sebebiyle enzimin sadece aminoasit dizisi kullanılarak yapısal ve mekanistik özellikleri hakkında bilgi sahibi olunabilir. Buna ilaveten her enzim ailesinin moleküler mekanizması genellikle korunmuş olup, ilgili diziler benzer katlanmalar göstermektedir.

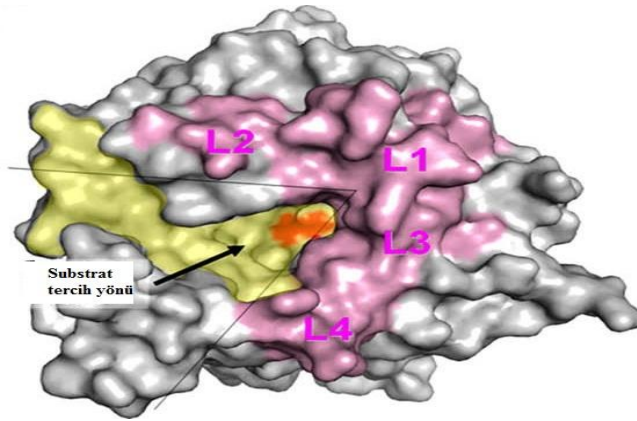
Dizi temelli sınıflandırma sadece glikozil hidrolazlar ile sınırlı kalmayıp, benzer yapısal özellikler gösteren glikozil transferazlara da uygulanmıştır [79]. Tersiyer yapı seviyesindeki benzerlikler, katalitik mekanizmadaki, katalitik rezidülerindeki önemli benzerlikler ve korunmuş bölgeler temel alınarak glikozil hidrolaz aileleri kabileler ve süper aileler olarak sınıflandırılmışlardır. Glikozil Hidrolaz 1 ailesi; GH-A kabilesi (aynı zamanda 4/7 süper ailesi olarak ta isimlendirilir) içerisinde yer alır. [80].

Glikozil hidrolaz 1 ailesinin tersiyer yapısı ile ilgili yapılan çalışmalar aktif bölgedeki, benzerlikleri ortaya çıkarmış ve birçok polar ve aromatik rezidülerin karbohidrat tanıma bölgelerinin sonlarına doğru yerleştikleri belirlenmiştir [63, 66, 81]. Ayrıca bu aileye mensup birçok enzimin katalitik bölgelerinin bir paket ya da tunel içerisinde oldukları belirlenmiştir [82].

Primer ve tersiyer yapılardan katalitik aminoasit rezidülerinin belirlenmesiyle aktif bölge rezidüleri belirlenebilir. Eğer katalitik rezidü; dizisi bilinen bir aileye mensup ise, benzer diziler ile dizi hizalamasıyla aydınlatılabilir [72, 73, 77, 78].

1.4.3 Enzimin Katalizleme Mekanizması

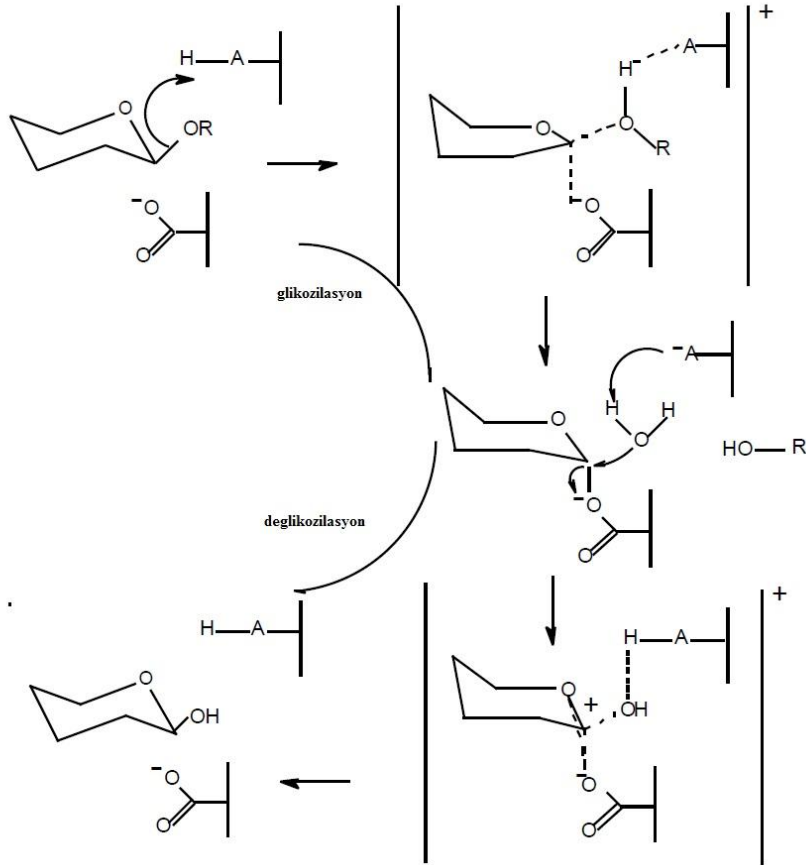
Tüm Aile 1 β -Glukozidazları, bir anomerik karbon ve glikozidik oksijen arasındaki β -glukozidik bağları hidrolize etmek için benzer mekanizma kullanırlar. Bir β -glukozidin glikon ve aglikon kısımları arasındaki beta bağlantının hidrolizi için kabul gören iki farklı hidrolitik mekanizma vardır. Bu mekanizmalar; şeker kalıntısındaki anomerik merkezde bulunan ters dönmeye (inversiyon) ya da tutmaya (retaining) bağlı olarak isimlendirilir. Selülazların ve ksilinazların da büyük bir kısmını da içine alan β -Glukozidazların substratı genel olarak şekerin anomerik konfigurasyonunu tutarak hidrolize ettiği bilinir [83]. Asidik bölge (karboksil grup) glikozidik oksijenin bulunduğu bölge ile etkileşime girer. Parçalamanın sonunda monosakkaridin anomerik karbonu bir su molekülü ile etkileşime girer ve β -D-glukopiranoz oluşturur [84].



Şekil 1.3: β -Glukozidazların substrat ile etkileşimi [71]

Ters dönme ya da tutma mekanizmalarının her birinde en az iki karboksil grubun glikozil hidrolazların katalizleme sinde rol aldıkları bilinmektedir. Ters dönme mekanizmasıyla katalizleyen enzimlerde bu iki grup arasındaki uzaklık yaklaşık olarak 9,3 Å, tutma mekanizmasıyla katalizleyen enzimlerde ise bu mesafe 5,0 Å'dır. Tutma mekanizması ile katalizleme görevini yapan β -glukozidazların aktif merkezinde E191 ve E406 konumunda işlevsel iki glutamik asit kalıntısının olduğu bildirilmektedir. Aktif bölgedeki asidik grup olan glutamik asit glukozidik oksijene bir proton verir ve bir

nükleofilik grup glukozun 1 numaralı karbonuna atak yaparak bağı parçalar. Bunlardan asit-baz katalizörü olan glutamik asit TFNEP motifinde bulunurken, nükleofilik glutamik asit ise I/VTENG motifinde bulunur. Bu esnada glikozil-enzim ara ürünü oluşur ve aglikon serbest kalır. Daha sonra, bir su molekülü temel katalizatör olan glutamik aside bir proton, glikon ve enzim arasındaki kovalent bağa da bir OH⁻ verir. Böylece glikon serbest kalır ve nükleofilik glutamik asit eski haline geri döner [77].



Şekil 1.4: β -glukozidik bağı tutan (retaining) β -glukozidazlar ile hidrolizi [85]

1.4.4 β -Glukozidaz Enzimlerinin Substrat Özgünlüğü

Enzimlerin substrat özgünlüğünü belirleyen temel faktörler substrat ve substratın enzimde bulunan bağlanma bölgesi arasındaki konformasyonel ve kimyasal bütünlüktür [86].

Substrat özgünlüğü bitki β -glukozidaz enzimleri için oldukça önemli bir fonksiyondur. Araştırmacılar, aglikon veya karbohidrat olmayan kısmın β -

glukozidazların doğal substratlarına karşı gösterdikleri özgünlüğün en önemli nedenleri olduğunu belirtmişleridir [87, 88]. Hemen hemen her kaynaktan elde edilmiş β -glukozidazlar substratın glikon (Glc) kısmına benzer özgünlüktedir fakat bazen özellikle bitki β -glukozidaz enzimleri substratın aglikon kısmına karşı farklı bir özgünlük gösterirler. Mısır bitkisinde yapılan bir çalışmada glikon ve aglikon arasındaki bağın parçalanabilmesi için hidrofobik bir aglikon gruba ihtiyaç duyulduğu belirlenmiştir [89, 90].

β -Glukozidazların özgünlüğü için gerekli olan aglikon kalıntıları; bitki hormonlarını, hidroksinamik asitleri, flavonollerini, siyanoglukozidleri ve mandelonitrilleri içerir [91, 92]. Bu aglikonlar bitki metabolizmasında bir dizi fonksiyonlara sahiptir ve aglikon özgünlüğü de β -glukozidazın bitkideki görevinin belirlenmesi için oldukça önemli bir özelliktir [89].

1.4.5 Bitki β -Glukozidaz Enzimlerinin Önemi

β -Glukozidazlar bitkilerde birçok metabolik olayda yer almaktadırlar Bu nedenle β -glukozidaz enzimleri protein mühendisliğinde, tarım ve ormancılık alanlarında ve biyoteknolojik çalışmalarda oldukça sık çalışılmaktadır. β -glukozidazların (özellikle Familya 1 enzimleri) bitkilerde katıldıkları bazı biyolojik süreçler olarak; bitki zararlılarına karşı savunma mekanizmasında görevli olma, besin kalitesinin artışı, lignin biyosentezi, selüloz metabolizması örnek verilebilir [93-96].

1.4.5.1 Savunma

Bitkiler, bitki zararlılarına karşı savunma mekanizması olarak bünyelerinde toksik maddeleri biriktirirler ve ihtiyaç halinde salıverirler. Bu kimyasal maddeler β -glukozidler ve β -glukosinolatlardır. β -glukozidazlar ve substratları; hücrenin farklı alt yapılarında ya da doku bölümlerinde stoklanır [97]. Patojen veya herbivorların bitki dokularına oluşturdukları zarar; substrat ile enzimin karşılaşmasına, böylelikle substratların hidrolizinin başlamasına neden olur. Hidroliz sonucu açığa çıkan ürünler tiyosiyonatlar, izotiyosiyonatlar, nitriller, HCN, benzaldehitler gibi maddelerdir [92]. Bu maddeler; herbivorları caydırıcı, bitki zararlılarının bitkiye girişini, bitkide

gelişmesini ve dağılmasını engelleyici etki gösterirler. Böylece β -glukozidaz enzimleri bitkilerin savunma sisteminde yer almış olurlar. Örneğin insektalara ve soğuğa karşı dirençte etkili olduğu düşünülen bu enzimler baskılandıklarında bitkide savunma yetersizliği sonucu bazı streslerin ortaya çıktığı gözlenmiştir [98-100].

1.4.5.2 Besin Kalitesinin Artışı

Bitkilerde tat ve lezzet oluşumunda etkili olduğu belirlenmiş oldukça fazla sayıda β -glukozidik ürün teşhis edilmiştir. Bu moleküllerin aglikon parçalarının besin kalitesi ve üretimi üzerine etkili olduğu belirtilmiştir. Bilindiği gibi aglikonların ortaya çıkmaları; β -glukozidaz enzimleri tarafından β -glukozidik substratların hidrolize uğraması yoluyla olmaktadır. Bu yöntem, meyve suyu ve meşrubat üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır [101]. Üretim sırasında ya da sonrasında β -glukozidaz enziminin eklenmesi; ürünlerin tat, lezzet, aroma ve diğer kalite faktörlerinde artış gözlenmektedir[102, 103].

Lahana, karnabahar, brokoli ve turpgillerde bulunan mirosinaz-glukosinolat sistemi, besin kalitesi ve tat oluşumu sürecinde oldukça önemlidir. Glikosinolatların enzimatik hidrolizinden oluşan aglikon parçaları ve bozulma sonrası ürünler, bu sebzelere acı ve kendine has kokularının verilmesinden sorumludurlar [104, 105].

β -Glukozidazların meyvelerin tatlanması üzerine etkili oldukları belirlenmiştir Vanilya tanelerinde bulunan bir β -glukozidaz enziminin vanilin- β -glukozid (glukovanilin) olarak bilinen aroma öncüllerinin hidrolizinden sorumlu olduğu ve vanilya aromasının bu substratın hidroliziyle açığa çıkan ürünlerle ilgili olduğu bildirilmiştir [106]. Monoterpenilglikozid miktarının Muscat üzümünün meyvelerdeki aroma kısmının önemli kısmını oluşturduğu belirtilmiştir [107]. Ayrıca çay yaprağı ile yapılan çalışmada da β -glukozidaz enziminin aromatik tat ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir [108].

1.4.5.3 Selüloz Metabolizması

Selüloz doğada en bol bulunan polimerdir. Bitkilerde ve bazı deniz yosunlarında bulunan hücre çeperinin temel yapısını oluşturur fakat bazı deniz hayvanları ve bakteriler tarafından da üretilir. Selüloz, β -1,4-glukozidik bağıyla bağlanmış yaklaşık 10.000 glukoz rezidüsünden oluşan bir glukoz polimeridir [109].

Pek çok hayvan selülozu besin olarak sindiremez. İnsanların beslenmesinde kullandıkları sebzelelerdeki bu kısımlar posa halini alırlar ve büyük miktarı hemen hemen hiç işlenmeden dışarı atılır. İnekler ve termitler gibi bazı hayvanlar ise selülozu; β -glukozidaz enzimleri aracılığı ile glukozlu besinlere ayıran incebarsak florasına yerleşmiş bakteriler yardımıyla parçalarlar.

Selüloz farklı birçok enzimin birleşik aktivitesi sonucu parçalanır. Bahsedilen enzim tümleşği üç enzimden oluşmaktadır: bir endoglikonaz, bir ekzoglikonaz ve bir β -glukozidaz. Endoglikonazlar selülozun iç β -1,4-glikozidik bağlarını hidrolizle keserek yeni zincir uçlarının oluşmasını sağlar. Ekzoglikonazlar da oluşan bu yeni selüloz zincirlerini uçlardan keserek çözünür sellobiyoz birimleri oluştururlar. Son olarak β -glukozidazlar ise sellobiyoz birimlerini glukoz birimlerine hidroliz ederler [110].

Endüstride selulozik biyokütle yıkımı ve selulozun glukozla dönüşümü mikroorganizmalar ya da izole edilmiş selulaz tümleşği tarafından sağlanmaktadır. Selulaz tümleşğinin, selulozik biyokütlenin degradasyonunda kullanılması β -glukozidazları mühendislik açısından önemli bir materyal haline getirmektedir. Günümüzde enzim katalizli işlemler, daha hızlı, daha ekonomik, çevre dostu, ürün verimi oldukça yüksek ve safsızlık oluşumu oldukça düşük olduğundan, endüstriyel uygulamalarda kimyasal reaksiyonlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler. Enzim katalizli işlemlere duyulan bu ilgi, zamanla dünya genelinde bir enzim pazarının ortaya çıkmasına ve bu alanda yapılan çalışmaların da artmasına neden olmuştur [111, 112].

1.4.5.1 Lignin Biyosentezi

Lignin selülozdan sonra biyosferde bol bulunan ikinci bileşiktir. β -Glukozidaz enziminin koniferini hidrolizi sonucu oluşan koniferil alkol, ligninin biyosentezi için

gerekli en önemli öncül maddedir. Bu durumda bazı bitki β -glukozidazlarının lignin biyosentezinde rol aldıkları ortaya çıkmaktadır [113, 114]. Kaliteli kağıt üretimi ve ağaç yetiştirilmede β -glukozidaz enzimlerine ait bilgilerin kullanılması bu enzimlerin önemini arttırmaktadır.

1.4.1 Zeytin β -Glukozidaz Enzimi

Yüksek kalitede zeytinyağına olan ilginin artması, başta kanser, kalp hastalıkları sağlık açısından birçok faydasının olmasına bağlıdır [115-118]. Fenolik bileşiklerin her iki faktör için de direk etkiye sahip oldukları, özellikle antioksidanların oldukça fazla miktarda besinsel fayda sağladıkları bilinmektedir [119]. Saf zeytinyağında bulunan fenollerin zeytinin dokusunda bulunan fenolik glikozidlerle ve fenolik metabolizmasıyla ilişkisi vardır [118]. Zeytin meyvesinde bulunan ana glikozidler oleuropein, ligstrosit, and dimetiloleuropein'dir. Fakat farklı çeşitlerde verbaskosit, elenolik asit glukosidi, luteolin-7-glukosit, apigenin-7-glukosit, rutin, ve kuersetin-3-rutinosite de rastlanmıştır [120, 121]. Zeytin dokuları patojen istilasına uğrayıp zarar görmeye başladığında fenolik glikozidlerin hidrolizinin kontrolü β -glukozidaz enzimi ile gerçekleştirilir. Bir yaprak herbivorlar tarafından hasara uğratıldığı zaman; organellerdeki β -glukozidaz enzimi oleuropeini güçlü bir protein denature edici ajan olarak aktive eder [122].

Bitki β -glukozidazlarının besin değeri açısından önemi, aroma öncü maddelerini hidrolizleyerek serbest aglikanlar oluşturmalarıdır [123]. Kaliteli zeytinyağının tat ve koku gibi özelliklerini belirlemek amacıyla bugüne kadar birçok çalışma yapılmıştır. Bu verilerin her biri için belirleyici unsur tüketicinin tercihi olmuştur [124]. Saf zeytinyağlarının düşük ya da orta dereceli acı tada sahip olması tüketiciler tarafından istenilen bir lezzettir. Oldukça acı tada sahip olanlar ise tercih edilmezler. Bu sonuç acı tadın zeytinyağının ticareti için önemini ortaya koymaktadır. Acı lezzetin yoğunluğu fenolik bileşiklerin yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Zeytinyağı üreticileri acı tadın giderilmesi için fenol içeriğinin giderilmesini ham maddenin işlenmesi, ısıtma ve parçalama yöntemi ile kontrol altına almaya çalışmaktadırlar [125]. Hem ticari, hem de tıbbi önemi oldukça yüksek olan zeytinyağının kalitesi üzerinde etkisi olan bu enzim karakterize edilmesi için yapılan çalışmalar önemli katkı sağlamışlardır [115, 123, 124, 126-128].

1.5 Metalotiyonein Proteinleri ve Yapısal Özellikleri

1.5.1 Metalotiyonein Proteinleri

Ağır metallerin bitkilerde aşırı derecede birikmesi membran geçirgenliğini zedeleyerek ve enzimleri baskılayarak bitki büyümesini olumsuz etkiler [129].

Ağır metallerin zehir etkisinin giderilmesi için ökaryot organizmalarda özelleşmiş birçok peptid bulunmaktadır. Bitkilerde bu görevi metalotiyonein ve fitoşelatinler üstlenmiştir [130-133].

Yayınlanan ilk metalotiyonein (MT) proteini; kadmiyum (Cd^{+2}) elementini doğal olarak bağlayabilen bir protein olmasıyla araştırmacıların dikkatini çekmiş ve ata ait böbrek korteksinden izole edilmiştir. Sistein (Cys)-tiyolat açısından zengin olması sebebiyle “metalotiyonein” adını almıştır [134, 135]. Bitkilerde ise ilk izole edilen MT bugdaya ait olgun embriyolardan elde edilen Ec tip MT olup Zn^{+2} elementini etkili bir biçimde bağlar [136].

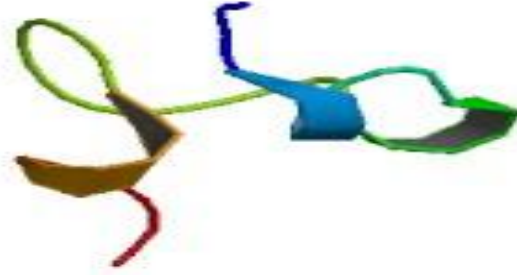
Cys (sistein) rezidülerinin düzenlenişlerine göre tüm MT proteinleri üç sınıf altında toplanır. Tüm bitki MT proteinleri ise Sınıf-II içerisinde yer alır. Bitki MT proteinleri kendi içerisinde üç sınıf ve Ec tip olarak sınıflandırılır [137-141]

Bitki MT proteinlerini memelilerden ayıran en önemli özellikleri; düşük molekül ağırlıklı olmaları, sistein aminoasidi açısından zengin (karakteristik CysCys ve CysXaaCys motiflerini barındıran) aromatik aminoasit içermeyen proteinler olmalarıdır. Bu ölçüt sadece Ec tip proteinlerde iki oldukça iyi korunmuş histidin aminoasit rezidüsüne sahip olmaları ile bozulmuştur [142].

MT proteinlerinin en önemli görevi yaklaşık üçte bir oranda içerdiği sülfidril rezidüsü olan sistein aminoasitlerine Cu, Cd ve Zn gibi ağır metalleri bağlamaktır. MT proteinlerinin metal depolama ve ağır metal zehirlenmesine karşı koruma, gelişme, farklılaşma, metabolizmanın kontrolü, UV ışınlarından ve serbest radikal zehirlenmesine karşı cevap oluşturma gibi görevleri vardır [143].

1.5.2 Metalotiyonein Proteinlerinin Fonksiyonel Özellikleri

Memeli ve mantar metalotiyonein proteinlerinin metallerin zehir etkilerinin giderilmesi amacıyla kullanımlarını belgeleyen oldukça fazla mikterda çalışma bulunmaktadır [144, 145]. Örnek olarak Cd dirençli fare hücreleri, Cd direnci oluşturabilmek için yüksek miktarda metalotiyonein proteini ürettikleri belirlenmiştir[146]. *Saccharomyces cerevisiae* mayasında ise, bakır elementine karşı oluşturulan direnç *CUP 1* metalotiyonein geninin çoğaltılması ve protein kodlaması ile gerçekleşmektedir [143, 147], şekil 1.5. Bunlara ek olarak hayvanlarda bulunan metalotiyonein proteinlerinin oksidatif stres, hücre büyümesinin kontrolü, iyonize radyasyona karşı korunma ve bakır ve çinko metabolizmalarının düzenlenmesi görevlerinde de rol oynadıkları belirlenmiştir [148]

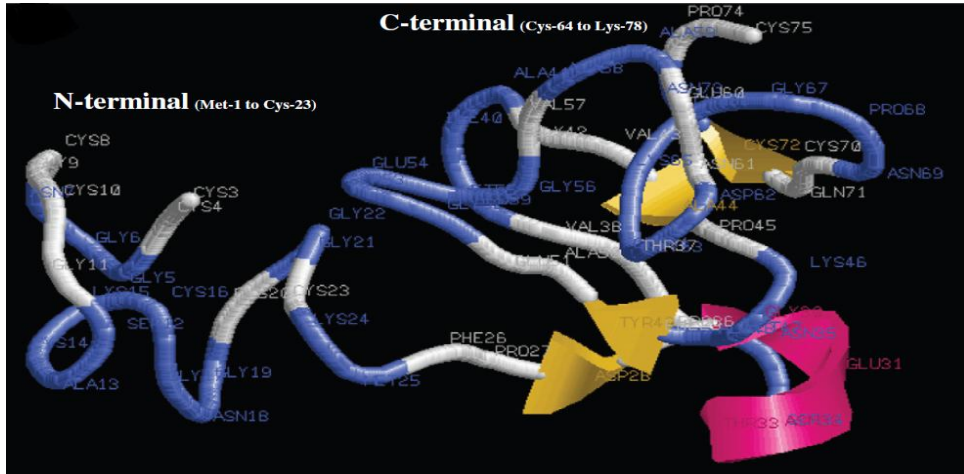


Şekil 1.5: *Saccharomyces cerevisiae* CUP metalotiyonein proteininin 3 boyutlu yapısı [149]

Bitkilerde birçok farklı durumda olan metalotiyonein benzeri proteinleri aydınlatılmıştır. Bu proteinlere ait transkript ürünleri; buğdayda ısı ve sükroz açlığı ile indüklenen [150], kivi meyvesinde meyve gelişimiyle [151], kolzada yaprak dökümüyle [152], elmada soğuk stresinde [153] ve *Sambucus nigra*'da ise yaprakların etilen hormonu etkisi ile dökülmesi sonucu indüklenerek artmaktadır [154].

Bitki metalotiyonein proteinlerinin ayrıca metal bağlama özelliklerinden dolayı metallerin zararsız hale getirilmesi sürecinde de rol oynadıkları bilinmektedir. *Arabidopsis* metalotiyonein proteinleri *MT1* ve *MT2*' nin bakırla indüklendiği tespit edilmiştir. *MT1* ve *MT2* genleri *CUP1* geni delesyona uğratarak bakıra duyarlı hale getirilmiş mutant mayaların, komplementasyon ile *MT1* ve *MT2* proteinlerini ifade

edebildiği gözlenmiştir [130]. *Pisum sativum*' da tanımlanan ve *E.coli*' de ifade ettirilmiş rekombinant metalotiyonein benzeri proteinin (*PsMTa*) ise bakır ve kadmiyum içeren medyada büyütülen hücrelerde metal akümülyasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [155]. Tuzlu ortamlarda yaşayabilen bir bitki olan *Salicornia brachiata*'da tanımlanan SbMT-2 metalotiyonein geninin *E.coli*' de rekombinant ekspresyonu sonucu, bu proteinin bakır, çinko, tuz, sıcaklık ve kuraklık ile indüklendiği belirlenmiştir [156]. Şekil 1.6' da bu proteine ait 3 boyutlu yapı gösterilmiştir.



Şekil 1.6: *Salicornia brachiata* (SbMT-2) proteininin 3 boyutlu yapısı [156]

1.5.3 Fitoşelatinler

Ağır metalleri uzaklaştırmak için özellikle bitkiler tarafından kullanılan metalotiyonein proteinlerine ek olarak, bir başka sistein aminoasidi açısından zengin polipeptidler ise fitoşelatinlerdir (PC) [157, 158].

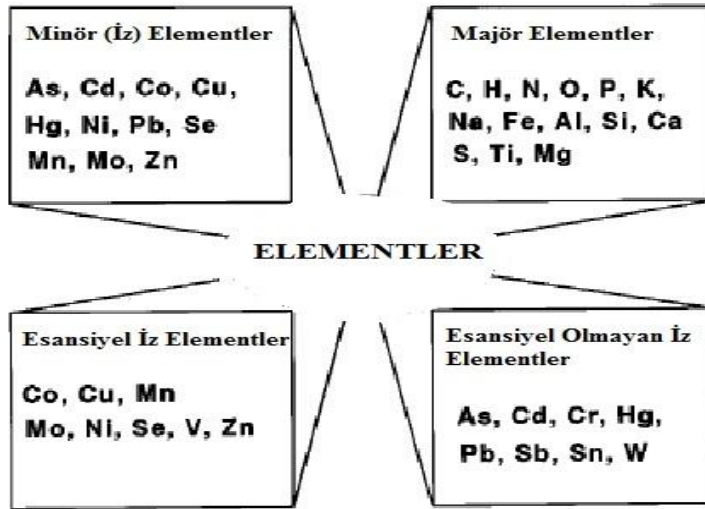
Fitoşelatinler, üç çeşit aminoasit içerir. Bunlar; sistein, glisin (Gly) ve glutamik asittir (Glu) ve genellikle $(\delta\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ şeklinde organize olurlar [132].

Yapılan çalışmalar fitoşelatinlerin direkt olarak metal toleransını artırıcı görevlerinin olmadığını, glutatyonun biyosentetik yolağında rol oynayarak katkıda bulduklarını göstermiştir [131, 132, 141].

1.6 Ağır Metallerin Kimyasal ve Fiziksel Özellikleri

Ağır metaller yer kabuğunun doğal elementleridir. Parçalanamaz ve imha edilemezler. Ağır metaller, yoğunluğu 5 g/cm^3 olarak belirlenen metallere verilen isimdir [159]. Ağır metaller; madencilik, enerji ve yakıt üretimi, aşırı pestisit ve gübre kullanımı gibi endüstriyel aktiviteler sonucu önemli miktarlarda çevreye yayılmaktadır. Ağır metallerin birikmesi sonucu oluşan çevre kirliliği madencilik ve endüstrinin gelişmesi sonucu 19. ve 20. yüzyıllarda daha da fazla artmıştır [160].

Fizyolojik koşullar altında çözünürlükleri dikkate alındığında 17 ağır metalin canlı organizmalar ve çevre için önemli olduğu vurgulanmıştır. Bu metallere demir, molibden ve mangan mikrobeyinler olarak en önemlilerindendir. Kalsiyum, kobalt, krom, bakır, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi bazı metaller hem mikrobeyinler hem de indirgenme-yükseltgenme tepkimeleri, bazı enzimler için kofaktör ve ozmotik basıç düzenleyiciler olarak görev alırlar. Gümüş, alüminyum, kadmiyum, altın, kurşun ve civa gibi diğer birçok metalin biyolojik görevi olmamakla birlikte mikroorganizmalar için de zehir etkileri bulunmaktadır [161].



Şekil 1.7: Metabolik ve besin değeri yüksek elementler ve sınıflandırılmaları [162]

1.7 Ağır Metal Zehirlenmesi

Doğal olarak oluşan yaklaşık 90 elementten 21 tanesi metal olmayan, 16 tanesi hafif metal ve 53 tanesi ağır metal olarak sınıflandırılmıştır. Metaller içerisinde yoğunluğu 5 g/cm^3 olanlar ağır metal olarak sınıflandırılır. Bu metallere Zn, Fe, Ni ve Cu gibi bazıları normal hücre gelişimi için zaruri iken; Hg, Pb, ve Ag gibi bazı metallerin ise hücre fonksiyonlarının olduğu düşünülmemektedir [163].

Geçiş metalleri oldukça az miktarlarda gereklidir ve fizyolojik ihtiyaç için gerekli olan miktarın üstüne çıktığında hücre için zehir etkisi yapabilir. Benzer olarak hiçbir fizyolojik etkisi bulunmayan metal iyonları tolerans limitinin üzerinde bir miktarda hücre içerisine girdiklerinde zararlı etki göstermektedir [164].

Hg^{+2} , Cd^{+2} ve Ag^{+2} gibi yüksek atom numarasına sahip ağır metal katyonları hücre içerisine girdiklerinde SH gruplarına bağlanma eğilimi gösterirler ve enzimlerin aktivitelerini inhibe ederler. Diğer ağır metal katyonları fizyolojik iyonlarla etkileşime girebilir. Örneğin kadmiyum, çinko veya kalsiyum ile, Nikel, kobalt ile ve çinko ise magnezyum ile etkileşime girebilir [164].

Diğer bir zehir etkisi oluşturma mekanizması ise makromoleküllere bağlanarak onların yapısal düzenlerinin değiştirilmesi, inaktive edilmesi ve membran geçirgenliğinin olumsuz olarak etkilenmesi şeklindedir [165].

Metal sebebiyle olumsuz etkilenmiş ve kirlenmiş topraklarda mahsüllerin yetiştirilmesi, çevre kirliliğine sebep olan metallerin kolaylıkla besin döngüsüne girmesine olanak sağlar. Zehirli metallerden etkilenmiş bölgelerde tarım veriminin gözle görülür bir biçimde azaldığı belirtilmiştir [166].

Kadmiyum, bakır, krom, kurşun, civa, nikel, selenyum, gümüş ve çinko gibi ağır metal iyonları zehirli olarak bilinir ve çevreye oldukça eser miktarlarda salınsalar bile hayvan sağlığı için risk oluşturabilir [167]. Zihinsel hasara ve yarı kalıcı beyin hasarına sebep olabilirler. Endüstriyel atık suların geri dönüşümü için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu metodlar arasında en çok nötralizasyon, çöktürme, biyoremediyasyon, iyon değişimi ve emilim bulunmaktadır [168]

Bu teknikler arasında ağır metallerin ortamdan uzaklaştırılması için en çok tercih edilenler ise emilim ve biyoremediyasyondur. Yüksek etkinlikleri, kolay uygulanabilir ve maliyetlerinin ucuz olması bu teknikleri tercih sebebi haline getirmektedir [169].

1.8 Ağır Metallerin Biyolojik Birikimi

Biyolojik birikim; canlı organizmaların metabolik enerjilerinin, metallerin uzaklaştırılması için kullanıldığı aktif bir işlemdir. Biyolojik birikim için gerekli olan aktivasyon enerjisi yaklaşık 63kJ/mol' dür. Bu süreçte metal, hücre membranının diğer tarafına geçer ve orada değişime uğrar [169].

Mikroorganizmaların, küçük boyutlarından dolayı sahip oldukları yüksek yüzey / hacim oranları sayesinde çevrede bulunan metallerle oldukça fazla bir alanda temas halinde bulunurlar. Mikroorganizmalardaki metal birikimi, mikroorganizmaların kirli suların temizlenmesinde kullanılabileceklerinin anlaşılması üzerine son yıllarda oldukça önem kazanmıştır [170].

Mikroorganizmalar tarafından metallerin alınımı, metal iyonlarının kimyasına, organizmanın özgün yüzey özelliklerine, hücre fizyolojisi ve çevreden kaynaklanan fizikokimyasal etkileşime bağlı, oldukça karmaşık bir süreçtir [171].

Ağır metallerin biyopolimerler tarafından bağlanamsı tesadüfî bir şekilde gerçekleşir. Fakat ayrıştırılması ise; metale, türe, yoğunluğa, biyopolimerlerin aktifliğine, biyokütle ve atık sudaki diğer bileşenler bağli olarak değişiklik gösterir [172]. Biyopolimerlerin metalle bağlanma yüzeylerinin artması, mikroorganizmaların metali bağlama özelliklerini arttırmaktadır. Ayrıca metallerin biyopolimerler tarafından bağlanmaları, metallerin zehirli etkilerini azaltmaktadır [173].

1.9 Metal Homeostasisinin Mekanizması

Özellikle belirli bölgelerde çevrenin ağır metaller tarafından oldukça fazla miktarda kirletildiği gözlenmiştir. Özellikle son yıllarda bu kirliliğin çevreye zarar vermeden temizlenmesi amacıyla metalleri biriktirebilen bitkilerin kullanılabilirliği

önem kazanmıştır. Fakat ağır metallerin bitki tarafından alınma, biriktirilecekleri doku ya da hedef organlara taşınma ve zararsız hale getirilme mekanizmaları net olarak aydınlatılamamıştır [174].

Bitkilerin metal homeostasisi ve duyarlılığı mekanizmaları; alım, taşınma, şelasyon ve ayırma basamaklarından oluşmaktadır [174].

Genetik mühendisliği teknikleri ile düzenlenmiş ve değişime uğratılmış organizmalar ağır metallerin çevreye zarar vermeden temizlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. [175]. Günümüzde, biyosorbsiyon olarak adlandırılan ve ucuz, ölü ya da canlı mikroorganizma biyokütlelerinin endüstriyel atıklardan kaynaklanan metal atıkların bağlanması amacıyla kullanılmaları için yapılan çalışmalar oldukça hoz kazanmıştır. Yüksek performansı, düşük maliyeti, metal özgünlüğü ve tekrar tekrar kullanım için uygunluğu nedeniyle biyosorbsiyon işlemini oldukça önemli hale gelmiştir [175-177].

Metallerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılan biyosorbsiyon, farklı birçok türde canlı ya da aktif olmayan bakteri, alg, mantar ve maya kullanılarak oldukça geniş bir biçimde çalışılmıştır [178-182]. İşlem için izlenen basamaklar; yüzey kompleksleşmesi, iyon değişimi ve mikroökölme basamaklarından oluşur [183].

Yapılan çalışmalar, rekombinant insan metalotiyonein II proteinini üreten *E. coli* hücrelerinin endüstriyel atık sularda bulunan yüksek miktarlardaki (50–60mg/L) Cd⁺² temizlenmesi için biyosorbent olarak kullanılabileceğini göstermiştir [184]. Romeyer et al [185] ayrıca, rekombinant *Neurospora crassa* metalotiyonein proteini üreten *E. coli* hücrelerinin Cd⁺² iyonunun etkin bir biçimde akümüle ettiğini belgelemiştir. Günümüzde yapılan diğer çalışmalar, genel olarak immobilizasyon stratejisine dayanmaktadır. Büyük alanlarda ve hacimlerde yapılan çalışmalar için, Cd⁺² içeren endüstriyel atık suların biyosorbent tanelerini içeren kolonlarla muamele edilmesi etkin bir biçimde kullanılabilir [185].

1.10 Çalışmanın Amacı

Zeytin bitkisi, bölgemiz için hem besin hem de ticari anlamda oldukça fazla önemlidir. Çalışma konusunun bölgemize faydalı veriler ortaya çıkarması amacıyla daha önce yapılan zeytin bitkisine ait gen kütüphanelerinin oluşturulması ve önemli genlerin tespiti çalışması sonucunda elde edilen genler, bu çalışmada karakterize edilerek bu genler tarafından kodlanan proteinlerin özellikleri ortaya çıkartılmıştır.

Bu çalışma kapsamında zeytin gen kütüphanelerinden elde edilen metalotiyonein geni ve databankta bulunan ve yaptığımız literatür taraması sonucu sadece mRNA dizisi hariç hiçbir bilgiye rastlamadığımız beta glukozidaz geni moleküler fizyolojik ve biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir.

Çalışmaya başladığımız ilk zamanlarda zeytin beta glukozidaz (ZBG) geni ve enzimi hakkında gene ait mRNA dizisi hariç hiçbir bilgi bulunmazken [186], daha sonraları yapılan literatür taramalarında ise zeytin meyvesinden izole edilen total beta glukozidaz proteininin karakterizasyonu hakkında çalışmalara rastlanmıştır [126, 187, 188].

Çalışma süresince zeytin bitkisine ait metalotiyonein geni ve proteini hakkında 2012 yılında yayınlanan, tip 1 metalotiyonein genine ait kısmi cDNA dizisi [189] dışında bir bilgiye rastlanmamış, genin öneminin son yıllarda oldukça fazla artması dolayısıyla karakterizasyonu çalışmalarına ağırlık verilmiştir.

Doktora tezim kapsamında zeytin beta glukozidaz ve metalotiyonein genlerinin moleküler, fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyonları amacıyla planlanan deney basamakları aşağıda detaylandırılmıştır.

Zeytin beta glukozidaz geninin;

I. Moleküler karakterizasyonu

- Bu genin çeşitli programlar kullanılarak biyoinformatik analizinin yapılması
- İntron analizinin yapılması
- Promotör dizisinin belirlenmesi
- Genom içindeki kopya sayısının belirlenmesi

- Zeytin çeşitleri arasında polimorfizminin belirlenmesi

II. Fizyolojik Karakterizasyonu

- Anlık gösterimli PZR ile dokusal ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi
- Anlık gösterimli PZR ile zamansal ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi
- Anlık gösterimli PZR ile farklı zeytin çeşitleri arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi

III. Biyokimyasal Karakterizasyonu

- Genin PZR ile çoğaltılması
- Çoğaltılma vektörüne klonlanması
- Maya ve *E. coli*' de ekspresyon yapabilmek amacıyla ekspresyon vektörlerine klonlanması
- Protein ekspresyonu
- Proteinin saflaştırılması
- SDS-PAGE elektroforezi
- Western blot yöntemi ile proteinin belirlenmesi
- Saflaştırılan proteinin aktivite tayini
- Saflaştırılan proteinin rölatif aktivitesinin belirlenmesi
- Saflaştırılan proteinin aktivitesi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi
- Saflaştırılan proteinin aktivitesi için en uygun pH' ın belirlenmesi
- Saflaştırılan proteinin aktivitesini arttıran ya da azaltan metallerin IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi
- Saflaştırılan proteinin 4-MUG (4-Metilumbelliferil-β-D-glukuronid) substratı kullanılarak native jel elektroforezi yöntemiyle aktivitesinin belirlenmesi

Zeytin metalotiyonein geninin;

I. Moleküler karakterizasyonu

- Bu genin çeşitli programlar kullanılarak biyoinformatik analizinin yapılması

- İtron analizinin yapılması
- Genom içindeki kopya sayısının belirlenmesi
- Zeytin çeşitleri arasında polimorfizminin belirlenmesi

II. Fizyolojik Karakterizasyonu

- Anlık gösterimli PZR ile dokusal ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi
- Anlık gösterimli PZR ile zamansal ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi

III. Biyokimyasal Karakterizasyonu

- Genin PZR ile çoğaltılması
- Çoğaltılma vektörüne Klonlanması
- *E. coli*' de ekspresyon yapabilmek amacıyla ekspresyon vektörüne klonlanması
- Protein ekspresyonu
- Proteinin saflaştırılması
- SDS-PAGE elektroforezi
- Western blot yöntemi ile proteinin belirlenmesi
- *E. coli*' de metal tolerans deneyleri
- Proteinin ekspresyonu sonrası *E. coli*' de tutulan metallerin ICP ile ölçülmesi

2. MATERYAL VE METOD

2.1 MATERYAL

2.1.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasalların moleküler biyoloji çalışmalarında kullanıma uygun saflıktadır. Kullanılan kimyasallar, kitler ve enzimler Sigma, Fermentas, Qiagen, Roche, NEB, Clontech, Invitrogen, Stratagene, Applichem gibi firmalardan yerli aracı kuruluşlar yoluyla elde edildi.

2.1.2 Çalışmada Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Sterilizasyonu ve Kullanıma Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan tüm pipet uçları, ependorf tüpleri, PZR tüpleri, otoklava uygun çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer tüm malzemeler 121 °C’de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak steril hale getirildi. Otoklavlanan malzemeler kullanılmadan önce 80 °C sıcaklıkta 1 gece bekletilerek kurutuldu.

Yüksek sıcaklık ile yapısı bozulan, otoklav kullanılarak sterilizasyona uygun olmayan solusyonlar için 0,22 µm’lik enjektör ucu filtre kullanıldı.

2.1.3 DEPC’li Suyun Hazırlanması

RNA örneklerini nükleazlardan korumak için RNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin hazırlanmasında DEPC’li su kullanıldı. DEPC’li suyun hazırlanmasında 0,1 mL DEPC 100 mL saf suya eklendi ve alt üst edilerek karıştırıldı. 37 °C’de 12 saat bekletildikten sonra otoklav yapılarak kullanıma hazır hale getirildi.

2.1.4 Örneklerin Toplanması

Ayvalık zeytin çeşidine (*Olea europaea* L. cv. Ayvalık) ait yaprak ve meyve örnekleri Edremit Zeytincilik Fidan Üretim İstasyonuna ait Gömeç'teki zeytinlikten temin edilmiştir. Örnekler toplandıktan sonra vakit kaybetmeden sıvı azot tankına aktarıldı ve taşındı. Tüm örnekler, fakültemizde bulunan - 80 °C dondurucuda çalışmada kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

2.1.5 Agaroz Jel Elektrofrez Çözeltileri

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

2.1.6 Antibiyotikler

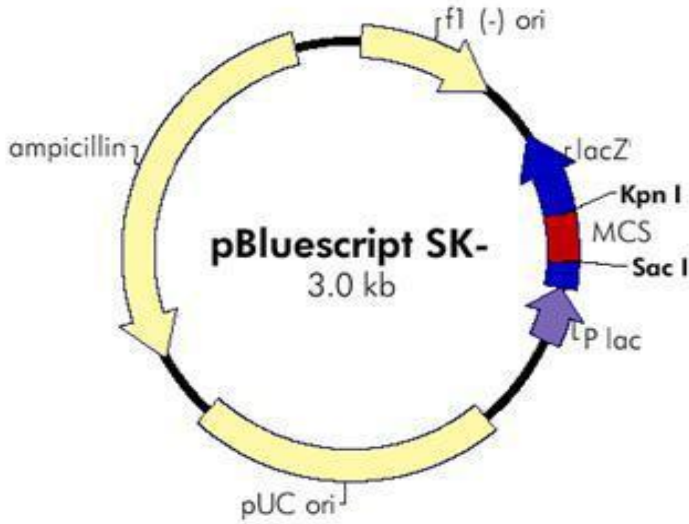
Toz halde ticari olarak temin edilen ampisilin, spektinomisin ve zeozin antibiyotikleri, 100 mg/mL stok çözelti şeklinde hazırlandı ve 0.22 µm steril filtre ile steril edilerek - 20 °C'de muhafaza edildi.

2.1.7 Kullanılan Bakteri ve Maya Suşları

Çalışma sırasında alt klonlama çalışmaları için transformasyonda *E.coli* DH10B: F⁻ endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻, metalotiyonein proteininin ekspresyon çalışması için *E. coli* BL21 (DE3): F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]), beta glukozidaz proteininin ekspresyon çalışması için Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS: Δ(ara-leu)7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL (DE3) F'[lac⁺lacI^f pro] gor522::Tn10 trxB pLysSRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R), *Pichia pastoris*' te ekspresyon çalışmaları için; *Pichia pastoris* X 33-yabanıl tip suşları kullanıldı.

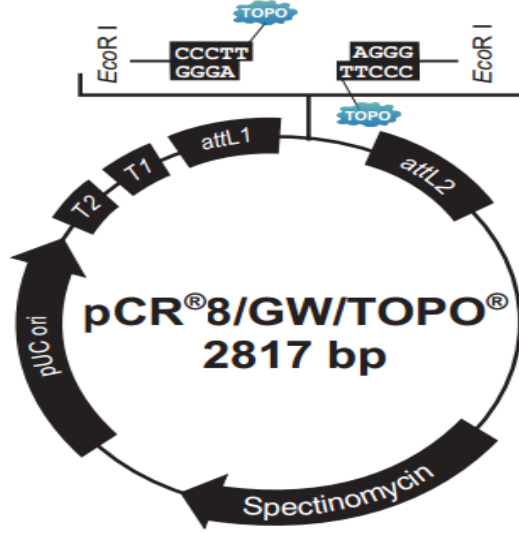
2.1.8 Çalışmada Kullanılan Vektörler

Zeytin β glukozidaz geninin alt klonlanmasında kullanılan pBluescript klonlama vektörüne ait vektör haritası şekil 2.1’ de gösterilmiştir. (PZR Script cloning kit Stratagene Kat. No: #211188).



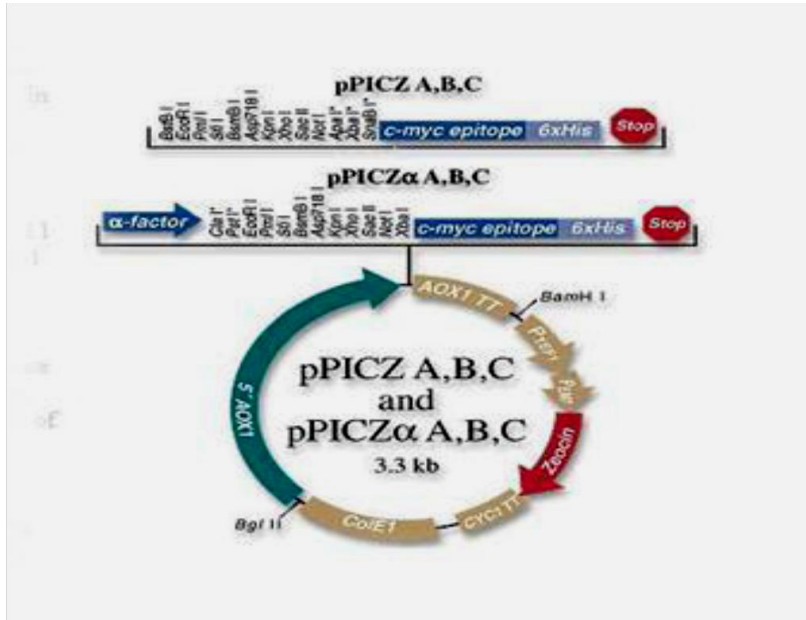
Şekil 2.1: pBluescript SK klonlama vektörü (PZR Script cloning kit Stratagene Kat. No: #211188).

Zeytin β glukozidaz geninin alt klonlanmasında yararlanılan diğer bir kit olan PZR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (İnvitrogen,Kat.No: s K2500-20) dahilinde kullanılan PZR™8/GW/TOPO® TA vektörüne ait vektör haritası şekil 2.2’ de gösterilmiştir.



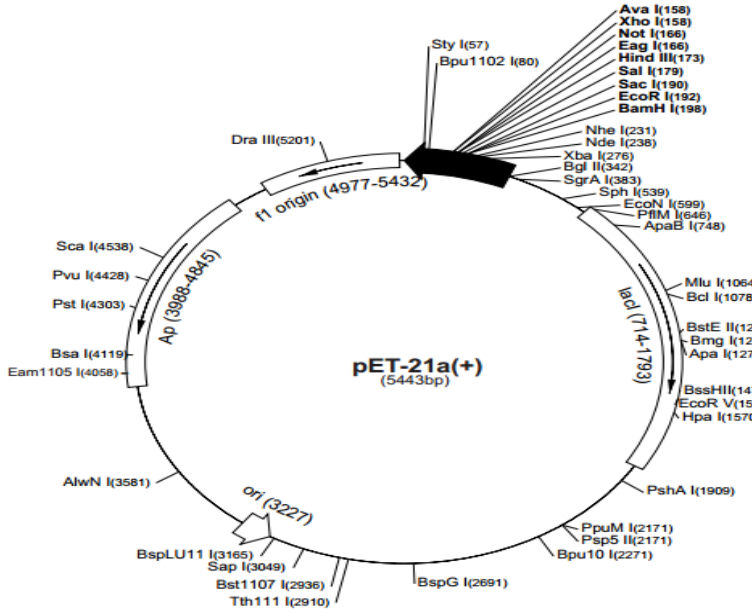
Şekil 2.2: PZRTM8/GW/TOPO[®] vektör haritası PZRTM8/GW/TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (İnvitrogen,Kat.No: s K2500-20)

Zeytin β glukozidaz geninin geninin *Pichia pastoris*' te ekspresyonunda Easy SelectTM *Pichia* ekspresyon kiti (Invitrogen, Vilnius, CA, Kat. No: K1740-01) kullanılmıştır. Ekspresyon vektörü pPICZ α C' ye ait vektör haritası şekil 2.3' de gösterilmiştir.



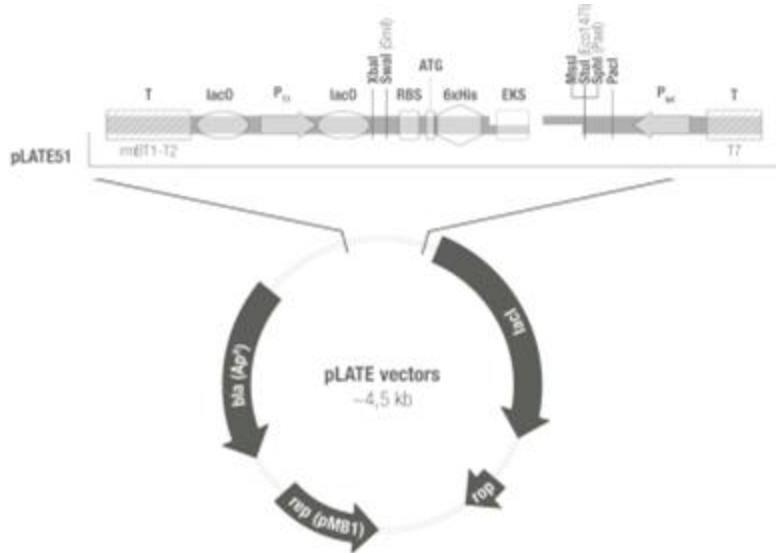
Şekil 2.3: pPICZ α C klonlama vektörü Easy SelectTM *Pichia* ekspresyon kiti (Invitrogen, Vilnius, CA, Kat. No: K1740-01)

Zeytin β glukozidaz geninin geninin *E. coli*' de ekspresyonunda kullanılan pET21a vektörünün haritası şekil 2.4' te gösterilmiştir.



Şekil 2.4: pET21a vektör haritası

Zeytin β glukozidaz geninin ve zeytin metalotiyonein (*OeMT*) geninin bakteriyel ekspresyon çalışmasında kullanılan aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kitine ait PLATE 51 vektörünün haritası şekil 2.5' te görülmektedir.



Şekil 2.5: pLATE51 ekspresyon vektörü aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271)

2.2 METOD

2.2.1 Bakteriyel Teknikler

2.2.1.1 Kùltür Ortamlarının Hazırlanması

LB agar'ın hazırlanması için; 5 g Tripton, 2.5 g yeast ekstrakt, 2.5 g NaCl 200 mL saf suda çözüldü. 3.75 g agar eklendi ve 500 mL'ye tamamlanıp otoklavlandı. Yaklaşık 37 °C'ye kadar soğuduğunda uygun antibiyotik ilave edilerek eklenerek petrilere döküldü.

LB broth hazırlanması için; 5 g Tripton, 2.5 g yeast agar, 2.5 g. NaCl 500 mL saf suda çözüldü ve otoklavlandı.

2.2.1.2 Bakteri Kompetan Hücresinin Hazırlanması

E.coli DH10B, *E. coli* BL21 (DE3) *E.coli* Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS (Invitrogen, Vilnius, CA) bakteri suşları, tek koloni elde edebilmek için antibiyotik içermeyen LB agar besiyerine ekildi. 1 gece 37 °C inkubasyona bırakıldı. 10 mL sıvı LB'ye (antibiyotik içermeyen) tek koloniden alınıp inokülasyon yapılarak 37 °C'de 1 gece 200 rpm'de çalkalayıcı etüvde bekletildi. 100 mL antibiyotik içermeyen LB besiyerine ön kùltürden 5 mL inoküle edildi. 37 °C'de çalkalayıcı etüvde inkübe edildi ve spektrofotometrede absorbans değeri ölçülerek $OD_{600} = 0.4$ absorbans değerine ulaşması beklendi. Daha sonraki işlemlere buzda devam edildi. 100 mL bakteri solusyonu 50 mL'lik 2 falkona alındı. 3000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 25 mL soğuk 0.1 M $CaCl_2$ eklendi ve yavaşça çözüldü. 25 dakika buz üzerinde beklendi. 3000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL 0,1 M $CaCl_2$ ile tekrar çözüldü. 1 - 4 saat arası buzda bekletildi. Kompetan hücreler, kullanılmak üzere 10 mL steril %40'luk gliserol eklenerek önceden buzda bekletilmiş ependorflara aktararak - 80 °C'de saklandı [191].

2.2.1.3 Bakteriyel Transformasyon

Kompetan hücreler - 80 °C dolabından çıkarıldı ve buza alındı. 5 µL ligasyon ürünü ile kompetan hücre (50 µL) aynı tüpe alındı. 30 dakika buzda bekletildi. Isı şoku için 42 °C'de 45 saniye tutuldu. Hemen buza alınarak burada 5 dakika bekletildi. Falkona 450 µL antibiyotiksiz LB besiyeri eklenerek 37 °C'de 1.5 saat çalkalandı. LB agar (+ uygun antibiyotik) içeren petriye 200 µL yayılarak kurutuldu ve 1 gece 37 °C'de inkübe edildi.

2.2.1.4 Plazmit DNA izolasyonu (Küçük ölçekte- Miniprep)

Petrilerde büyüyen koloniler uygun antibiyotik içeren LB broth besiyerine inoküle edildi. 37 °C'de 1 gece 200 rpm'de büyümesi sağlandı. Gene Jet™ plasmid Miniprep (K0501, Fermentas, Vilnius, Lithuania) protokolüne uygun şekilde izole edildi. Ependorf tüplerine aktarılan kültür, 5 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. 250 µL resuspanسیون solusyonu eklenerek 1 tüp olacak şekilde birleştirilerek çözüldü. 250 µL liziz solusyonu eklendi ve alt üst edildi. 350 µL nötralizasyon solusyonu eklendi ve hemen alt üst edildi ve bulutsu görünümün olması kontrol edildi. 5 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant alınıp kolona aktarıldı. 1 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL yıkama solusyonu eklendi ve 1 dakika santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. 50 µL saf su ile elusyon yapıldı ve - 20 °C' de saklandı.

2.2.1.5 Plazmit DNA izolasyonu (Büyük ölçekte – Maksiprep)

200 mL'lik kültür 50 mL'lik 4 falkona paylaştırıldı ve 15 dakika 4000 x g'de 4 °C'de santrifüj edildi. Falkonun birine 10 mL solusyon A (50 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM EDTA) eklenerek pellet çözüldü. Çözülen pellet diğer falkonlara aktarılarak tek tüpte birleştirildi ve 5 mL solusyon A tekrar boş falkonlardan geçirilerek en son 10 mL lik falkona aktarıldı ve 15 mL solusyon B (200 mM NaOH, %1 SDS) eklendi. 30 saniye yavaşça alt üst edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi ve 15 mL solusyon C (3 M potasyum asetat KC₂H₃O₂ (pH 5.5) eklenerek 30 saniye yavaşça alt üst edildi. 10 dakika buzda bekletildi ve otoklavlanmış tülbent ile yeni 50 mL lik bir falkona süzüldü. 10 dakika 4000 x g'de 4 °C'de santrifüj edildi. Süpernatant, 2 adet steril 50 mL' lik

falkona bölündü (~ 20 mL). Üzerlerine 22 mL solusyon F (izoproponal) eklendi ve 20 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı, tüpler peçeteye ters çevrilerek kurutuldu. Pelletlerin her birine 700'er µL %70'lik soğuk etanol eklenerek çözüldü. Toplam 1.4 mL stok elde edildi. Bu çözelti 1.5 mL'lik ependorflara alındı ve 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve tekrar 1 mL etanol ile yıkandı. 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve tüpler peçeteye ters çevrilerek kurutuldu. Pelleti 700 µL solusyon D (10 mM tris - HCl (pH 7,5), 1mM EDTA) ile çözüldü. 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatantı steril 1.5 mL'lik ependorfa alıp üzerine 10 µL RNaz A (10 mg / mL 50 U) ilave edildi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. 700 µL solusyon E (1.6 M NaCl, %13 PEG 8000) eklendi 1 - 2 saniye vortex yapıldı. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 10 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 3 defa 1 mL %70'lik etanol ile yıkandı. 5 dakika 14 000 rpm'de 22 °C'de santrifüj edildi. 15 dakika alkolün uçması sağlandı. Etanol iyice uzaklaşınca 50 µL saf su ile çözüldü. Plazmid, miktar tayini için; 0.5 µL vektör %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü.

2.2.1.6 Plazmit Stoklarının Hazırlanması

Sıvı kültürde büyüyen plazmitlerden 1.5 µL'lik ependorflara 150 µL gliserol ve 850 µL plazmitlerden alınarak stok hazırlandı. - 80 °C'de saklandı.

2.2.2 DNA İle İlgili Teknikler

2.2.2.1 Zeytin gDNA İzolasyonu

Dellaporta ve arkadaşları [190] tarafından geliştirilen gDNA izolasyonu metodu modifiye edilerek kullanıldı. -80 °C dolabında saklanan yaprak örnekleri havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirildi ve sonra ependorf tüpünün yaklaşık 1 / 5'lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azotun uzaklaştığı anda 600 µL ekstraksiyon tamponu (33.6 g Üre, 5 mL NaCl, 4 mL Tris-HCl, 3.2 mL EDTA, 8 mL SDS) ilave edildi. Üzerine 500 µL fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) eklendi ve 5 dakika alt üst edildi. 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant steril bir ependorf tüpüne

aktarıldı. Süpernatant hacmi kadar 3M sodyum asetat (pH 5.2) eklendi. Süpernatant hacmi kadar izopropanol eklendi ve alt üst edildi. 1 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan çökelti 500 µL TE (10 mM, pH 8) ile çözüldü. 5 µL RNAaz A (10 mg / mL) eklendi. 30 dakika 37 °C'de inkübe edilerek RNA'nın uzaklaştırılması sağlandı. Sonra tekrar 55 µL 3 M sodyum asetat (pH 5.2) ve 1 mL etanol (%95'lik) eklendi. - 20 °C'de 30 dakika veya - 80 °C'de 10 dakika bekletildi. 13000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra kalan çökelti %70'lik etanol ile 3 defa yıkandı. 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Oluşan çökeltiden etanol dikkatlice uzaklaştırılıp çökeltideki alkolün tamamen uçması için 15 - 20 dakika kağıt havlu üzerinde bekletildi ve 50 µL'lik TE (10 mM, pH 8.0) ya da dH₂O içerisinde çözüldü ve - 20 °C' de saklandı.

2.2.2.2 Maya gDNA İzolasyonu

Tek bir koloni, 100 µg / mL zeozin içeren 5 mL YPD besiyerinde 250 rpm' de 30 °C sıcaklıkta 1 gece inkübe edildi. Daha sonra kültür, 5 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi ve 1 mL saf su ile yıkandı. 3 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. 500 µL liziz tamponu (100 mM Tris - HCl (pH 8.0), 50 mM EDTA, %1 SDS, eklenerek pellet çözüldü. 700 µL kadar cam boncuklar eklendi ve 2 dakika vorteks yapıldı. 10 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan sıvı yeni ependorfa alındı ve 8 mg / mL'lik *RNAzA*'dan 20 µL eklendi. 37 °C'de 20 dakika inkübe edildi. 275 µL 7 M amonyum asetat (pH 7) eklendi. 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi, 5 dakika buzda bekletildi ve 500 µL kloroform eklendi. Vorteks yapıldı ve ardından 2 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant steril bir tüpe alındı ve üzerine 1 mL izopropanol ilave edildi. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ve ardından 5 dakika 12 000 rpm'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı ve kalan pellet %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra kurutuldu. 50 µL saf suda çözüldüldükten sonra kullanılıncaya kadar - 20 °C' de saklandı.

2.2.2.3 DNA Agaroz Jel Elektroforezi

Örneklerin gözlemlenmesi için %0.8'lik agaroz jel elektroforezi hazırlandı. Jelin hazırlanması için, 0.4 g agaroz tartıldı ve 50 mL 0.5X TBE tamponu içinde kaynatılarak

çözüldü. Karışım soğutulduktan sonra içerisine 1 µL (0.5 µg / mL) etidyum bromür ilave edilerek jel kasetine döküldü ve katılaşması beklendi. Jel katılaştıktan sonra elektroforez tankına yerleştirilen kasetin üzerini kaplayıncaya kadar 0.5X TBE tamponu eklendi. Örnekler yüklendikten sonra 120 V - 45 dakika yürütüldü. UVP UV transillüminatörde gözlendi ve fotoğrafı çekildi.

2.2.2.4 DNA' nın Temizlenmesi

Agaroz jel elektroforezinde yürütülen PZR ürünlerine ait istenilen DNA bantları jelden kesilerek ve Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purifikasyon Kit (Thermo, A.B.D.) kullanılarak jelden geri kazanıldı.

StrataPrep® PCR Purification Kit (Stratagene, A.B.D.) kullanılarak alt klonlama çalışmaları için jelden geri kazanılma işlemi yapıldı. Dört tane 50 µL PZR tüpü birleştirildi. (~ 6000 ng). Üzerine 200 µL DNA Binding Solution eklendi. Kit içerisinde bulunan Microspin cup'a aktarıldı. 30-35 sn 13 000rpm'de santrifüj edildi. Kolon altında kalan solusyon atıldı. Kolona 750 µL wash buffer eklendi. 30-35 sn 13000rpm'de santrifüj edilir. Altında kalan solusyon uzaklaştırıldı. 30-35 sn 13000rpm'de santrifüj edildi. Kolon, 1.5 mL ependorfa aktarıldı. Elüsyon için kolona 50 µL saf su eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. 30-35 sn 13 000rpm'de santrifüj edildi.

2.2.2.5 Jelden Geri Kazanılan PZR Ürününün Küt Uçlu Hale Getirilmesi

StrataPrep® PCR Purification Kit (Stratagene, A.B.D.) kullanılarak; 10 µL jelden geri kazanılmış pzs ürünü, 1 µL 10 mM dNTP, 1.3 µL 10X polishing buffer, 1 µL cloned Pfu DNA polimeraz (0.5 U) pipetlenerek iyice karıştırıldı. Üzerine steril mineral yağdan 20 µL ilave edildi. 30 dk. 72 °C' de inkübe edildi. +4 °C' de kullanılabilece kadar saklandı.

2.2.2.6 Miktar Tayini

Ligasyon için gerekli olan örneğin miktarını belirlemek için 1 µL örnek %0.8'lik agaroz jelde yürütüldü. Markır ile istenilen DNA bantının parlaklığı karşılaştırıldı.

2.2.2.7 gDNA'nın Etanol ile Saflaştırılması ve Konsantre Edilmesi

İzole edilen gDNA örneklerine 1 X 3 M NaAc (pH 5.5) eklenip alt üst edildi ve 3 X %100 etanol eklendi ve – 80 °C'de 10 dakika bekletildi. 10 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 1 mL %70'lik etanol eklendi ve 13 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Alkolün tamamen uçması sağlandıktan sonra 10 µL TE ya da steril su ile çözüldü. Elde edilen gDNA örnekleri jelde yürütüldü ve miktar tayini yapıldı.

2.2.2.8 Restriksiyon Enzimleri İle Kesim

Klonlama ve ekspresyon çalışmaları için kesim uygulanacak plazmidler, kullanılan restriksiyon enzimleri (NEB, İngiltere), uygun tampon ile birlikte 3-5 saat 37 °C'de inkübe edilerek kesim yapıldı.

2.2.2.9 Ligasyon

PZR ürünleri, gDNA örnekleri, cDNA örnekleri kullanılacak olan vektörlere ait protokolda belirtildiği şekliyle genel olarak 20 µL toplam hacim olacak şekilde, 1 µL vektör (50 ng), 15 µL insert, 2 µL 10 x T4 ligaz tamponu (NEB, İngiltere) ve 1 µL T4 DNA ligaz (NEB, İngiltere) +16 °C'de bir gece inkübe edildi.

1 µL PZR Script Amp SK(+) vektör (10 ng / µL), 1 µL 10X reaction buffer, 0.5 µL 10 mM dNTP 6 µL küt uçlu hale getirilmiş ürün (200 – 600 ng), 1 µL srf 1 enzimi, 1 µL T4 DNA Ligaz oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra 65 °C sıcaklıkta enzim inhibisyonu için 10 dakika bekletildi. Trasformasyon işlemine başlayıncaya kadar buz üzerinde bekletildi.

PZR™8/GW/TOPO® TA vektörüne klonlama yapmak için istenilen bölgeyi pzs ile çoğalttıktan sonra 4 µL pzs ürünü, 1 µL tuz solüsyonu, 1 µL TOPO® TA vektör 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Alicator pLATE51 vektörüne liagasyon basamağ şu şekilde yapıldı; 2 µL 5X LIC tamponu, 1 µL T4 DNA polimeraz (1U / µL), 1 µL saf su, 6 µL PZR ürünü oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 0.5 M EDTA'dan 0.6 µL eklendi. 1 µL pLATE51 vektörü eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında beklendi.

2.2.2.10 PZR Deneyleri

PZR reaksiyonları için 2.5 µL tampon (10X), 1.5 µL MgCl₂ (25 mM), 1.5 µL DMSO, 0.4 µL dNTP (10 mM her biri için), 3.5 µL F primeri (10 µM), 3.5 µL R primeri (10 µM), 0.5 µL enzim (5U), 6.6 µL saf su, DNA veya cDNA örneğinden 5 µL kalıp kullanıldı. ZBG (Zeytin β-glukozidaz geninin klonlama, polimorfizm ve intron dizisinin belirlenmesi amacıyla dizayn edilen uygun primerlerle PZR'de çoğaltıldı. PZR programı; 1 döngü; 94 °C'de 5 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü, 72 °C'de 5 dakika olarak ayarlandı.

OeMT2 geni, için kullanılan PZR programı; 1 döngü; 94 °C'de 5 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 1 dakika, 55 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü, 72 °C'de 5 dakika koşullarında PZR yapıldı. Elde edilen PZR ürünleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve jelden geri kazanıldı.

2.2.2.10.1 Rekombinant Kolonilerin Belirlenmesi

Rekombinant koloniler, uygun restriksiyon enzimleri ile kesilerek ve ya koloniden pzs yöntemi ile belirlenmişlerdir. Koloni pzs için 2.5 µL tampon (10X), 1.5 µL MgCl₂ (25 mM), 0.5 µL dNTP (10 mM her biri için), 0.5 µL F primer (10 µM), 0.5 µL R primeri (10 µM), 0.5 µL enzim (5U), 18 µL saf su ve 1 µL sulandırılmış koloni

(koloninin 10 µL suda çözünmesiyle elde edilmiştir) ile PZR yapıldı. Elde edilen PZR ürünleri %0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü.

2.2.2.10.2 TAIL-PZR Protokolü

TAILPZR'da 3 ardışık reaksiyonda her bir reaksiyon için 1 tane gen spesifik primer ve düşük Tm sıcaklığına sahip rastgele bağlanan AD (arbitrary degenerate) primerleri (AD1, AD2, AD2a, AD3, AD5 ve tüm AD primerlerinin eşit oranda birleştirilmesiyle oluşturulan ADmix) kullanıldı. Çalışmada kullanılan primerler tablo 3.2' de belirtilmiştir.

2.2.2.10.3 TAIL PZR1 Basamağı

Tail PZR deneyinin 1. basamağında; 2.5 µL NH₂SO₄ 10X PZR tamponu, 1.5 µL MgCl₂, 0.4 µL 10 mM dNTP, 1 µL DMSO, 1 µL ZBGT1 (5 mM) primeri, 5 µL AD primeri, 2 µL gDNA (20 ng), 0.5 µL Taq DNA Polimeraz, 10.1 µL saf su ile 1 döngü; 92 °C'de 3 dakika, 95 °C'de 1 dakika, 5 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 25 °C'de 2 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 15 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 44 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PZR yapıldı. (Tüm PZR bileşenleri Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir).

TAIL PZR1 ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılmadan 1 µL TAIL PZR1 ürününe, 39 µL saf su ilave edilerek 1 / 40 oranında seyreltildi. Her AD primer için ayrı reaksiyon kuruldu.

2.2.2.10.4 TAIL PZR2 Basamağı

Tail PZR deneyinin 2. basamağında; 2.5 µL NH₄SO₄ 10X PZR tamponu, 1.5 µL MgCl₂, 0.4 µL 10 mM dNTP, 1 µL DMSO, 1 µL ZBGT2 primeri (5 mM), 5 µL AD primeri, 1 µL 1 / 49 seyreltilen TAIL PZR1 ürünü, 0.5 µL Taq DNA Polimeraz, 11.1 µL

saf su ile 12 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 60 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 94 °C'de 30 saniye, 45 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PZR yapıldı. (Tüm bileşenler Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir).

2.2.2.10.5 TAIL PZR3 Basamağı

TAIL PZR2 ürünleri agaroz jel elektroforezi yapılmadan 1 µL TAIL PZR2 ürününe, 9 µL saf su ilave edilerek 1 / 10 oranında seyreltildi. Her AD primer için ayrı reaksiyon kuruldu. Tail PZR deneyinin 3. Basamağında; 5 µL NH₄SO₄ 10X PZR tamponu, 3 µL MgCl₂, 0.8 µL 10 mM dNTP, 2 µL DMSO, 2 µL ZBGT3 primeri (5 mM), 10 µL AD primeri, 1 µL 1 / 10 seyreltilen TAIL PZR2 ürünü, 1 µL Taq DNA Polimeraz, 25.2 µL saf su ile 20 döngü; 94 °C'de 30 saniye, 45 °C'de 1 dakika, 72 °C'de 2 dakika, 1 döngü; 72 °C'de 5 dakika koşullarında PZR yapıldı. (Tüm bileşenler Fermentas, Vilnius, Lithuania'dan temin edilmiştir.)

2.2.2.11 Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi İçin Uygulanan Deneyler

2.2.2.11.1 Radyoaktif Prob ile Yapılan Southern Blot Deneyleri

2.2.2.11.2 Radyoaktif Prob ile Southern Blot için gDNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Toplam gDNA konsantrasyonunun 20 µg olması için gDNA kalıbından (~ 250.4 ng/ µL) 80 µL alındı, 5 µL *EcoRI* veya 8 µL *EcoRV* (NEB, İngiltere), 50 µL BSA, 50 µL tampon ile son hacim 200 µL olacak şekilde kesim reaksiyonu kuruldu ve 3 saat 37 °C'de inkübe edilen örneklere 5 µL (20 000 U / µL) enzim eklenerek bir gece bekletildi. Tüm kesim ürünü jelde yürütüldü.

2.2.2.11.3 Southern Blot için Gerekli Olan Tamponların Hazırlanması

Radyoaktif izotop kullanarak uygulanan southern blot çalışmasında kullanılan tamponlar:

50X Denhertz Tamponunu; 1 g fikol 400, 1 g BSA, 1 g PVP, 100 mL olacak şekilde saf suyla tamamlanarak filtre edildi. 20X SSC Tamponunu; 175.3 g NaCl, 88.2 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı. Denaturasyon Tamponunu; 87,7 g NaCl, 20.0 g NaOH, 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı. Nötralizasyon Tamponunu; 87.7 g NaCl, 60.6 g tris, 2 mL 500 mM EDTA, 43.25 mL HCl, 1 litre olacak şekilde saf suyla tamamlandı. Hibridizasyon Tamponunu; 1.5 mL 20X SSC, 2 mL 50X denhertz, 200 μL %10 SDS, 16.3 mL saf suyla tamamlandı.

Yıkama Tamponunu; 100 mL 20X SSC, 10 mL %10 SDS, 9890 mL saf suyla tamamlandı. Salmon Sperm DNA solüsyonu; 10 mg / mL (İnvitrogen, kat. No: 15632-011). Sıyırma Tamponunu; 22.5 mL HCl (%36), 100 mL olacak şekilde saf su ile tamamlandı.

2.2.2.11.4 Southern Blot Düzeneğinin Hazırlanması

Jelin yıkanma basamakları için örneklerin yürütüldüğü jel bir tepsiye alındı ve üzerine 200 mL HCl eklenip 15 dakika çalkalandı. Jel saf su ile yıkandı ve üzerine 200 mL denaturasyon tamponu eklenip 12 dakika çalkalandı. Bu işlem 2 kere tekrar edildi. İkinci yıkamadan sonra saf su ile yıkandı ve 200 mL nötralizasyon tamponu eklenerek 12 dakika 2 kez çalkalandı.

3 mm kalınlığındaki Whatman kromatografi kağıtlaritesinin hazırlanması için jel büyüklüğü kadar (7 - 10cm olacak şekilde) kesildi. Steril bir tepsiye agaroz jel kaseti ters çevrilerek kondu. Onun üzerine kaplayacak şekilde ve kağıtların ucunun tepsiye eklenecek tampona değmesi sağlanacak şekilde 4 kat, 26 cm uzunluğunda 10 cm eninde Whatman kağıtları ile kaplandı. 400 mL 20X SSC tamponu eklendi ve kromatografi kağıtlarının ıslanması sağlandı. Bu aşamada kabarcık kalmaması için üzeri plastik bir merdane ile düzlendi. Kağıtların üzerine önce jel (jelin kenarı kesildi) ve üzerine membran yerleştirildi ve en üstte 7 - 10cm ölçülerinde kesilen kromatografi kağıtları

eklendi. SSC tamponu eklendi ve kabarcık oluşumunu engellemek için tekrar düzlendi. Üzerine ağırlık yapması için kağıt ve ağırlık kondu. SSC tamponu tekrar eklendi. 1 gece bu şekilde beklemesi sağlandı ve üzerindeki ağırlıklar alınarak membran, kurutma kağıdının arasına konarak + 80 °C’de 2 saat bekletildi.

2.2.2.11.5 Probun Jelden Kazanılması ve Miktar Tayini

Prob PZR ürünleri %1’lik TAE içeren agaroz jele yüklendi. 90 V - 40 dakika yürütüldükten sonra jelden kesildi ve (Qiagen Hilden, Germany) jel ekstraksiyon kiti ile jelden geri kazanıldı. Nanodrop cihazı ile ZBG genine ait prob miktarı 87.6 ng / µL olarak ölçüldü.

2.2.2.11.6 Probun Hazırlanması

Hibridizasyon tüpünün içine yürütülen DNA örnekleri iç yüzeye bakacak şekilde membran yerleştirildi. Hibridizasyon tamponu eklendi ve + 64 °C’de dönerek 1 saat inkübe edildi.

Prob için işaretlenecek DNA örneğinden 5 µL (87.6 ng / µL), 2 µL primer karışımı, 1 µL P³² dCTP (0.37 MBq / 10 µC) eklendi. 10 dakika 37 °C’de inkübe edildi. 90 µL TE tampon eklenerek hacmi 100 µL tamamlandı. Sephadex 50 kolonuna eklendi. 3 dakika 2500 x g’de santrifüj edildi. Elue edilen prob yeni tüpe aktarıldı. 500 µL salmon sperm DNA’sı (2.5 mg / mL stok) eklendi. Prob karışımı 95 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerinde bekletildi.

2.2.2.11.7 Hibridizasyon

Prob karışımı hibridizasyon şişesine eklendi ve 12 - 16 saat dönerek inkübasyona bırakıldı.

2.2.2.11.8 .Blotun Yıkanması

Hibridizasyon solusyonu dikkatlice lavaboya döküldü. Blot 2 defa 5'er dakika 65 °C'de 2X SSC / %0.1 SDS ile yıkandı (150 - 200 mL her yıkama için) ve aynı tampon ile 20 dakika 60 °C'de çalkalandı. Membran plastik bir poşet ile kaplandı.

2.2.2.11.9 Filmin Hazırlanması

Kaplanan membranın DNA örneklerini içeren yüzü kasetin içine gelecek şekilde kasete yerleştirildi ve üzerine Fujifilm Super RX X-Ray film yerleştirildi. - 80 °C'de 2 - 15 gün bekletildi. Film 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.

2.2.2.11.10 Anlık Gösterimli PZR ile Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi

Zeytin gDNA örneği (186.7 ng), 1 / 100 oranında seyreltilerek 2 µL ve 4 µL olacak şekilde 3 tekrarlı 2' şer set olarak kuruldu. Buna göre; 2 µL gDNA, 1 µL F primer, 1 µL R primer, 16 µL saf su kullanılarak birinci set, 4 µL gDNA, 1 µL F primer, 1 µL R primer, 14 µL saf su kullanılarak ise ikinci set anlık gösterimli PZR'ı 1 döngü; 95 °C'de 1 dakika, 35 döngü; 94 °C'de 15 saniye, 55 °C'de 15 saniye, 72 °C'de 15 saniye, 1 döngü; 72 °C'de 1 dakika koşullarında kuruldu. Ct değerlerinin karşılaştırılmasına dayalı olarak grafik hazırlandı.

2.2.3 RNA İle İlgili Teknikler

2.2.3.1 Total RNA İzolasyonu

Zeytin yapraklarından toplam RNA izolasyonu Qiagen, Hilden, Germany RNeasy Plant Mini Kit, Kat. No: 74904) kiti kılavuzu takip edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır:Sıvı azot kullanılarak iyice soğutulan steril havanda, izolasyon için - 80 °C dolabından çıkarılan yaprak örnekleri sıvı azotla toz haline getirildikten sonra ependorf

tüpünün yaklaşık 1 / 5'lik seviyesine gelecek kadar dolduruldu. Sıvı azot uçar uçmaz, 450 µL RLT tamponu ilave edildi. Vortex ile homojen olarak karışması sağlandı. Lila renkli kolona aktarılan örnekler, 2 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edildi. Dipte kalan tabakaya değmeden sıvı kısım alınarak 1,5 µL'lik steril ependorflara aktarıldı. 225 µL etanol eklenerek alt üst yapıldı. 650 µL alınarak pembe renkli kolona aktarıldı ve 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan tabaka döküldü. 700 µL RW1 tamponu eklendi. 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Altta kalan sıvı döküldü. 2 mL'lik steril toplama tüplerine kolon yerleştirildi. 500 µL RPE tamponu eklendi. 15 saniye 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak 2 defa tekrarlandı. En son etanol'ün tamamen uçması için kolon 30 saniye boş santrifüj edildi. 30 µL DEPC' li su ilave edildi ve 1 dakika 10 000 rpm'de santrifüj edildi. Bu basamak tekrarlandı. 60 µL'lik DEPC' li su içinde RNA örnekleri elde edildi.

2.2.3.2 RNA Örneklerinin DNase I İle Muamele Edilmesi

Total RNA örneklerinden gDNA'nın uzaklaştırılması için 60 µL RNA (~30 ng), 10 µL DNazI tamponu 10X, 30 µL DNazI enzimi (EN0515, Fermentas, Vilnius, Lithuania) ile toplam 100 µL olacak şekilde hazırlandı. 37 °C'de 30 dakika bekletildi. 350 µL RLT tamponu (Qiagen Hilden, Germany, plant RNAeasy izolasyon kitinden) eklendi. 250 µL %96'lık etanol ile karıştırıldı. 700 µL lik örnek Plant RNAeasy izolasyon kitindeki pembe kolonlara aktarıldı. 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolon.yeni bir 2 mL'lik toplama tüpüne alındı. 500 µL RPE tamponu eklendi. 8000 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Boş santrifüj edilerek altta kalan döküldü. 1,5 mL'lik ependorflara kolon alındı. 50 µL RNaz içermeyen saf su eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.

2.2.3.3 cDNA Eldesi

cDNA eldesi RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Vilnius, Lithuania, Kat. No: K1631) tarifesi takip edilerek şu şekilde yapıldı: 5 µL total RNA, 1 µL oligonükleotit, 6 µL DEPC'li su ile birlikte 3 - 5 saniye santrifüj edildi. 5 dakika 70 °C'de inkübe edildi. 4 µL 5X tampon, 1 µL ribonükleaz inhibitörü ve 2 µL

dNTP buz üzerinde ilave edildi ve 5 dakika 37 °C’de inkübe edildi. 1 µL Reverse Transkriptaz enzimi eklendi. 60 dakika 42 °C’de ve 10 dakika 70 °C’de inkübe edildi. Kullanılınca kadar buz üzerinde bekletildi.

2.2.3.4 Anlık Gösterimli PZR Protokolü

Bunun için Exicycler™ 96 BIONEER cihazı kullanıldı. Reaksiyon hazırlanırken kullanılan tabakalarda bulunan liyofilize halde bulunan içeriğe, 17 µL saf su, 1 µL cDNA kalıbı, 1 µL F primer, 1 µL R primer eklenerek; 1 döngü; 94 °C’de 5 dakika, 35 döngü; 94 °C’de 25 saniye, 55 °C’de 25 saniye, 72 °C’de 30 saniye, 1 döngü; 72 °C’de 1 dakika olacak şekilde Tablo 3.2’ de belirtilen primerler ile Tablo 3.3’de belirtilen kontrol primerleri kullanılarak uygulanmıştır.

2.2.3.5 Anlık Gösterimli PZR için Standart Çalışması

ZBG ve *OeMT2* genlerinin ait primerler kullanılarak 10 adet örnek $1-10^{-10}$ şeklinde seyrelterek standart çalışması yapıldı. Bu çalışmadan elde edilen formül kullanılarak analiz yapıldı. Kopya sayısı; standart çalışması sonucu elde edilen Kopya sayısı = $(-0,3909\Delta Ct + 13,8664)$ formülü ile hesaplanmıştır.

2.2.4 Bakteriyel Ekspresyon

2.2.4.1 Ekspresyonun IPTG ile İndüklenmesi

Ekspresyon amacıyla ilgili geni klonladığımız ekspresyon vektörü, ekspresyon suşları olarak metalotiyonein için *E.coli* BL21 (DE3), beta glukozidaz geni için ise *E.coli* Rosetta-gami™ 2(DE3)pLysS hücrelerine transforme edildi. 100 µg / mL ampisilin içeren LB medyuma tek koloniden ekim yapılarak 16 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmak suretiyle ön kültür hazırlandı. Hazırlanan bu ön kültürün 10 mL’si son konsantrasyonda 12,5 µg / mL ampisilin içeren 100 mL LB besiyerine inokule edildi. 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. Bakteri kültürünün OD₆₀₀ değeri 0,6 –

0,8'e ulaştığında son konsantrasyonu 1 mM olacak şekilde IPTG ile indüklendi. İnkübatörün sıcaklığı 25 °C'ye indirilerek 3 saat ve bir gece olacak şekilde 250 rpm' de çalkalanarak inkübe edildi.

2.2.4.2 Hücrelerin Yıkınması

İndüklenme süresi sonunda bakteri kültürü 3000 rpm'de + 4 °C'de 20 dakika santrifüjlendi. Hücre pelleti yıkama tamponunda (50 mM Tris - HCl, 1 litre saf su) çözüldükten sonra tekrar 10 dakika santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlanmak suretiyle hücreler yıkanarak kurutuldu ve - 20 °C'ye kaldırıldı.

2.2.5 Maya İle İlgili Teknikler

2.2.5.1 Tamponların Hazırlanması

YPDS + Zeozin Agar Petri Hazırlanması (100 mL) için; 1 g yeast extract, 2 g pepton, 18.2 g sorbitol (0.1 M), 90 mL saf suda çözülüp, otoklavlandı. Soğuyunca üzerine; 10 mL 10X dekstroz 100 µL 100 mg / mL zeozin eklendi. Petrilere döküldü.

YPD Medyum Hazırlanması (100 mL) için; 1 g yeast extract, 2 g pepton, 90 mL saf suda çözüldü, otoklavlandı. Soğuyunca üzerine 10 mL 10X dekstroz ve 2 g agar eklendi.

BMGY Besiyerinin Hazırlanması için; 35 mL saf su (otoklavlanmış, soğutulmuş), 5 mL YNB, 5 mL 10X gliserol, 5 mL EDTA, 100 µL biotin eklendi.

BMMY Besiyerinin Hazırlanması için; 35 mL saf su (otoklavlanmış, soğutulmuş), 5 mL YNB, 5 mL 10X metanol, 5 mL EDTA, 100 µL biotin eklendi.

2.2.5.2 Maya Kompetan Hücresinin Hazırlanması

10 mL YPD içine tek koloni *Pichia pastoris* X 33 suşu ekildi ve 28 - 30 °C'de 1 gece 2500 -3000 x g'de çalkalandı. Kültür (OD₆₀₀) dalga boyunda 0.1 – 0.2 absorbans değerine ulaştığında 1 mL alındı ve 10 mL'lik YPD'ye aktarıldı. 28 - 30 °C'de 1 gece 200 - 300 rpm'de OD₆₀₀ = 0.6 – 1.0 absorbans değerine ulaşmaya kadar çalkalandı. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi ve supernatant uzaklaştırıldı. 10 mL solusyon I (Invitrogen, Vilnius, CA, EasySelect TM *Pichia* Expression Kit Kat. No: K1740-01) ile çözüldü. 500 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL solusyon I ile tekrar çözüldü ve 50 - 200 µL olacak şekilde ependorflara aktarılarak - 80 °C'de stoklandı.

2.2.5.3 Mayaya Transformasyon

50 µL X-33 kompetan *Pichia pastoris* hücresi oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. 5 µL (~3 mg) Pme1 restriksiyon enzimi ile lineerize edilen ZBG geninin klonlandığı pPICZαC vektör eklendi. 1 mL solusyon II (PEG solusyonu (150 mL) eklendi. 2 saniye vortex yapıldı. 1.5 saat 33 °C'de su banyosunda inkübe edildi. 15 dakika aralıklarla 1 - 2 saniyelik vortex yapıldı. 42 °C'de 14 dakika ısı şoku yapıldı. 525 µL olacak şekilde 2 tüpe ayrıldı. Herbir tüpe 1'er mL YPD medyum eklendi. 30 °C'de 1 saat inkübe edildi (çalkalama yok). 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelletleri 500 µL solusyon III'te çözülerek birleştirildi. 3000 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Pellet 100 - 150 µL solusyon III'te çözüldü. YPDS agar petrilere yayıldı ve 30 °C'de 48 - 72 saat bekletildi.

2.2.5.4 *Pichia pastoris*' te Ekspresyon

Ekspresyon için en fazla aktivite veren koloninin seçilmesi için toplam 22 tane koloni 2 ayrı 12 well plate' te bulunan 2 mL BMGY besiyerine ekildi. OD₆₀₀ = 2-6 aralığına geldiği zaman hücreler 3000 rpm ' de 5 dk santrifüj edildi ve pellet, OD₆₀₀ = 1 değerine gelmesi için BMM besiyerinde çözüldü. 24 saat 250 rpm, 30 °C indüklendi. 24 saat sonra besiyerinden 100 µL alınarak 8000 rpm ' de çöktürüldü. Supernatanttan 70 µL alınarak enzim aktivitesi tayini yapıldı. Kültür üzerine %0.5 olacak şekilde %100' lük

metanol ilave edilerek çalkalanmaya devam etti. Bu işlem 4-5 gün boyunca her 24 saatte tekrar edildi. Aktivitenin en yüksek olduğu koloni ve gün belirlenerek ekspresyon büyük hacimde yapıldı.

Büyük hacimde ekspresyon çalışmalarında, 25 mL BMGY besiyerine tek koloni ekimi yapıldı ve 300 rpm' de 30 °C 1 OD₆₀₀ = 2-6' ya ulaşınca kadar çalkalandı. Hücreler, 1,500-3,000 × g 5 dakika oda sıcaklığında santrifuj edildi ve supernatant dökülerek pellet OD₆₀₀ 1.0 olması için BMMY (100-200 ml) medyumda çözüldü. Kültür üzerine %0.5 olacak şekilde %100' lük metanol ilave edilerek çalkalanmaya devam etti. Bu işlem 4-5 gün boyunca her 24 saatte tekrar edildi.

2.2.6 Protein Teknikleri

2.2.6.1 Lowry Yöntemiyle Kantitatif Protein Tayini

Protein miktarı ölçümleri Lowry metoduna göre hesaplanmıştır. Bu yöntem için hazırlanan solüsyonlar aşağıda belirtilmiştir.

Solüsyon A: % 2'lik Na₂CO₃ 0,1 M NaOH'da çözüldü.

Solüsyon B: %1 NaK

Solüsyon C: % 0,5'lik Cu₂SO₄

Solüsyon D: 48 mL solüsyon A, 1 mL solüsyon B, 1 mL solüsyon C alınarak hazırlandı.

Solüsyon E: Folin - fenol ve saf sudan bire bir oranında alınarak hazırlandı.

BSA: 5 mg BSA, 5 mL saf suda çözülerek taze olarak hazırlandı.

Protein tayinininde kullanılacak olan Standard grafiğin hazırlanması için, 1 mg / mL protein içeren standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 µL alındı ve miktar her tüpte 100 µL olacak şekilde üzerleri saf su ile tamamlandı. Kör olarak kullanılmak üzere bir tüpe 100 µL saf su koyuldu. Daha sonra her tüpe 2 mL solüsyon D eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 10

dakika sonunda tüplere 0,2 mL solüsyon E eklenip vorteks ile zaman kaybetmeden karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Örnekler 96'lık plakanın kuyucuklarına 200'er µL koyularak (OD₆₀₀) absorbansları köre karşı okundu. Okunan absorbans değerlerine karşılık gelen µg protein değerleri ile standart grafik hazırlandı.

Saflaştırma basamaklarında protein miktarı belirlenecek numunelerden 0,1'er mL tüplere alındı ve standart grafik için uygulanan yöntem aynı şekilde numune tüpleri için de uygulandı. Daha sonra numuneler içindeki protein miktarı standart grafikten elde edilen doğru denklemi kullanılarak hesaplandı.

2.2.6.2 SDS PAGE Jelinde Örneklerin Yürütülmesi

SDS-PAGE jelinin hazırlanmasında kullanılan solusyonları için Laemmli tarafından geliştirilen metod uygulanmış ve kullanılan çözeltiler aşağıda belirtilmiştir [192].

SDS PAGE jelinin %10'luk alt jeli (ayırma) için; son konsantrasyonu %10 olacak şekilde 3.3 mL, %15'lik alt jeli için ise 5 mL %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımı, son konsantrasyonu 357 mM olacak şekilde 1.5 M Tris (pH 8.8), son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %10 SDS ve %10 Amonyum per sülfat (APS), son konsantrasyonu %0.4 olacak şekilde %99 TEMED 20 mL toplam hacimde saf su ile tamamlandı

SDS PAGE jelinin %5'lik üst jeli (yığma); son konsantrasyonu %4.875 olacak şekilde 1.65 mL %30 Akrilamid / Bis Akrilamid karışımı, son konsantrasyonu 125 mM olacak şekilde 1,5 M Tris (pH 6.8), son konsantrasyonu %0,1 olacak şekilde %10 SDS ve %10 Amonyum per sülfat, son konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde %99 TEMED 20 mL toplam hacimde saf su ile tamamlandı

SDS-PAGE yürütme tamponu; son konsantrasyonu 50 mM olan 1 M Tris ve son konsantrasyonu %0.1 olan %10'luk SDS ile hazırlandı

SDS-PAGE yürütme tamponun; son konsantrasyonu 50 mM 1 M Tris, son konsantrasyonu %0.1 %10'luk SDS, son konsantrasyonu 2 mM 0.5 M EDTA (pH 8.0), son konsantrasyonu %1 %99 β-merkaptöethanol, son konsantrasyonu %10 %100

Gliserol ve son konsantrasyonu %20'lik %99 Bromfenol mavisi kullanılarak hazırlandı ve + 4 °C' de saklandı.

SDS-PAGE boyama çözeltisi; 0.25 g. Coomassie Brilliant Blue 250, 100 mL %95 Etanol %10 Asetik asit ile karıştırılarak hazırlandı ve +4 °C' de saklandı.

SDS-PAGE arıtma çözeltisinin hazırlanması; son konsantrasyonu %5'lik %99 Asetik asit ve son konsantrasyonu %50 olan %99 etanol karıştırılarak hazırlandı ve + 4 °C' de saklandı.

Jelin hazırlanması için, ayırma jelini oluşturan çözeltiler karıştırıldı. APS en son eklendikten sonra karışım, jel kasetine çizgi hizasına kadar döküldü. İzopropanol ilave ederek Jelin yüzeyini düzgünleşmesi sağlandı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra yüzeydeki izopropanol döküldü ve saf su ile yıkandı. Diğer bir erlende %5'lik yığma jeli hazırlandı. APS en son eklendikten sonra karışım polimerize haldeki ayırma jelinin üzerine döküldü ve jelde kuyular oluşturmak için tarak yerleştirildi. Jel polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra tarak çıkarıldı ve elektroforez tankına yerleştirilerek tank tamponu ile dolduruldu. Örnek numune tamponu, proteinle 1 / 1 oranında karıştırıldı ve 2 dakika 95 °C'de denatüre edildi. Protein örnekleri kuyulara yüklendi. Akım, proteinler %5'lik yığma jelinde ilerlerken 80 voltajda, %12'lik ayırma jeline ulaştıktan sonra 150 voltaja ayarlandı. Yükleme tamponundaki bromfenol mavisi, jelin altına 1 cm kalana kadar işleme devam edildi. Bu işlem bitiminde, düzenek açıldı ve cam plakalar birbirinden ayrıldı. %5'lik yığma jeli uzaklaştırıldı. Ayırma jeli, bir kesikle işaretlendi ve boyama çözeltisi içine alındı. Protein bantları net bir şekilde görünene kadar çalkalayarak boyandı. Daha sonra arıtma çözeltisine alınarak hafifçe karıştırıldı. Böylece boyanın fazlası alınmış oldu. Daha sonra UV ışığı altında protein bantları incelendi.

2.2.6.3 Western Blot Basamağı

Western Blot analizi için 25 mM Tris, 192 mM Glisin, %20 (v / v) Metanol'den oluşan bir transfer tamponu ve 10 mM Tris - HCl, 20 mM NaCl, pH 7.4 içeren 10X TBS hazırlandı. Proteinlerin elektroforetik transferi için Bio-Rad Trans Blot sistemi (BioRad, Almanya) kullanıldı.

Jel büyüklüğünde kesilen kurutma kağıtları ve aparatın içerisindeki süngerler transfer tamponunda iyice ıslatıldı ve bekletildi.

PVDF(0,45µM milipore) membrandan 8.5 x 5.2 ebatlarında kesildi ve %100 metanol içerisinde 1 dk bekleterek membranın aktifleşmesi sağlandı. Daha sonraki işlemler tamamlanmaya kadar transfer tamponunda bekletildi. Jel transfer tamponuna alındı ve bekletildi. Tüm malzemeleri transfer tamponu ile ıslatılmış sandviç sistemi (sünger-kağıt-jel-membran-kağıt-sünger) hazırlandı ve hava kabarcığının oluşmaması için hafifçe bastırarak üzeri düzleştirildi. Bloklar tanka yerleştirildi ve tank transfer tamponu ile doldurularak + 4 °C buzdolabında bir gece 15 V akımla transfer olması sağlandı.

2.2.6.4 Antikorun Hazırlanması ve Proteinlerin Belirlenmesi

RGS·His HRP Conjugate Kit (Qiagen, Almanya) kullanılarak antikor membran ile muamele edilmeye hazır hale getirildi. 8 mL 1X reagent ve 8 µL antikor (6 His tag) (1 / 1000) hazırlandı. Proteinlerin transfer olduğu PVDF membranlar ilk olarak 20 mL bloklama çözeltisinde (0.1 g bloke edici tampon, %0.1 (v / v) Tween20 içeren 1X TBS) 1 saat horizontal çalkalayıcıda oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda bloklama çözeltisi uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 3 kez membran yıkandı, bunun için %0,1 (v / v) Tween20 içeren 1X TBS kullanıldı.

Membran primer antikor ile 1 – 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve görüntülemeye geçildi. Membranlar 1 - 2 dakika arasında ECL sistemi Pierce ECL (Western Blotting Substrate-Thermo, A. B. D.) substratla muamele edildi. Reagent A ve Reagent B çözeltilerinden ayrı ayrı 1.5 mL alınarak membran üzerine uygulandı. Ardından karanlık odaya geçilerek membran filme aktarıldı. Membran film üzerinde 5 ve 10 dakika olmak üzere 2 kez bastırıldı. Film tab edilerek sonuçlar görünür hale getirildi.

2.2.6.5 Protein Saflaştırma Basamağı

SDS-PAGE jeline yüklenen ve görüntülenen proteinin saflaştırılması için ekspresyon vektörü tarafından proteine ilave edilen N terminal His-tag sayesinde, Ni-NTA (Qiagen 30210 Hilden, Germany) kolon saflaştırma protokolü ile affiniteye dayalı saflaştırma yapıldı. Saflaştırma basamakları için hazırlanan tamponlar:

Liziz tamponu: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM imidazol

Yıkama tamponu: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol

Elüsyon tamponu: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol

2.2.6.5.1 Liziz Basamağı

n kültürden inoküle edilen ve bir gece büyümede bekletilen 200 mL'lik örnek daha önce anlatılan yıkama tamponu ile yıkandı. En son basamakta çöktürülen örnek miktarı tartıldı ve 1 g için 2 – 5 mL olacak Şekilde yaklaşık olarak 3 mL liziz tamponu eklendi. 1mg / mL lizozim eklenerek 30 dakika buzda bekletildi. 200 – 300 W'de 10 saniye sonikatör de bekletildi. Lizatin vizkozluğu devam ediyorsa *RN*_{az} A (10µg / mL) ve *DN*_{az} I (5µg / mL) eklenerek 10 – 15 dakika buzda bekletildi. 10 000 x g'de 20 – 30 dakika + 4°C'de santrifüj edildi. Supernatantı (ham ekstrakt) alındı ve + 4°C'de saklandı.

2.2.6.5.2 Saflaştırma Basamağı

%50 Ni-NTA agarozundan 1 mL ve 4 mL lizattan alınarak 200 rpm'de + 4 °C'de 60 dakika 250-300 rpm' de çalkalandı. Numune, Ni-NTA kolonuna yüklendi. Altta kalan çözelti etiketlenerek toplandı. 4 mL yıkama tamponu eklendi (bu işlem 2 kez yapıldı) ve kolondan geçirilen örnekler saflaştırma basamaklarının kontrolü amacıyla toplandı. 0.5 mL elüsyon tampon eklenerek saflaştırılan protein solüsyonu ependorf tüpünde toplandı. Aynı işlem 4 kez tekrarlandı.

Elde edilen tüm örnekler yüklenerek, SDS jel elektroforezi ile saflaştırılan proteinin geldiği fraksiyon belirlendi.

2.2.6.6 Zeytin β -Glukozidaz Proteini İçin Yapılan Karakterizasyon Deneyleri

2.2.6.6.1 Zeytin β -Glukozidaz Proteininin Aktivite Tayini

Zeytin β -Glukozidaz enziminin aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edildi. Aktivite ölçümü için 70 μ L, 5 mM pNPG substrat çözeltisi ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi 96'lık plakaya (well-plate) koyuldu. Kör olarak 70 μ L 50 mM pH 5.5 Na-Ac tamponu ve üzerine 70 μ L enzim çözeltisi koyuldu. Etüvde 37 °C'de, 30 dk inkübe edildi. 30 dk'nın sonunda reaksiyon 70 μ L 0,5 M Na₂CO₃ ile durduruldu. Spektrofotometrede 410 nm'de köre karşılık absorbans değeri okundu. *o*-NPG ve *o*-NPGal substratlarının reaksiyon sonunda ortaya çıkan ürünleri orto-nitrofenol olduğu için bu substratlara karşı enzim aktiviteleri 420 nm'de okundu.

Enzim aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve 1 Enzim Ünitesi dakikada oluşan p-nitrofenolün μ mol'ü olarak belirlendi [193].

Absorban (A), zamana bağlı değişim (dA/dt), molar ekstinksiyon katsayısı (E) olarak nitelendirildi.

$E=A/C \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ ile formülize edilir.

A= absorbans, C= maddenin derişimini ifade eder ($\text{cm}^2 \text{ mol}^{-1}$)

Enzim ünitesi (EU) = $(V_f(\text{ml}) \times (\text{seyreltme faktörü}) / (E) (\text{cm}^2/\text{mol}^{-1}) \times (V_s) \times d)$

V_f = Toplam hacim (ml)

V_s = Eklenen enzim hacmi (ml)

d= Işık yolu

dA/dt = Dakikada gözlenen absorbans farkı

para-nitrofenol için 405 nm'deki ϵ değeri $552.8 M^{-1} cm^{-1}$ olarak kullanılırken [zeytin VOO], *orto*-nitrofenolün 420 nm'deki ϵ değeri $4.55 mM^{-1} cm^{-1}$ olarak kullanılmıştır [193].

2.2.6.6.2 4-MUG (4-Methylumbelliferyl-b-D-glucuronide) Substratı ile Aktivite Tayini

Laemmli (1970)'e göre yapılan Native-poliakrilamid jel elektroforezin(N-PAGE)'de %5'lük yığma jeli ve %8'lik ayırma jeli kullanılmıştır [192]. Nativ-PAGE jeli için hazırlanan jelde, yürütme tamponunun ve yükleme boyasının hazırlanmasında SDS kullanılmamış, yerine dH_2O ilave edilerek SDS bileşenleri aynen kullanılmıştır. Örnekler yüklemeye önce denatüre edilmemiştir. Jel hazırlanırken ayırma jeline %0,1 4-MUG (4-metilumbelliferil α -D-glukopiranozit) ilave edilmiş, yığma jeline ilave edilmemiştir. Örnekler yüklendikten sonra sırası ile 25 ve 30 mA'de, $+4^{\circ}C$ 'de elektroforez işlemi yapılmıştır.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel, 2 kere $37^{\circ}C$ ' de 10' ar dakika pH: 5.5 NaAc tamponunda yıkandıktan sonra, %1' lik 4-MUG içeren 15 mL pH: 5.5 NaAc tamponunda $37^{\circ}C$ ' de 15 dakika inkube edilmiş ve UV ışığı altında aktivite sonucu oluşan bantlar şekil 3.37' de belirtildiği şekilde gözlenmiştir.

2.2.6.6.3 Amonyum Sülfat Çöktürme Aralığının Belirlenmesi

Elde edilen protein solusyonuna basamaklı amonyum sülfat çöktürmesi uygulanır. Çöktürme işlemleri sırasında kullanılacak katı amonyum sülfat miktarları şu formülle tespit edildi.

$$g (NH_4)_2SO_4 = g(NH_4)_2SO_4 = 1,77 \times V(S_2-S_1) / 3,54-S_2$$

V=Süpernatantın hacmi

S1=1'in kesri olarak mevcut amonyum sülfat doygunluğu

S₂=1'in kesri olarak istenilen amonyum sülfat doygunluğu

Karışım 50000xg'de 30 dakika santrifüj edilir. Çökelek uzaklaştırılır. Elde edilen süpernatanta, süpernatantın miktarı dikkate alınarak amonyum sülfat eklenir. Daha önce bu enzimin amonyum sülfat çökme aralığı bilinmediğinden; % (0-10), (10-20), (20-30), (30-40), (40-50), (50-60), (60-70), (70-80), (80-90), (90-100) aralıkları uygulanarak pNPGlu substratına karşı gösterdiği aktivite ölçümü ile belirlenen aralık tablo 3.9' da belirtilmiştir.

Tablo 2.1: Amonyum sülfat çöktürme aralığının belirlenmesi için yapılan aktivite tayininde kullanılan tamponlar

| Kör | Numune |
|----------------------------------|---|
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 0-10 aralığındaki numune | 70 µL 0-10 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 10-20 aralığındaki numune | 70 µL 10-20 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 20-30 aralığındaki numune | 70 µL 20-30 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 30-40 aralığındaki numune | 70 µL 30-40 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 40-50 aralığındaki numune | 70 µL 40-50 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 50-60 aralığındaki numune | 70 µL 50-60 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 60-70 aralığındaki numune | 70 µL 60-70 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 70-80 aralığındaki numune | 70 µL 70-80 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 80-90 aralığındaki numune | 70 µL 80-90 aralığındaki numune |
| 70 µL Aktivite tamponu | 70 µL Aktivite tamponunda çözülmüş substrat |
| 70 µL 90-100 aralığındaki numune | 70 µL 90-100 aralığındaki numune |

2.2.6.6.4 İnhibitörlerin IC₅₀ Değerlerinin ve Aktivatörlerinin Belirlenmesi

Enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılan ağır metal maddelerin IC₅₀ değerlerini bulmak için, p-NPG substratı kullanılarak çalışıldı. İnhibitör eklenmemiş ortamda enzim aktivitesi bulunarak bu değer %100 aktivite olarak alındı. Farklı inhibitör konsantrasyonlarında enzim aktivite değerleri bulundu ve % aktivite değerleri hesaplandı. %Aktivite-[I] grafikleri çizildi. (Şekil 3.41). Bu grafiklerden yararlanarak enzim aktivitesini %50 oranında azaltan inhibitör konsantrasyonu olan IC₅₀ değerleri ve aktivatör maddelerin hangileri oldukları belirlendi.

2.2.6.6.5 Km ve V_{max} Değerlerinin Belirlenmesi

Tablo 3.10' da belirtilen konsantrasyonlarda enzim ve substrat çözeltileri konsantrasyonlarından ve şekil 3.45' te belirtilen grafikten yola çıkılarak Km ve Vmax değerleri hesaplandı.

2.2.6.7 Zeytin Metallothionein Proteini (OeMT2) İçin Yapılan Metal Tolerans Deneyleri

2.2.6.7.1 Rekombinant Bakterilerin Sıvı Kültürde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

OeMT2 geninin klonlandığı PLATE 51 vektörü ve kontrol olarak ta kontrol plazmidinin transforme edildiği *E. coli* BL21 DE3 hücrelerinden 10 mL LB broth besiyerine tek koloni ekimi yaparak ön kültür hazırlandı. Ön kültür, 100 mL LB broth besiyerine inoküle edilerek bakteri kültürü OD₆₀₀ 0.6 – 0.8 aralığına ulaştığında ekspresyonun indüklenebilmesi için 1 mM IPTG eklendi. Aynı anda ortama 0.2 mM, 0,4 mM veya hiç CdCl₂ ilave edildi ve 30 °C'de 250 rpm' de çalkalandı. Daha sonra ortama saat başı alınan örneklerin OD₆₀₀ değerleri analiz edildi ve rekombinant proteinin bakteri büyüme eğrisi üzerindeki etkisi incelendi.

2.2.6.7.2 Rekombinant Bakterilerin Katı Kültürde Metal Toleranslarının Belirlenmesi

OeMT2 geninin klonlandığı PLATE 51 vektörü ve kontrol olarak ta kontrol plazmidinin transforme edildiği *E. coli* BL21 DE3 hücrelerinden 10 mL LB broth besiyerine tek koloni ekimi yaparak ön kültür hazırlandı. Ön kültür, 100 mL LB broth besiyerine inoküle edilerek bakteri kültürü OD₆₀₀ 0.6 – 0.8 aralığına ulaştığında ekspresyonun indüklenebilmesi için 1 mM IPTG eklendi. IPTG ile indüklendikten 4 saat sonra her iki kültürden de numune alınıp OD₆₀₀ değerini 0.2 olana kadar Lb broth ile seyreltildi ve bu kültürden 1,10⁻¹, 10⁻² ve 10⁻³ olacak şekilde seri dilüsyonlar yapıldı. Her bir dilüsyondan 5 µL, metal içermeyen, 0.5 mM CdCl₂, 1 mM CuSO₄ içeren LB agar petrilere damlatılarak kuruması beklendi ve 37 °C’ de 12 saat sonra fotoğrafı çekildi [139].

2.2.6.7.3 Rekombinant Bakterilerin Metal İçeriklerinin ICP-OES (inductive coupled plasma-optical emission spectroscopy) Kullanılarak Belirlenmesi

OeMT2 proteininin, kontrol plazmidinin (his tag içeren) transforme edildiği recombinant bakterilere nazaran ne kadar metal bağlayabildiğinin belirlenmesi için, protein ekspresyonu IPTG ile indüklendi ve 30 °C’de 250 rpm’ de çalkalandı. IPTG 25 indüksiyonundan 4 saat sonra, her örnek için 1 mM FeSO₄, CuSO₄, ZnCl₂ veya CdCl₂ ilave edildi ve 25 °C’de 250 rpm’ de 1 gece ekspresyonun devam etmesi sağlandı. Kültürler, + 4 °C’de, 4000 rpm’ de 20 dakika santrifüj edildi. Pelletler üç kere pH: 8,0 olan Tris-HCl çözeltisi ile yıkandı ve 80 °C’ de 2 gün kurutuldu. Pelletlerin kuru ve yağ ağırlıkları tartıldı. Kuru hücre materyalleri %70 HNO₂ ile çözünerek berrak hale getirildi ve ICP-OES (Optima-2000 DV, Perkin Elmer, USA). kullanılarak metal içerikleri belirlendi.

3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında “Ayvalık” çeşidine ait 2 farklı gen karakterize edilmiştir. Buna göre; her gene ait bulgular gruplandırılarak anlatılmıştır.

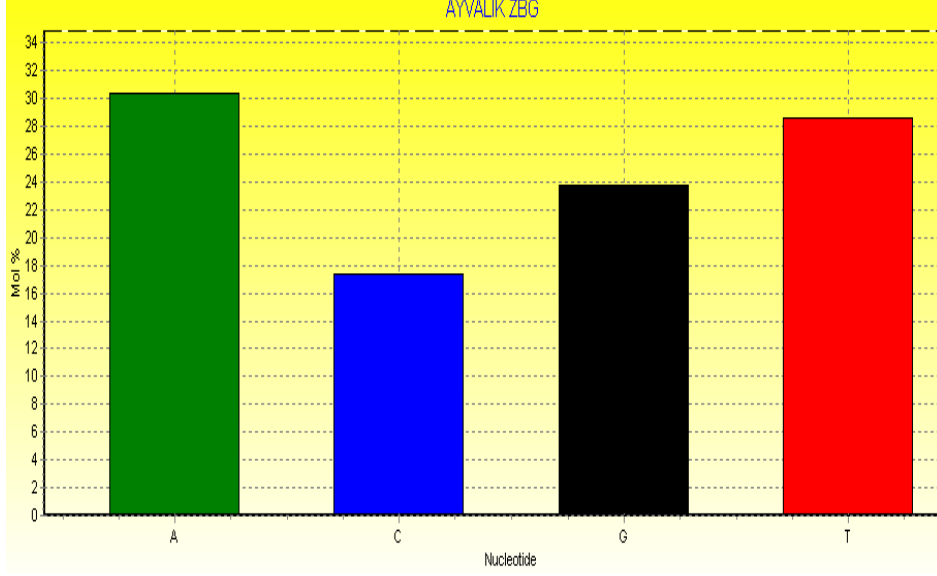
3.1 Zeytin Beta-Glukozidaz Genine Ait Bulgular

3.1.1 Moleküler Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

3.1.1.1 Zeytin BetaGlukozidaz Geninin Biyoinformatik Analizi

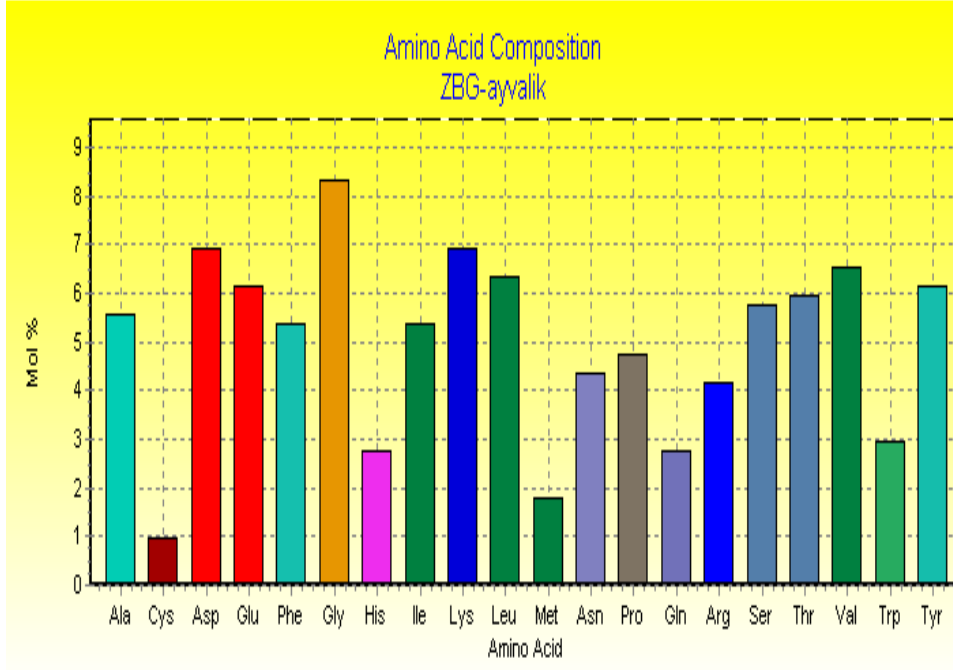
NCBI databank kayıt numarası AY083162.1 olan ve “Koroneiki” çeşidi için tanımlanmış beta glukozidaz geninin nükleotid dizisi gen bankasından referans olarak alınarak yapılacak olan çalışmalarda bu referansa göre dizayn edilen primerler kullanılmıştır. Tablo 3. 2’ de kullanılan primerler listelenmiştir.

DNA dizilemesi BigDye Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile ABI 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) cihazını kullanan ReFGeN (Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji, Ankara) adlı ticari kuruluşa yaptırıldı. Dijital olarak elde edilen DNA dizileri BioEdit [194] programıyla kromatogram kalitesi ve ortak dizi (contig) yönlerinden kontrol edildikten sonra NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [195] homoloji analizine tabi tutuldu. Web Promoter Scan [196] gibi biyoinformatik araçlarla tail PZR sonucu elde edilen promotör bölgesine ait diziler analiz edildi. Hydropathy grafikleri Kyte ve Doolittle algoritmasına [197] göre oluşturulurken, translasyon sonrası özelliklerini anlamak için ExPASy [198], lokalizasyon tahmini için Predator programı [199] sinyal peptid özelliğini belirlemek için TARGET-P programı [200] proteininin yüzey özelliklerinin ve lokalizasyonunu belirlemek için SOSUI programı [201] kullanıldı.



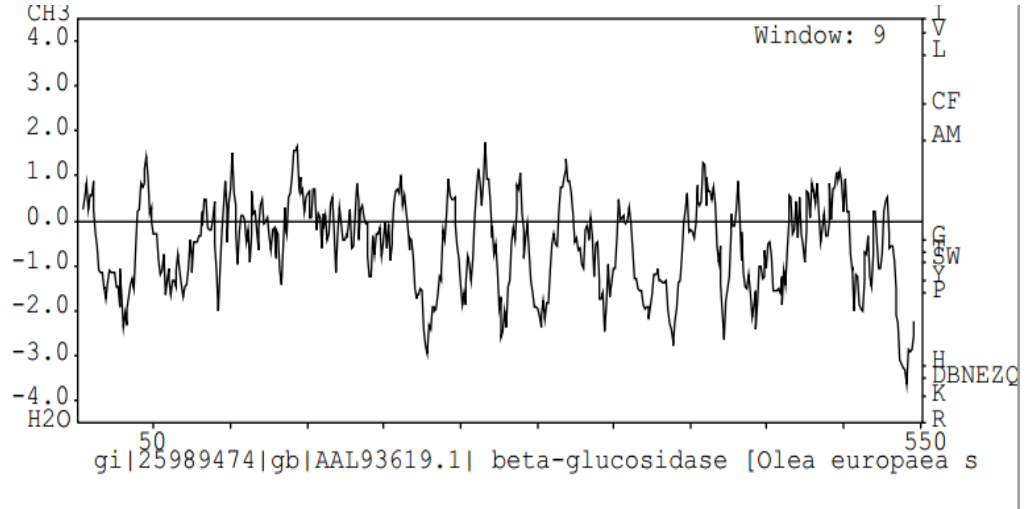
Şekil 3.1: BioEdit [194] programıyla elde edilen *OebGlu* geninin nükleotid kompozisyonu

Şekil 3.1' de belirtildiği gibi, BioEdit [194] programıyla elde edilen *OebGlu* geni nükleotid kompozisyonunda, adenin (A) ve timin (T) oranının, guanin (G) ve sitozin (C) oranından daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.2: BioEdit [194] programıyla elde edilen *OebGlu* proteininin aminoasit kompozisyonu

Şekil 3.2’ de BioEdit [194] programıyla “Ayvalık” çeşidinden elde edilen OebGlu proteinine ait aminoasit kompozisyonu belirtilmiştir. Buna göre ZBG proteinini, genel olarak polar aminoasitler açısından fakir (sistein, histidin, arjinin), apolar aminoasitler açısından (glisin, valin, triptofan) zengindir.



Şekil 3.3: OebGlu proteinine ait Expasy biyoinformatik araçlarının kullanılması ile oluşturulmuş Kyte – Doolittle hidrofobosity analizi [202]

Şekil 3.3’ te belirtilen Kyte – Doolittle hidrofobosity analizi, OebGlu proteinindeki hidrofobik ve hidrofilik bölgeleri belirtmektedir.

```

Compute pI/Mw
Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:
  10      20      30      40      50      60
MDIQSNVLT I TSGSTPTDTS SNGQAAKSTK ERIKRSDFPS DVFVGAATAS YQVEGAWNEG
  70      80      90     100     110     120
GKGMSNWDYF TQSQPGGISD FSNGTIAIDH YNMFKDDVVV MKKLGLKAYR FLSLSWPRILP
 130     140     150     160     170     180
GGRLCHGVSK EGVQFYNDLI DALLAADIEP YITIFHWDIP QCLQLEYGGF LHERVVKDFI
 190     200     210     220     230     240
EYSEICWFEF GDRVKYWITL NEPWSFTVQG YVAGAFPPNR GVTPKDTEET QKHARLHRGG
 250     260     270     280     290     300
GKLLAAFYKYG NPGTEPYKVA HNLILCHAHA VDIYRTKYQE SQGGKIGITN CISWNEPLTD
 310     320     330     340     350     360
SQEDKDAATR GNDFMLGWFEV EPVVTGEYPE SMIKYVGDR L PKFSEKEEKL VKGSYDFLGI
 370     380     390     400     410     420
NYYTSTYTS DPTKPTTDSY FTDSHKTISH ERNKVPIGAQ AGSDWLYIVP WGIYRVMVDM
 430     440     450     460     470     480
KKRYNDPVIY ITENGVDEVN DSKSTSTEAL KDDIRIH YHQ EHLYYLKLAM DQGVNVKGYF
 490     500     510     520     530     540
IWSLFDNFEW AAGFSVRFV MYVDYANGRY TRLPKRS AVW WRNFLTKPTA VPLKNEPEKS
 550
EDRRKRLRGS T
Theoretical pI/Mw: 6.30 / 62893.72

```

Şekil 3.4: OebGlu proteininin Molekül ağırlığı ve izoelektrik noktasının belirlenmesi [202]

OebGlu proteininin molekül ağırlığı ve izoelektrik noktası, ExPasy biyoinformatik araçlarının kullanılması ile oluşturulmuş ve Şekil 3.4' te belirtilmiştir [202]. Sonuç olarak OebGlu proteininin teorik izoelektrik pH değeri 6.3 ve moleküler ağırlığı ise 62.8 kDa olarak hesaplanmıştır.

Tablo 3.1: OebGlu proteininin özellikleri

| Özelliği | Olasılığı |
|------------------------------------|------------|
| Solubulitesi | 0.580957 |
| Transmembran protein özelliği | 0.9819 |
| Alpha Helikal Transmembran protein | 0.0154744 |
| Beta Tabakalı Transembran protein | 0.00262551 |

Özellikle ekspresyon ve karakterizasyon çalışmalarında oldukça fazla faydalanılan tablo 3.1' de belirtilen bu verilere göre, OebGlu proteini solubul bir protein olup transmembran protein özelliği göstermemektedir.

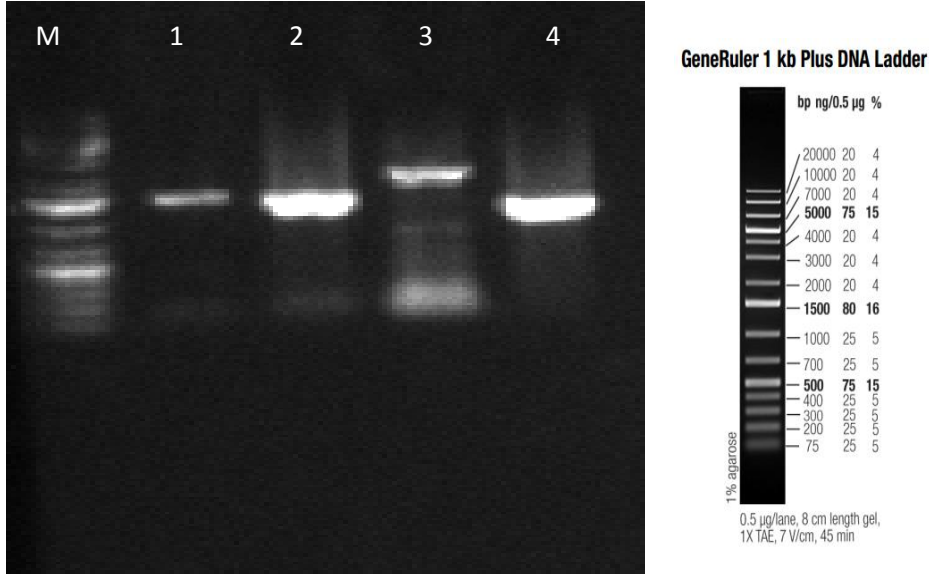


Şekil 3.5: OebGlu proteininin I-Tasser programı ile oluşturulan 3 boyutlu yapısı[203].

Şekil 3.5' te belirtilen 3 boyutlu yapı, I-Tasser programı ile oluşturulmuştur [203]. Bu yapıda pembe ile gösterilenler alfa heliks, sarı ile gösterilenler ise beta tabakaları belirtmektedir

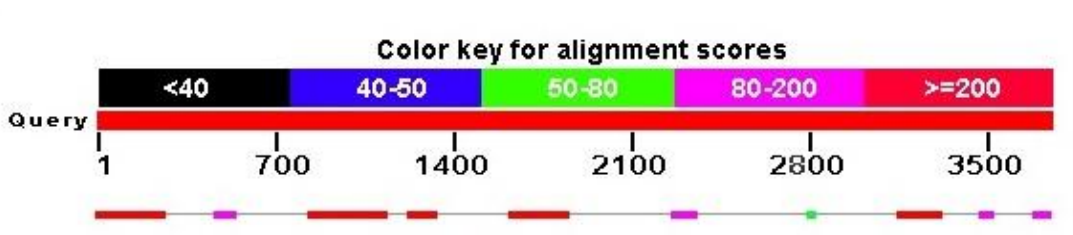
3.1.1.2 *OebGlu* Geninin İtronunun Tespiti

OebGlu geninin intronunun belirlenmesi amacıyla yapılan PZR analizlerinde intronun büyük olasılıkla ihtimaline karşılık olarak farklı bölgeleri çoğaltan 2 çift primer dizayn edilmiştir. Bu primer çiftleri çapraz olarak kullanılarak yapılan PZR ürünleri dizilenmiş, elde edilen dijital verilerden contig oluşturmak suretiyle ham dizi elde edilmiştir. Çalışma için kullanılan primerler tablo 3.2’de belirtilmiştir.



Şekil 3.6: *OebGlu* geninin intronunun belirlenmesi. M: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331(Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: FL1F-FL2R gDNA PZR, 2: FL1F-FL’R cDNA PZR, 3: FL2F-FL1R gDNA PZR, 4: FL2F-FL1R cDNA PZR olarak agaroz jele yüklenmiştir.

Şekil 3.6’da belirtilen intronun tespiti için yapılan PZR çalışmasında, gDNA ve cDNA kalıp olarak kullanılarak intronun tespiti jel üzerinde de gösterilmiştir. cDNA ve gDNA kalıpları arasında bulunan büyüklük farkı intron olduğunu doğrulamaktadır. Elde edilen PZR ürünleri dizilenmesi için REFGEN, Ankara biyoteknoloji şirketine gönderilmiştir.



Şekil 3.7: Blast analizi sonucu intronun yerleşimi

Şekil 3.7’ de NCBI veri bankasından ZBG genine ait cDNA ile, intron analizi için oluşturulan ham diziye ait contig, blast analizine tabi tutularak intronların yerleşimi belirlenmiştir. Şekil 3.8’ de *OebGlu* geninin ekzon ve intronlarının tamamını içeren gene ait tüm uzunluğunun dizisi belirtilmiştir. *OebGlu* geninin 9 adet intron içerdiği gösterilmiştir.

```

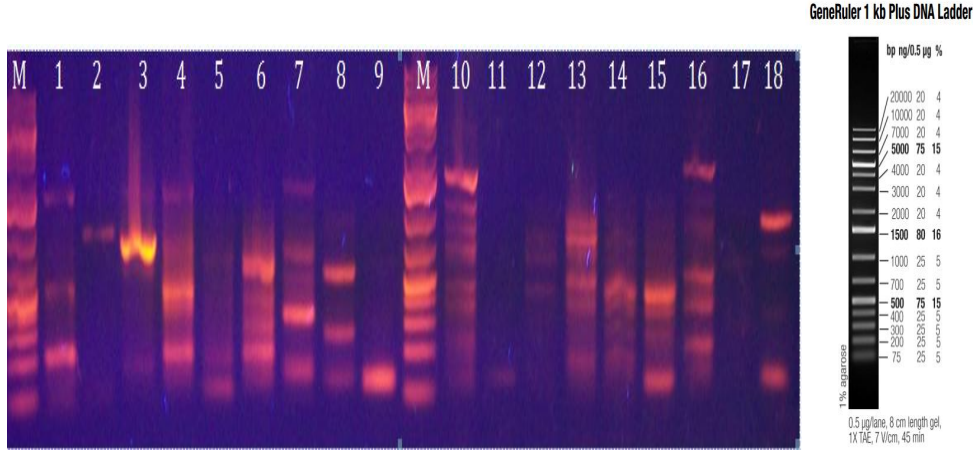
ATGGATATCCAAAGCAACGTCTGACGATTACTAGCGGATCCACACCAACTGACACTTCCCTCCAATGGTCAGGCA
GCCAAATCCACCAAAGAAAGGATCAAACGCTCTGATTTCOCAGTGACTTTGTATTTGGCGCTGCAACTGCTTCA
TATCAAGTTGAAGGTGCATGGACGAAGGAGGTAAAGGCATGAGTAATGGGGATACCTTACACAGAGTCAACCAGGTGGTA
TTTCCGACTTTAGCAATGGCACTATGCAATGATCATAATAATGTTCAAGGACGATGTTGTGTTGTAAGAAATTTGGGT
TTGAAAGCATAACAGATTTCACTTTCAATGGCCTAGAATCTGOCAGGAGGAAAGACTGTGTCAAGGTGTACTAAAGAAGGAT
TCAGTCTATAACGATCTCATTTGATGCACCTTTGGCAGCTTAACTACGCTGAAAGCCTCTCAGAGCTGGT TAGAACATCAG
CATGGTTCTTATATGATGTTTTGTAATAAACTATATGCAATAATCACAATGGAAATTAAGTACAAAATTTGGCTTGTG
TGCTTCTCGGAATCATAATTTCAATATATCATCTCACATCTTTCAATCCCTTTGTGCGACATAGAGCCATATAAACTATC
TTTCACTGGGATATCCOCCAAATGTTTGCAACTAGAGTATGGTGGCTTCTACATGAAAAGAGTTGTAAGTAACCAATCTTTC
ATCCTATAGCACATTAATAAGATATTTATGAACTGAAAAGTGAATCCAAATTTAAAAAATAAAAAATAAATAAATAA
TCATTGCTCCAACATATAAAAAGAGAAAATACAAAATTTTATTTAAAAATAAAAATAAAAATGATTAACAATTTAGTAAAT
GGTGGACAATCTTACAAAAGATAAAGTCCAGCTTAACAAGTCTACCATAATTTGATCTATGAGCCATTTTTGTGTCT
ATAATACAGGCAAGGATTTATGAGTATTCTGAGATTTGCTTCTGGGAATTTGGTGATCGGGTGAATAATGGATTACCTTGA
ATGAGCCATGGTCCCTTACTGTTCAAGGATAGTGGCTGGTGTCTTTCCGCCAAATCGTGGTGTAACTCCGAAAGATACTGAA
GAACTAAAAAGCATAAGCCGCTCTCATAGAGGTGGAGGAAAATCTTAGCTGCCTTCAAGTATGAAATCCCGGCACGGAAACC
ATATAAAGTGGCACACAATTTAATCCCTTTGTCAATGCACATGCTGTTGGACATATACAGGACGAAAATACAGGTTTCCACATATT
AATTTATCCGTAATTTATGCGGATAATACATGTTATATAAATACTTTCGATAATAGTTTCCATAAAGTCAGGGAGGTAAGA
TAGGGATTAACAATGCAATAGTTGGAATGAGCCTCTTACTGACTCTCAAGAAGATAAAGATGCTGCTACTAGAGGAAATGAT
TTTAGGCTTGGATGGGAAACTCCAAATATCTTTGACCATAAATCATCCAAAATTAACCTTCTTTAATCCAATGGTTTGGCCTT
AACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATAAATAAATCCAAAGGGGTGAATCTGTGTTCCACCAGGATCTTCTTCCATAA
AATGTTAAAAAAGAAATAGGGGTGGTAGACACTTTTTTTTTCTTTTGGGGAGTTAAATACTCGATTATCCOCCACAGC
CCCTCAAACAAGCTACGAATAACTTTCTACTTTTTCTTTTGCAATTTTCACTTTTGAAGGTTTGTGGAACCCAGTGGTAA
CTGGAGAGTACCCAGAAAGTATGATTAATAATGTTGGCAGTCCGCTTCTAAAATTTTCAAAAAGAGGAGAAAGCTAGTGA
GGATCCTACGACTTTCTAGGCATAAATACTACACGCTACTTATACAGCGATGATCCAAACAAGCCGACAACTGATAGTTA
CTTTAGTGAATTCGCACACTAAGACTTCACGTACGTATCATAGGTCTATAAAGTGGTACAATCGTAGGTTTATCGAATAAC
AAGTCTAATTAGACGGAGTTAAGCTGAAACATCACTAATTAAGTGGCTTCTTTGCTAGCTTCCCTTTCAGATAGAAGATAGCT
TAGTTGGTAAAGCTACAGGTGATGCAATCCCAATGCTTGTCCGATCTTCCACTTTCAAGATAGAAGATAGCTTCGGATATAT
CTAGGCAGCTTCTGGGTGTAATACTTCCACAGCAAAAATCTGAAATGGTAATCGTGTGATATGATAAGATGACACCTATTT
AAGATCATTCTTATGGCATAAGTTCTCTTCTCTCTTTCTGTTAAAGAAATAATCTGATAAATCGCCTTCGAATCTTCTCTTT
TGACTTGCTAATGCTGGTTCGGATTGGTTATACATAGTTCCATGGGGAACTACAGAGTTATGGTTGATATGAAGAAAAGATC
TAAATGCTCCGTTATATACATTAGAGAGAATGGTGAATTCGATTTAGCCTCTATTGATTTCAATTAATACTTACACATCTA
TGGATATCTAGTTGAAGTGTCTTCTAGCTCTTAGACTTTGGTGACAATCATATATCGTGTAGGAGTGACAGAATGAGACTTA
TGAGATGTGCAAGTTATCCAGGGGCGTACGGTTAGGACTTTGCTTCCGAAAAGATAGGGGAGAGCACCCGGTCAAGCCC
AGCAAAGAGGCAAGGTCGAGAAATACCTACAATTTGAAGCGAAGAGGATCTGTTCCAGGAGGCAAGGTTTCTTCTTTGA
ATCTATTTAGATAGAGAAAATCTAGCTAAAATAGAGTGCCTCCCTCCCAACCCGGAAGAAAAGAAAGCAGAGGCTTTAGG
CGAACCACTGACACAAGAATCTTAAGGGCTTTGCTATGAAACGCAATAAGGTGCTATTTGGTGCACAGAAAATATCCTACC
CGGGCCCTCTAATAATTAATCCCAACCCCTTCCCTTTAGATGAAATTCGTTCCCGTCAACATCCAATTTCTTACAAAAGA
AAGAGGGAAAGAACCTAATGAAAGATCCTTGATTTAAGGCTTAAAAAGCCTTCAAATGAAAGGAAAGGAAAGGCTTTTGGT
AATGGCAAAAATAGGGCTATTAACTACTGAAATAGCGCTTTAGAACTTTTCTTTCAAATGAAACGTCGATAAAGGACC
AATAGCCTATTTTATAAGGAAAGCCCAACCTTTATCTTTAATAACTTTAATAAGTCCAAAGACTAGTACCGAAGCTCTCAAGG
ACGATATAAGGATTCATACACCAAGAACATCTCTACTACCTTAAAGCTAGCGATGGATCAAGGTGTAATGTGAAGGGTTAC
TTCATATGGTCGTTGTTCGACAAATTTGAATGGGCTGCTGGAATCAGTGTTAGATTTGGCGTGTGAAAATCTGCTCTAAAAGG
GGGCTTCTATACCATAAAAAGGAGTGGCCAAAGAAGCCTGAAATACTCTGATCTTTGCTCAAATCTCAAGTGTATTACT
TTACGTATAAAGCCGGGGAAATAAAGGAATACTGCTTTTTTTTATGATATGAGACTATGCTAATGGTGGTTACACAAGGTT
GCCAAAACGTTTCAGCTGTGATAAGGGGCTCAGGCAGCCTCTTTTTCATACGGGCGATCTCACTGAGCCTTAAACCGGATGAT
TGGCCCGGGCTTTCATCACACCCCTGCAACCAAGGGTAATGGTTCCACCTGTCACCCATATTGATTCACCCGTTAGTACCAAT
CATGGTGGAGGAACTTCTCAACCAAGCCTACAGCAGTTCCATGAAAGATGAACTGAAAATCTGAAAGATCGTCGAAAAGGC
TTAGAGGCAGCACCTAGTTTAGCTTATGAAACTAGTGCTTCTTGATTTATGTGAAATAATGC

```

Şekil 3.8: *OebGlu* geninin intron ve ekzonlarının dizisi, koyu olarak işaretlenen bölgeler ekzonları temsil etmektedir.

3.1.1.3 *OebGlu* Geninin Promotör Bölgesinin Belirlenmesi

Tail PZR ürünleri, %0.8' lik agaroz jelde yürütülerek, uygun olan örnekler dizilenmiştir (Şekil 3.9). Tail PZR çalışmasında kullanılan primerler Tablo 3'2 de belirtilmiştir.



Şekil 3.9: *OebGlu* genine ait tail PZR görüntüsü; M: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331(Fermentas, Vilnius, Lithuania) 1- AD1 TAİL 1, 2- AD1 TAİL 2, 3- AD1 TAİL 3, 4- AD2 TAİL 1, 5- AD2 TAİL 2, 6- AD2 TAİL 3, 7- AD2A TAİL 1, 8- AD2A TAİL 2, 9- AD2A TAİL 3, 10- AD3 TAİL 1, 11- AD3 TAİL 2, 12- AD3 TAİL 3, 13- AD5 TAİL 1, 14- AD5 TAİL 2, 15- AD5 TAİL 3, 16- ADMIX TAİL 1, 17- ADMIX TAİL 2, 18- ADMIX TAİL 3 örneklerinden oluşmaktadır.

3 numaralı örnek olan ve AD1 primeri ile yapılan PZR ürünü, dizilenmesi için gönderilmiş ve dizileme sonucu yorumlanmıştır. Dizi sonucu elde edilen 804 bp uzunluğundaki parçanın, 344 bp uzunluğundaki bölümü zeytin beta glukozidaz geni cDNA' sı ile örtüşmektedir. Kalan 440 bp uzunluğundaki parçası ise ilk defa izole edilmiştir ve tahmini promotör bölgesi için biyoinformatik analiz PROMOTER SCAN biyoinformatik aracı kullanılarak belirlenmiştir [196].

Promoter predictions for 1 eukaryotic sequence with score cutoff 0.80 (transcription start shown in larger font):

Promoter predictions for zbg :

| Start | End | Score | Promoter Sequence |
|-------|------|-------|--|
| 265 | 315 | 1.00 | TTTCTTAAAAAAAAAAAAACCCCCCGGGGGTTTTTTTTT A AAAAAAAA |
| 666 | 716 | 0.94 | TAGGAGCCATATATAAGCTATCAGTAACTGGGATTACTTC A CACAGATGT |
| 886 | 936 | 0.93 | CCTAGACATCTATAAAAGGAGAAAAATACAAAATGTGT C ACGGTGTAAAAA |
| 998 | 1048 | 0.80 | CATAGAGCCATATATAACTATCTTTCAGCTGAGACAAGTT C caccatATG |
| 1326 | 1376 | 0.97 | GCACGGAACCATATAAAGTGGCACACAATTTAATCCTTT G tCATGCACA |
| 2099 | 2149 | 0.95 | AAGTATGACTTAAATATGGTGGCGATCGCCTTCCTACAAT T TTCTGAAAA |
| 3401 | 3451 | 0.88 | GATTTAAGGCTTAAAAAGCCTTTCATGGATGGGGAATAA G cctTTTTGG |
| 3573 | 3623 | 0.84 | TAATAACTTTTAATAAGCCCTTTCATAGTTAATCCGTGC C ttctATTTA |
| 3822 | 3872 | 0.99 | TTACTTTACGTATATAAGCCGGGGGAATAAAGGAATACTG C TTTTTTTTT |
| 3913 | 3963 | 0.98 | TAGACTAGTGTATAAGATAAGGGCGTCAGGCGAGCCTTCT T TTTCATACG |

Şekil 3.10: Promotör bölgesinin belirlenmesi [196]

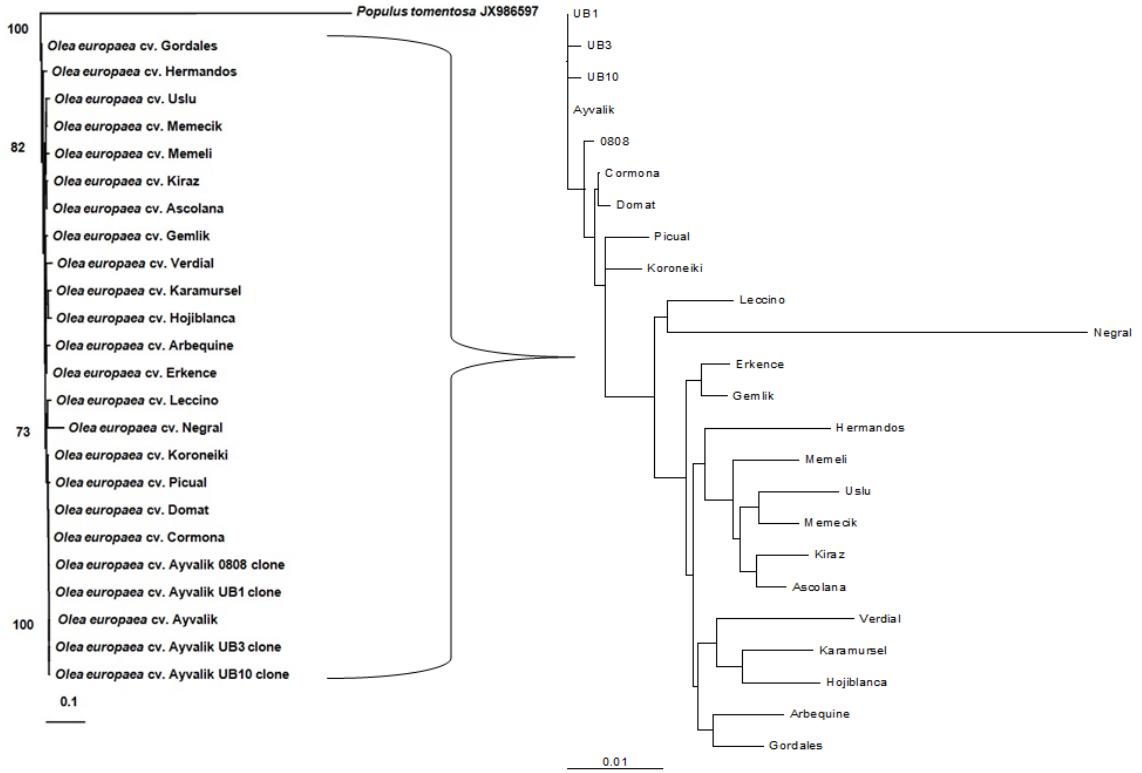
Şekil 3.10' da belirtilen ve online promotör biyoinformatik araçlar kullanılarak yorumlanan sonuçlara göre, tail PZR sonucu elde ettiğimiz bölgede olası bir promotör bölgesi bulunmakta, ve tahmini transkripsiyon başlangıç noktası ATG kodonundan 156 bp daha yukarıda olarak PROMOTER SCAN biyoinformatik aracı kullanılarak belirlenmiş fakat promotörün dizisinin tamamı elde edilememiştir [196].

Tablo 3.2: ZBG moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan primerler

| Primer Adı | Tm | Primer Dizisi | Kullanım Amacı |
|------------|-------|-----------------------------------|---|
| FL1 F | 55 °C | 5' TCAGCATGGTTCTTATATTGATTGT 3' | İntron tespiti |
| FL1 R | 55 °C | 5' ATTGGTACTACGGGTGAATCAAATA 3' | İntron tespiti |
| FL2 F | 55 °C | 5' ACTTCTAGCTGCTTTCAAGTATGGA 3' | İntron tespiti |
| FL2 R | 55 °C | 5' TTACCAACTAAGCACCTTATCGAA 3' | İntron tespiti |
| Pol3 R | 50 °C | 5' GATTCCCTTCATGAGAAGTATGCTA 3' | Polimorfizm |
| RTF | 50 °C | 5' GTAAGTGGAGAGTACCCAGAAAGTATG 3' | Anlık gösterimli PZR ile kopya sayısı ve ekspresyon profili belirleme |
| RTR | 50 °C | 5' GTGTGCGAATCAGTAAAGTAACTATCA 3' | Anlık gösterimli PZR ile kopya sayısı ve ekspresyon profili belirleme |
| zbgTail1 | 50 °C | AAAGTGAAAATCTGTATGCTTTCAAAC | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| zbgTail2 | 50 °C | GACAACATCGTCCTTGAACATATTA | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| zbgTail3 | 50 °C | GTTGACTCTGTGTAAAGTAATCCCAAT | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| AD1 | 50 °C | 5' NTCGASTWTSWGTT 3' | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| AD2 | 50 °C | 5' NGTCGASWGANAWGAA 3' | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| AD2A | 50 °C | 5' STTGNTASTNCTNTG 3' | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| AD3 | 50 °C | 5' WGTGNAGWANCANAGA 3' | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| AD5 | 50 °C | 5' WCAGNTGWTNGTNCTG 3' | Tail PZR ile promotör dizinsin belirlenmesi |
| Pol3F | 50 °C | 5' AAAAAGAGGAGAAGCTAGTGAAAG 3' | Polimorfizm |
| Pol3 R | 50 °C | 5' GATTCCCTTCATGAGAAGTATGCTA 3' | Polimorfizm |
| ProbF | 50 °C | 5' GACATATACAGGACGAAATATCAGGTT 3' | Southern blot |
| ProbR | 50 °C | 5' CATACTTTCTGGGTACTCTCCAGTTAC 3' | Southern blot |

3.1.1.4 *OebGlu* Geninin Farklı Zeytin Çeşitleri Arasındaki Polimorfizmi

Polimorfizm çalışması için yaklaşık 1.5 kb uzunluğunda bir bölge seçilmiş ve farklı çeşitler arasındaki polimorfizm incelenmiştir. Dış grup olarak *Populus tomentosa* beta glukozidaz geni (Gen bankası no: JX986597), databank verilerine göre yapılan BLAST analizi sonucu yakınlığı nedeniyle seçilmiştir. Polimorfizm için yapılan PZR çalışmasında kullanılan primerler tablo 3.2' de belirtilmiştir.



Şekil 3.11: Farklı çeşitlerin *OebGlu* geni nükleotid dizisi açısından nükleotid polimorfizminin belirlenmesi. Bootstrap değerleri % 50 ve daha az olanlar belirtilmemiştir. Bootstrap analizi için 1000 kopya denenmiştir.

Şekil 3.11’ da belirtilen ve Bioedit biyoinformatik araçları kullanılarak hazırlanan NJ ağacına göre, Ayvalık çeşitlerine en uzak Gordales çeşidi görülmektedir. Domat, Picual ve Koroneiki çeşitleri ise *OebGlu* genini açısından Ayvalık çeşidine daha yakın görülmektedir [194].

3.1.1.5 *OebGlu* Geninin Kopya Sayısının Belirlenmesi

OebGlu geninin kopya sayısının belirlenmesi için, radyoaktif prob kullanılarak southern blot çalışması yapılmış, bu deneyden sonuç alınmadığı için anlık gösterimli PZR kullanılarak genomik kopya sayısı belirlenmiştir.

3.1.1.5.1 Southern Blot Sonuçları

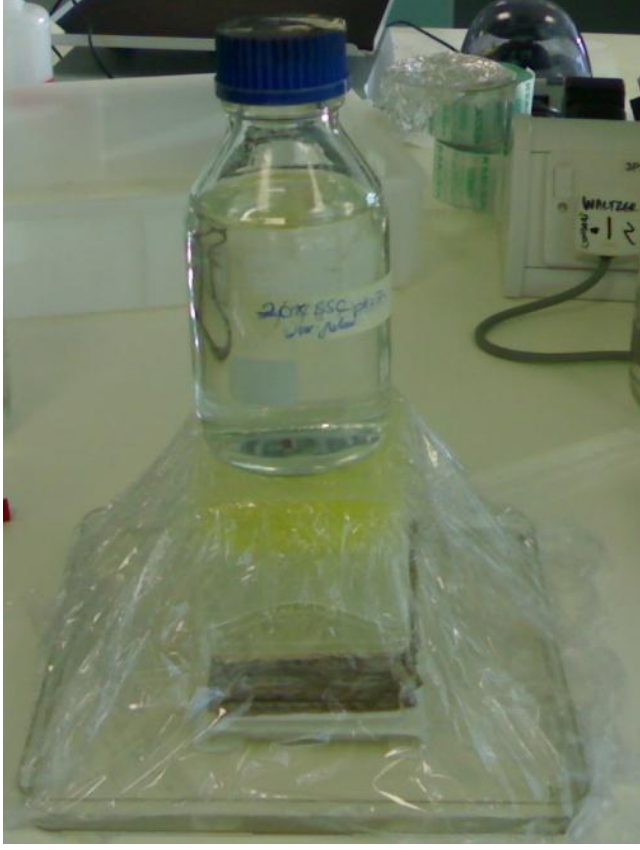
OebGlu geninin genomik kopya sayısının belirlenmesi amacıyla Cardiff Üniversitesi bünyesinde gerçekleştirilen southern blot deneylerinde, *OebGlu* geni 1

yarderden kesen EcoRV ve iki yerden kesen EcoRI restriksiyon enzimleri kullanılarak Şekil 3.12’de belirtildiği gibi genomik DNA’ nın kesilmesi sağlanmıştır.



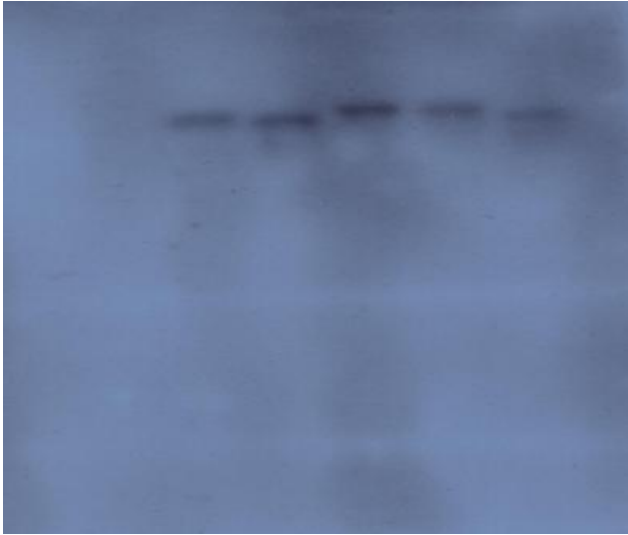
Şekil 3.12: Zeytinden izole edilen genomik DNA' nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

gDNA’ nın başarılı bir biÇimde kesildiği Şekil 3.12’ de görülmektedir. Kesim işlemi tamamlandıktan sonra Őekli 3.13’ te belirtilen transfer düzeneğinde DNA’ nın membrana transfer olması sağlanmıştır.



Şekil 3.13: Southern blot için hazırlanan transfer düzeneği

Tablo 3.2 'de görülen primerler ile PZR kuruldu ve Şekil 3.14'deki jel görüntüsü elde edildi ve P^{32} ile işaretlemesi yapıldı.



Şekil 3.14: Prob3 primerleri ile southern blot probunun görüntüsü

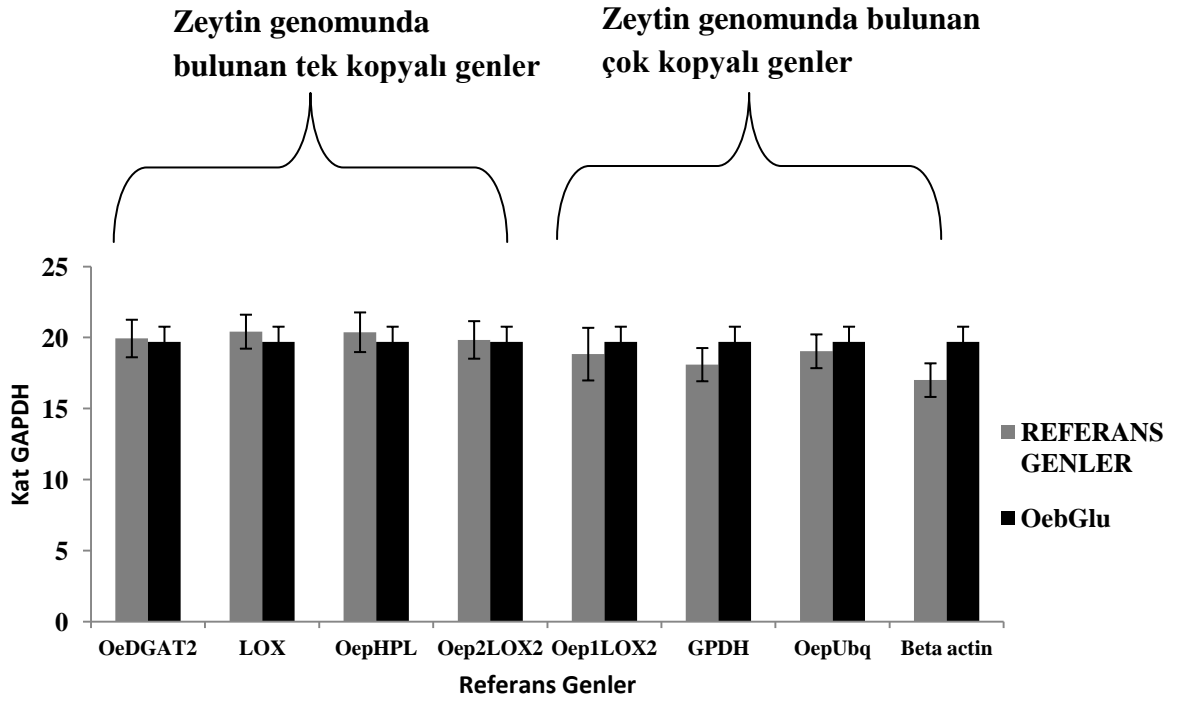
Sonuç olarak radyoaktif işaretli pro bile yapılan southern blot çalışmaları sonucu *OebGlu* geninin kopya sayısı net olarak belirlenememiştir. Bu amaçla anlık gösterimli PZR analizi ile bu sonuç elde edilmeye çalışılacaktır.

Tablo 3.3: Anlık Gösterimli PZR ile Kopya Sayısı Belirleme Analizinde Kullanılan Kontrol Primerleri

| Primer İsmi | F primer | R primer |
|----------------------------|--|--------------------------------------|
| DGAT (GU357635) | 5'CCAAAATAAATT CCCCGTGA-3' | 5'TGAGCCAAATGAGA ACATGAA-3' |
| LOX (EU678670) | 5'TTTTGTCAAGCC ATTCATCG-3' | 5'AACCCGGTTTCTCCA TTTT-3' |
| HPL (EUS13350) | 5'GTGGCTTATTTG TTTCAGAGATATG AT-3' | 5'ACTTTGTGCAAAGA TAAGGCATATAAC-3' |
| Oep2LOX1 (EU513352) | 5'TGAACATAGAG AGGCTTCAGAGTT T-3' | 5'ATATGGTACGTGTG GCATATTCTTT-3' |
| Oep1LOX2 (EU513353) | 5'CGGCTAAAACA ATATACTCAGTGC T-3' | 5'AAAGCAAGACATTC TTTTCAACATC-3' |
| OepUbq (AF429430.1) | 5'AAGACAATTACC CTTGAAGTTGAGA -3' | 5'CAAAGTGATGGTTT TTCCAGTAAGA-3' |
| GPDH (B2BGU9) | 5'ACAGCTCCTGGT AAGGGTGA-3' | 5'GGCTTGCGTCAAGA AGTCTC-3' |
| β -aktin (Q8GTL3) | 5'GAATTGCCAGAT GGACAGGT-3' | 5'GAACCACCACTGAG GACGAT-3' |

3.1.1.5.2 Anlık Gösterimli PZR ile *OebGlu* Geninin Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi

Anlık gösterimli PZR ile genomik kopya sayısının belirlenmesi oldukça yaygındır [204, 205]. Yapılan çalışmalara bakıldığında genel olarak daha önceden kopya sayısı belirlenmiş genler ile çalışılan genin Ct değerlerinin karşılaştırılma prensibine dayanmaktadır [206]. Bu çalışmada kopya sayısı bilinen DGAT (GU357635), LOX (EU678670) HPL (EUS13350), Oep2LOX1 (EU513352), Oep1LOX2 (EU513353), OepUbq (AF429430.1), ubikitin (AF429430.1), GPDH (B2BGU9), β -aktin (Q8GTL3) kullanıldı. Bunlardan tek kopyalı olan genler; LOX [207], DGAT [208], HPL [209], Oep2LOX2 [210] çok kopyalı genler; Oep1LOX2 [210], GPDH [211], ubikitin [212] β -aktin [213]. Elde edilen Ct değerlerine oranlayarak çizilen grafikler Şekil 3.15'te görülmektedir.



Şekil 3.15: *OebGlu* geninin anlık gösterimli PZR ile kopya sayısını belirten grafik

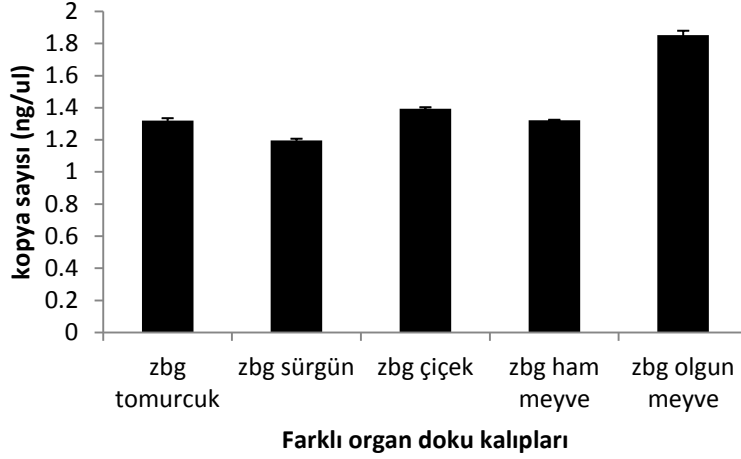
Bu çalışma verilerine göre, *OebGlu* geninin Ct değerinin 1 kopya ile zeytin genomunda temsil edilen genler ile daha yakın olduğu sonucuna varılmıştır ve sonuç olarak *OebGlu* geninin zeytin genomu içerisinde 1 kopya ile temsil edildiği düşünülmektedir.

3.1.2 *OebGlu* Geninin Fizyolojik Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.1.2.1 Anlık Gösterimli PZR İle Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi

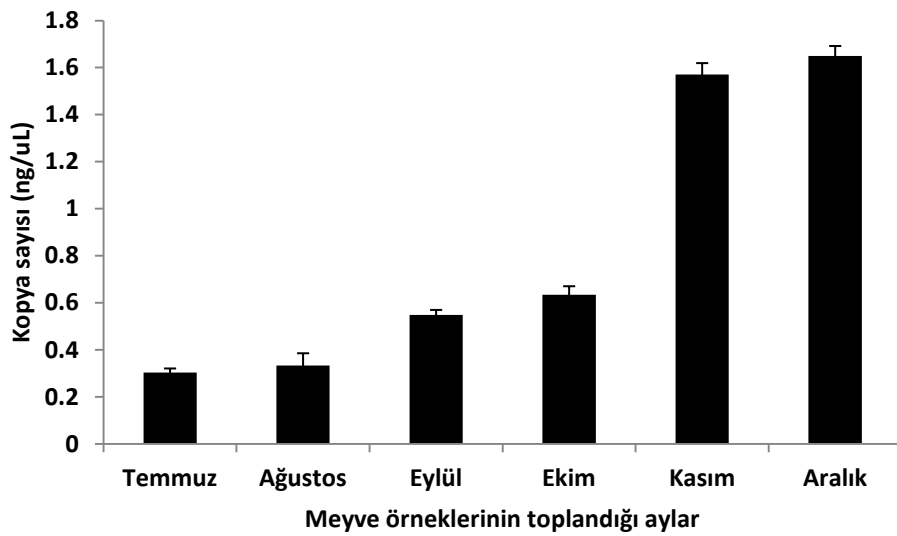
Farklı zeytin dokularından elde edilen cDNA' ların kalıp olarak kullanılmasıyla 3 tekrarlı olarak yapılan ve tablo 3.2' de belirtilen primerler kullanılarak anlık gösterimli PZR ile dokular arası ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar şekil 3.16' te belirlenmiştir.

Farklı dokulardaki ekspresyon analizi



Şekil 3.16: Farklı dokulara ait anlık gösterimli PZR grafiği

Şekil 3.16' te de belirtildiği gibi *OebGlu*, zeytin bitkisinin tüm dokularında ifade edilmektedir. Olgun meyvedeki ekspresyon seviyesi diğer dokulardaki seviyelerden oldukça fazladır. Çiçek oluşumunun meyveye dönmeye başladığı temmuz ayından olgun meyvenin toplanıp işlenmek için en uygun tarih olan aralık ayına kadar meyve oluşumu sırasında *OebGlu* geninin ekspresyon seviyesinin gözlenmesi için belirtilen tarihlerde toplanan meyve örneklerinden elde edilen cDNA' lar kalıp olarak kullanılarak tablo 3.2' de belirtilen primerlerle anlık gösterimli PZR yapılmıştır.



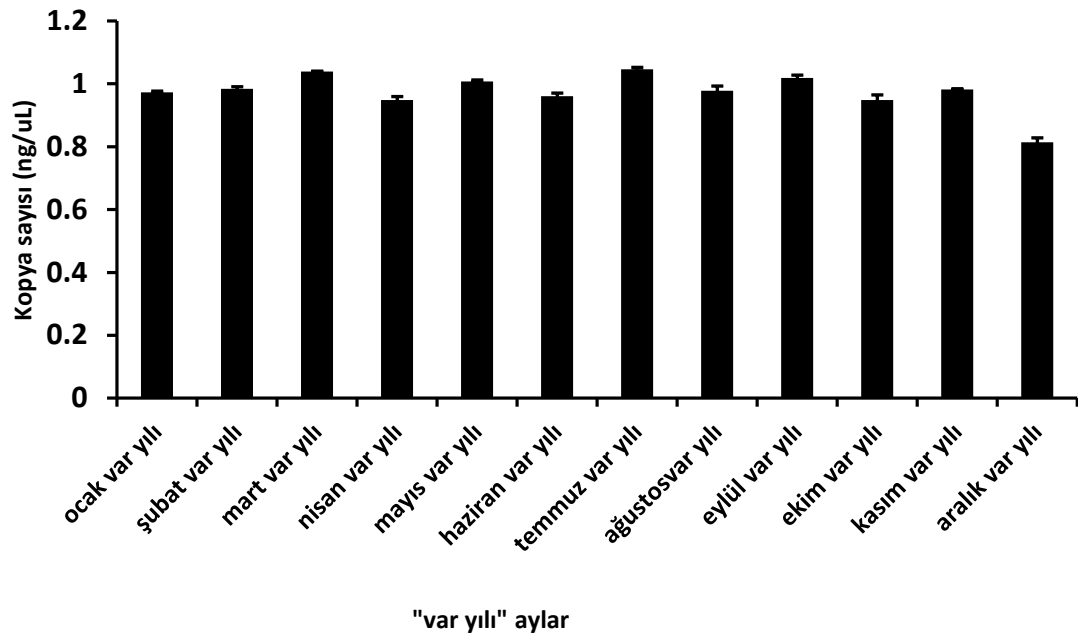
Şekil 3.17: Farklı aylarda toplanan meyve örneklerinde *OebGlu* geninin ekspresyon seviyesinin gözlenmesi

OebGlu geni meyvenin en olgun hali olan kasım ve aralık aylarında ekspresyon seviyesinin diğer aylara oranla daha fazla olduğu şekil 3.17’ de belirtilmiştir.

3.1.2.2 Zamansal Olarak *OebGlu* Geninin Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi

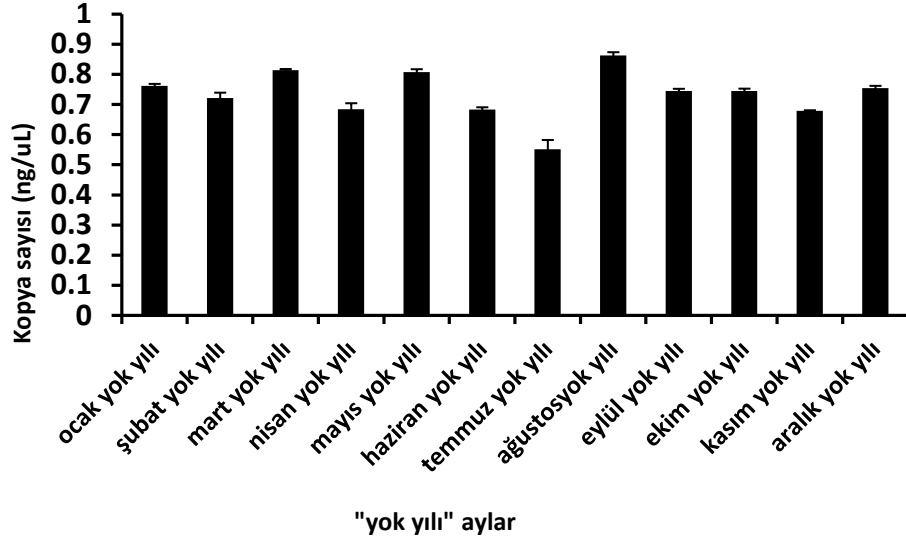
OebGlu geninin zeytin ağacında gözlenen “var” yılı ve “yok” yılı üreme durumu açısından nasıl etkilendiği sorusunun cevaplandırmak amacıyla var yılı ve yok yılı durumlarında ağaçlardan alınan yaprak örneklerinden elde edilen cDNA’ lar kalıp olarak kullanılarak tablo 3.2’ de belirtilen primerlerle anlık gösterimli PZR yapılmış ve ekspresyon profili araştırılmıştır.

OebGlu geninin ekspresyon profili açısından “var” yılına ait yapraklardan alınan örnekler arasında bir farklılık bulunmadığı Şekil 3.18’ de gösterilmiştir.

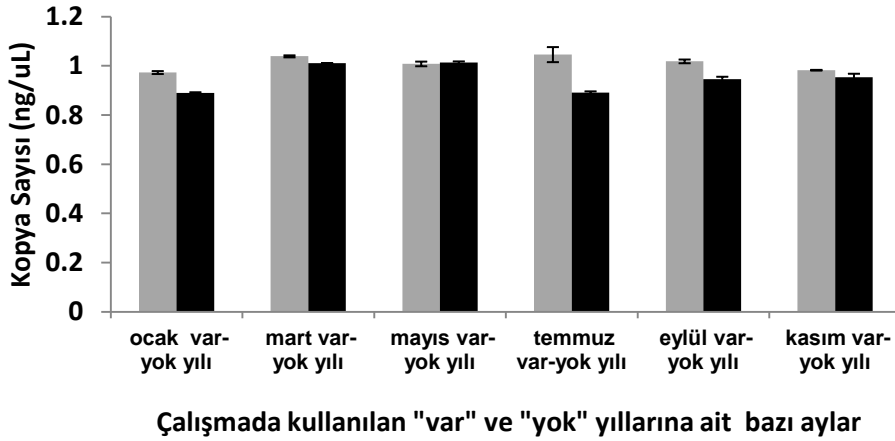


Şekil 3.18: *OebGlu* geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği

OebGlu geninin ekspresyon profili açısından “yok” yılına ait yapraklardan alınan örnekler arasında bir farklılık bulunmadığı Şekil 3.19’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.19: *OebGlu* geninin “yok” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği



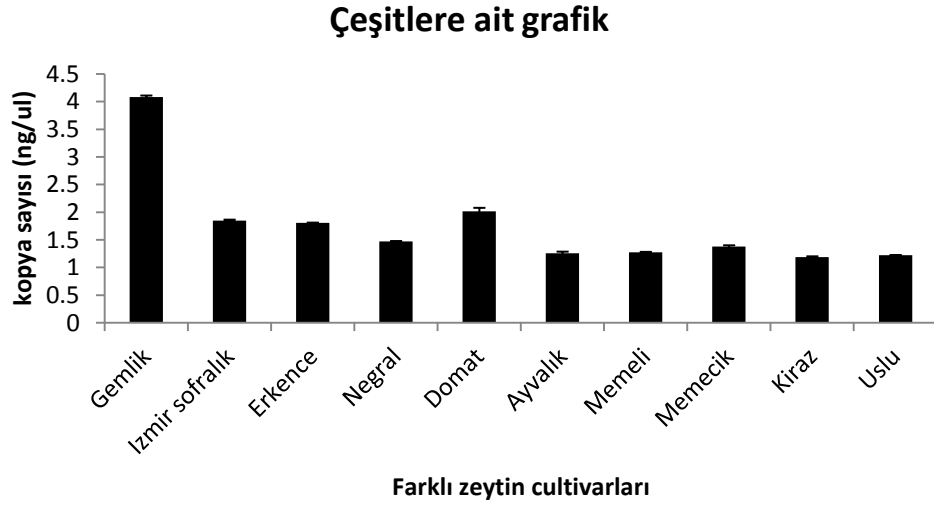
Şekil 3.20: "var" ve "yok" yıllarını beraber gösteren kopya sayısı grafiği

OebGlu geninin “var” ve “yok” yıllarına ait bazı aylarda alınan örneklere ait kopya sayısı grafiği Şekil 3.20’ de belirtilmiştir. Kopya sayısı grafiği, genin periyodisite ile ilişkili olmadığı, fakat “var” yılına ait aylarda daha fazla sentezlendiği belirlenmiştir.

3.1.2.3 Farklı Zeytin çeşitleri Arasında *OebGlu* Geninin Ekspresyon Profiline Belirlenmesi

Farklı zeytin çeşitlerinin *OebGlu* geninin ekspresyon profili açısından değerlendirilmesi amacıyla farklı çeşitlere ait kasım ayında toplanan meyve örneklerinden elde edilen cDNA kalıp olarak kullanılarak tablo 3.2’ de belirtilen

primerlerle anlık gösterimli PZR yapılmış ve ekspresyon profili araştırılmıştır ve şekil 3.21’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.21: *OebGlu* geninin farklı zeytin çeşitleri arasındaki ekspresyon profilinin anlık gösterimli PZR grafiği

OebGlu geninin şekil 3.21’ de belirtilen çeşitler arası ekspresyon profiline göre, *OebGlu* geninin en çok “Gemlik” çeşidinde ifade edildiği belirlenmiştir.

3.1.3 *OebGlu* Geninin Biyokimyasal Karakterizasyonu

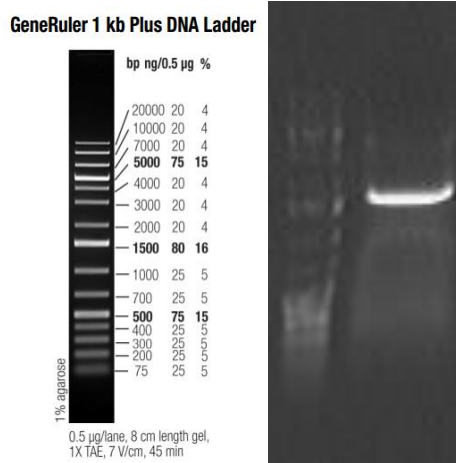
3.1.3.1 *OebGlu* Proteininin *Pichia pastoris*’ te Klonlama Çalışmaları

OebGlu geninin protein ekspresyonunun belirlenmesi için çalışmalar 3 farklı vektör sistemi kullanıldı. İlk olarak *Pichia pastoris* sistemi kullanıldı, ikinci olarak pet21a vektöründe denendi ve en son olarak pLATE51 vektörü kullanılarak sonuç elde edildi. Tüm ekspresyon çalışmalarında Tablo 3.4’te görülen primerler kullanıldı ve materyal metot bölümünde anlatıldığı gibi uygun restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerini içeren primerler ile cDNA kalıbından dehidrin insertü çoğaltıldı. Daha sonra uygun restriksiyon enzimleri ile vektör ve *OebGlu* insertünün kesilip ligasyon yapılarak kompetan hücreye transformasyonu gerçekleştirildi.

Tablo 3.4: OEBGLU geninin klonlama çalışmalarında kullanılan primerler

| PRİMERİN ADI | PRİMERİN DİZİSİ | Amacı |
|---------------------|--|--------------------------------|
| OebGlucla1F: | 5' CA GCC AAA TCG ATC AAA GAA AGG ATC AAA CGC 3' | Pichia pastoris' te ekspresyon |
| OebGlnot1R | 5' C AAG GAA GCG GCC GCT TCA TAA GCT AAA CTA G 3' | Pichia pastoris' te ekspresyon |

Şekil 2.3'de görüldüğü gibi pPICZαC vektörüne klonlamak için *Clal* I ve *Not* I restriksiyon kesim bölgelerini içeren primerler ile Şekil 3.22'de görüldüğü gibi PZR yapıldı ve aracı vektör olan pblueScript Prep SK (+) vektörüne (şekil 2.1) klonlamak için jelden geri kazanılarak miktar tayini yapıldı.



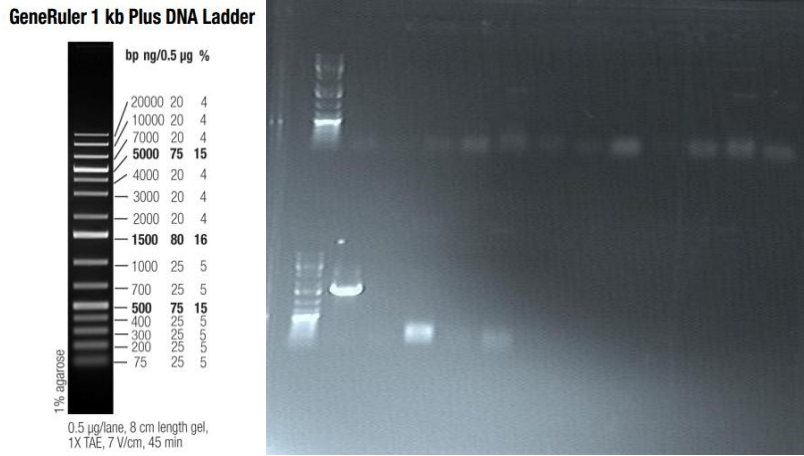
Şekil 3.22: *OebGlu* geninin pPICZαC vektörüne klonlanmak amacıyla amplifikasyonu

Şekil 3.22' de gözlendiği gibi, *OebGlu* geni 1690 bp uzunluğunda bir cDNA' ya sahiptir ve başarılı bir şekilde çoğaltılmıştır. Alt klonlama çalışmaları Stratagene PCR Script Cloning Kit (Kat. No: 211188) kullanılarak pBlueScript SK+ vektörüne yapılmıştır.

3.1.3.1.1 Koloni PZR İle Rekombinant Kolonilerin Belirlenmesi

PZR Script cloning kit (Stratagene Kat. No: #211188) kullanılarak pblueScript Prep SK (+) vektörüne klonlanan *OebGlu* geni, oluşan kolonilerden rekombinant olanların

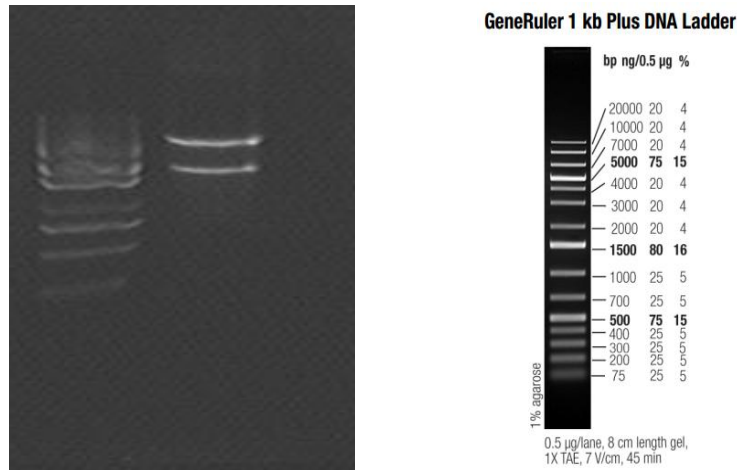
tespiti için tablo 3.4' te belirtilen amplifikasyon primerleri ile taranmıştır.



Şekil 3.23: Koloni taraması sonucu taranan 16 koloniye ait numaralandırılmış PZR görüntüsü, Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

Şekil 3.23' te belirtilen koloni taraması sonucunda, 13 nolu kolonide *OebGlu* geninin konlandığı anlaşılmaktadır.

Rekombinant olduğu düşünülen 13 nolu koloniden plazmid izole edildi ve Cla1 ve Not1 enzimleri ile kesildi.



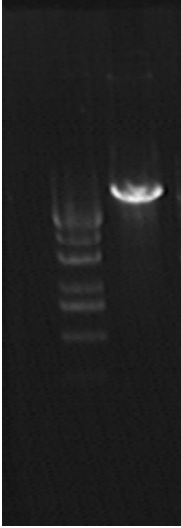
Şekil 3.24: Rekombinant plazmidin Cla1 ve Not 1 restriksiyon enzimleri ile kesim sonucu agaroz jel elektroforezi görüntüsü: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

Şekil 3.24' te restriksiyon enzimleri ile kesildikten sonra 1689 bp uzunluğunda bant görmemiz bize klonlama işleminin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Örnek, pPICZalfaC vektörüne klonlama çalışmaları için GenScript, A.B.D. firmasına gönderilmiştir.

Ticari olarak pPICZalfaC vektörüne klonlanan *OebGlu* geni, *E. coli* Dh10b suşuna transforme edildi ve bölüm 2.2.1.5' te belirtildiği gibi büyük ölçekli plasmid izolasyonu yapıldı.

Miktar tayini sonucu plazmidin ~500-600 ng / μ L olduğu belirlenmiştir. Miktarı belirlendikten *OebGlu* geninin klonlandığı pPICZalfaC plazmidini PmeI enzimi ile lineer hale getirildi ve lineer hale getirilen plazmid etanol ile çöktürülüp temizlenerek transformasyondan önce tekrar miktarı kontrol edilmek amacıyla şekil 3.25' te belirtildiği gibi %0,8' lık agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 3.25: PmeI restriksiyon enzimi ile lineer hale getirilen *OebGlu* +pPICZalfaC vektörü

Miktar tayini sonucu transforme edilecek lineer plazmidin miktarının, ~750 ng / μ L olduğu belirlenmiştir.

3.1.3.1.2 *Pichia pastoris*' te İfade Edilen *OebGlu* Proteinine Ait Bulgular

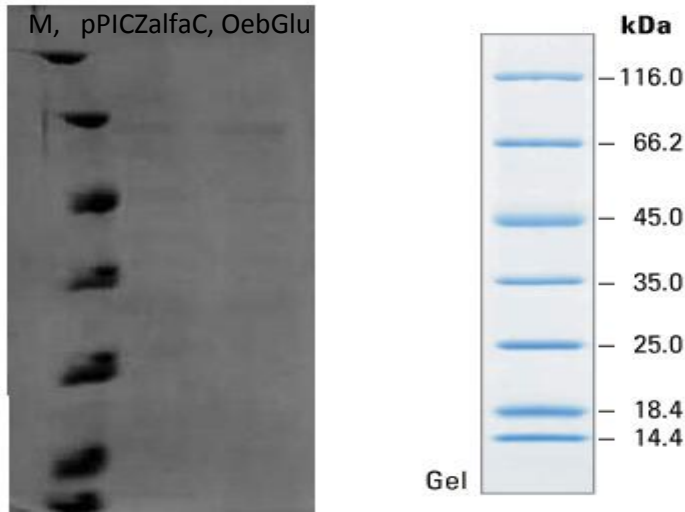
Pichia pastoris'te metanol ile indüklenerek ifade edilen medyuma salınan *OebGlu* proteini, pNPGlu substratına karşı gösterdiği en yüksek aktivitenin hangi kolonide olduğunun ölçümü için oluşan kolonilerden taranan 11 koloni, ve boş

pPICZalfaC vektörünün klonlandığı örnek, kör olarak kullanılan kontrol kolonisine ait protein örnekleri spektrofotometrik olarak aktivite tayinine tabi tutulmuştur. Sonuç olarak tablo 3.5’ te de belirtildiği gibi kör ile rekombinant protein aktivitesi arasında spektrofotometrik bir fark bulunamamıştır.

Tablo 3.5: OebGlu proteininin aktivite ölçümüne ait veriler

| | Örnek Adı | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Kör | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| OD ₄₀₅ Değeri | 0,167 | 0,103 | 0,121 | 0,104 | 0,089 | 0,1 | 0,088 | 0,088 | 0,079 | 0,143 | 0,118 | 0,198 |

Proteinin üretilip fakat aktif bir protein olmaması durumunun kontrolü amacıyla protein numuneleri ile SDS-PAGE elektroforezi yapıldı. OebGlu proteini ile boş vektörü içeren kontrol grubu arasında SDS-PAGE elektroforezinde de bir fark bulunamadığı şekil 3.26’ da belirtilmiştir.



Şekil 3.26: *Pichia pastoris*'te ifade edilen OebGlu proteininin SDS-PAGE görüntüsü, M: Markır Fermentas Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker , (Fermentas, Lithuania)

Sonuç olarak OebGlu proteininin *Pichia pastoris*'te ifade edilemediği kanaatine varıldı.

3.1.3.2 OebGlu proteininin *Escherichia coli*' de ifade edilmesi İle İlgili Bulgular

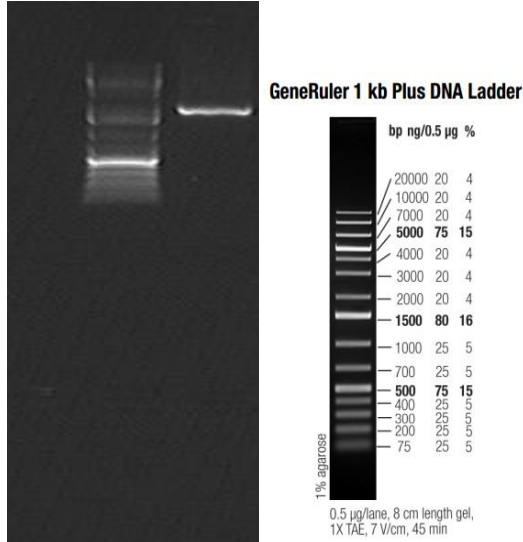
3.1.3.2.1 pET21a Vektörü Kullanılarak Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

PZR™8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit (İnvitrogen,Kat.No: s K2500-20) dahilinde bulunan PZR™8/GW/TOPO® TA vektörüne klonlama yapılabilmesi için OebGlu, tablo 3.6' da belirtilen primerler ile PZR yapıldı.

Tablo 3.6: pET21a vektörüne klonlamaamaçlı kullanılan primerler

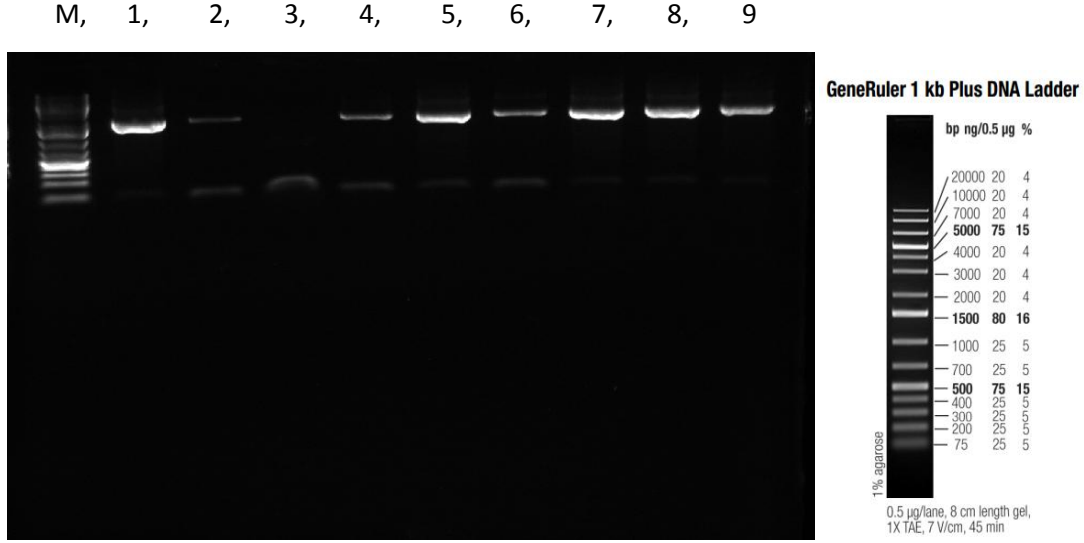
| Primer Adı | Dizisi | Tm |
|-----------------|----------------------------------|-------|
| OEBGLU ECOR1F | GAGCACCGAATTCTGCAATGGATATCCCAAGC | 55 °C |
| OEBGLU HindIIIR | GAAGCACTAGTTTCGAAAGCTAAACTAGGTGC | 55 °C |

Sonuç olarak şekil 3.27' de belirtildiği gibi istenilen uzunluktaki PZR bandı başarıyla çoğaltılmıştır.



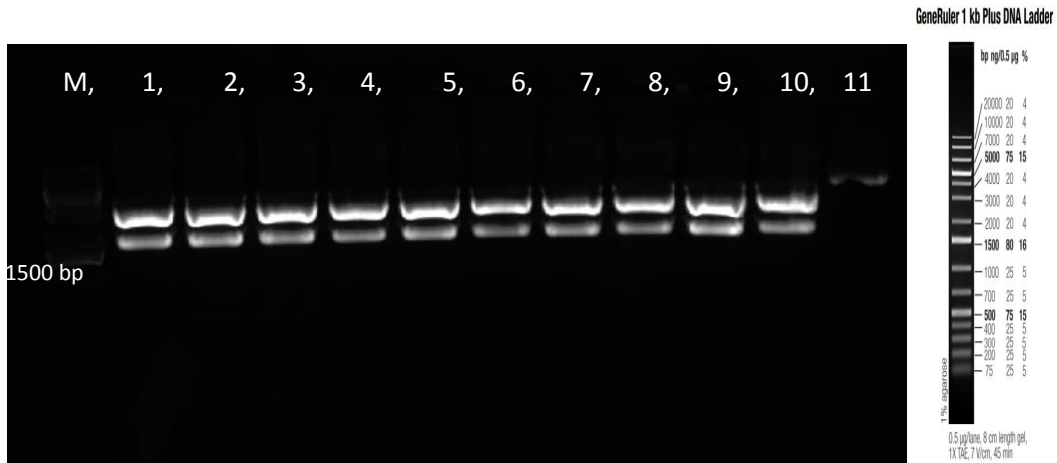
Şekil 3.257: OebGlu PZR jel görüntüsü, Marker: Marker, GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

PZR™8/GW/TOPO® TA vektörüne yapılan klonlama sonucu oluşan kolonilerden PZR ile rekombinant koloniler tarandı. Şekil 3.28' de pozitif kolonilerde OebGlu geni uuzunluğunda PZR bandı görülmektedir.



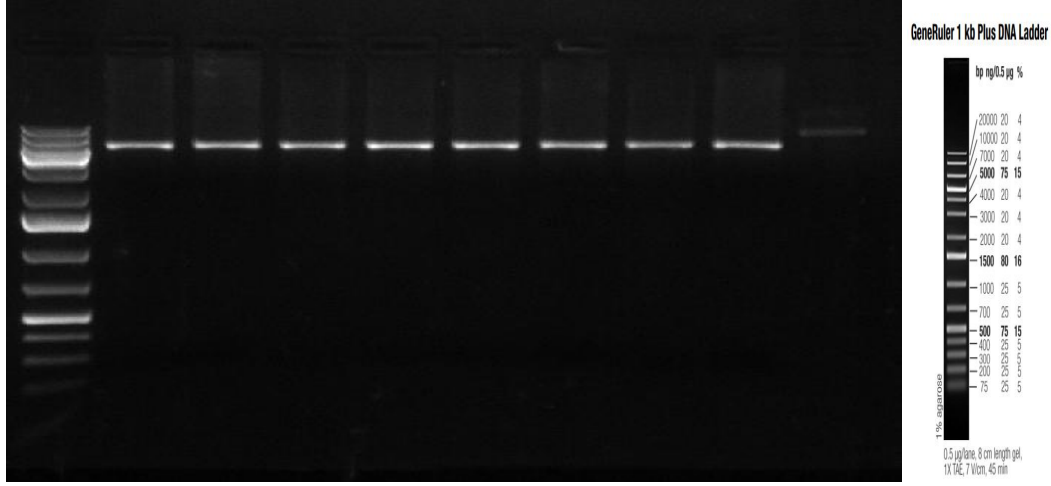
Şekil 3.268: Rekombinant kolonilerin belirlenmesi amacıyla yapılan 9 adet koloniye ait koloni PZR jel görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1-9 sırayla taranan koloni numaraları

Şekil 3.29' da belirtilen pozitif kolonilerden plazmid izole edilerek EcoR1 ve HindIII restriksiyon bölgelerine sahip *OebGlu* geni, aynı enzimlerle kesilerek pET21a vektörüne klonlamak için hazır uçlar elde edildi. Kesimin kontrolü olarak halkasal plazmid en son sırada jele yüklendi.



Şekil 3.279: Rekombinant Topo TA plazmidinin EcoR1 ve HindIII enzimleriyle kestikten sonraki restriksiyon jel görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1-10 sırayla kesilen aynı plazmidde ait örnekler, 11: Kontrol olarak kullanılan halkasal plazmid

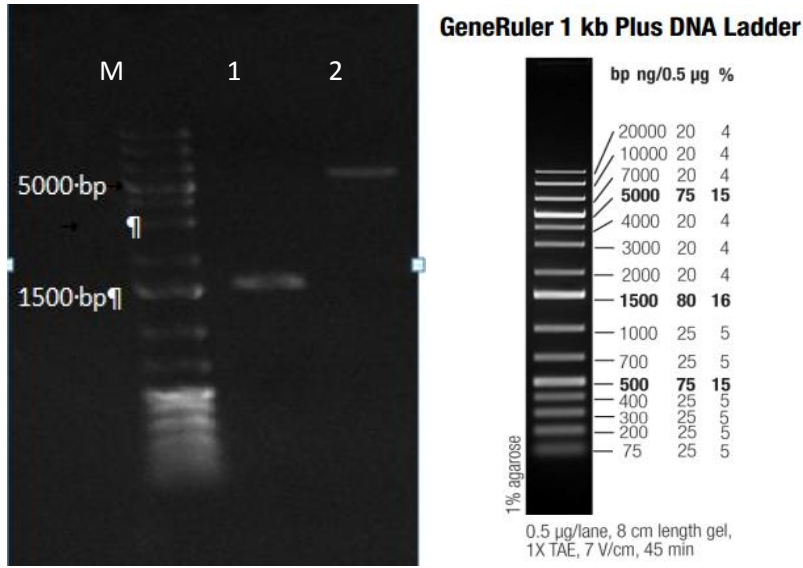
OebGlu geninin kesiminin yapıldığı EcoR1 ve HindIII restriksiyon enzimleri ile halkasal pET21a vektörü de kesilerek ligasyon için uygun restriksiyon uçları oluşturuldu. Kesimin kontrolü olarak halkasal plazmid en son sırada jele yüklendi.



Şekil 3.30: pET21a vektörünün EcoRI ve HindIII restriksiyon enzimleri ile kesimine ait jel görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1-8 sırayla kesilen aynı plazmide ait örnekler, 11: Kontrol olarak kullanılan halkasal plazmid

Şekil 3.30' da görüldüğü gibi halkasal vektör çift bant olarak görülürken kesilen pET21a vektörü tek bant olarak görülmektedir. Aynı zamanda halkasla plazmid ile linear plazmidler arasında elektroforezdeki hızlarından dolayı uzunluk farkı varmış gibi de görülmektedir. Bu durumda restriksiyonun başarılı bir biçimde gerçekleştiği düşünüldü, kesilen ürünlerin jelden geri kazanılması işlemi gerçekleştirilmiştir.

Qiagen Jel prüfikasyon kiti ile jelden geri kazanılan EcoRI ve HindII enzimleri ile kesilen OebGlu ve Pet21a, miktar tayini için 1 µl örnek kullanılarak Şekil 3.31' de belirtildiği gibi % 0,8' lik agaroz jelde yürütüldü.



Şekil 3.281: Restriksiyon enzimleri ile kesilen OebGlu ve pET21a'nın miktar tayini jel fotoğrafı, M Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania), 1: Kesilen ve saflaştırılmış OebGlu, 2: Kesilen ve saflaştırılmış pET21a vektörü

Sonuç olarak jelden geri kazanılan OebGlu için ≈ 70 ng / μ l, pET21a için ≈ 40 -50 ng / μ l olduğu belirlendi.

Farklı koşullarda bir çok ligasyon ve transformasyon denemesi yapılmasına rağmen transformasyon sonucu elde edilen koloniler koloni PZR ile taranmış, fakat klonlamanın başarısız olduğu gözlenmiştir.

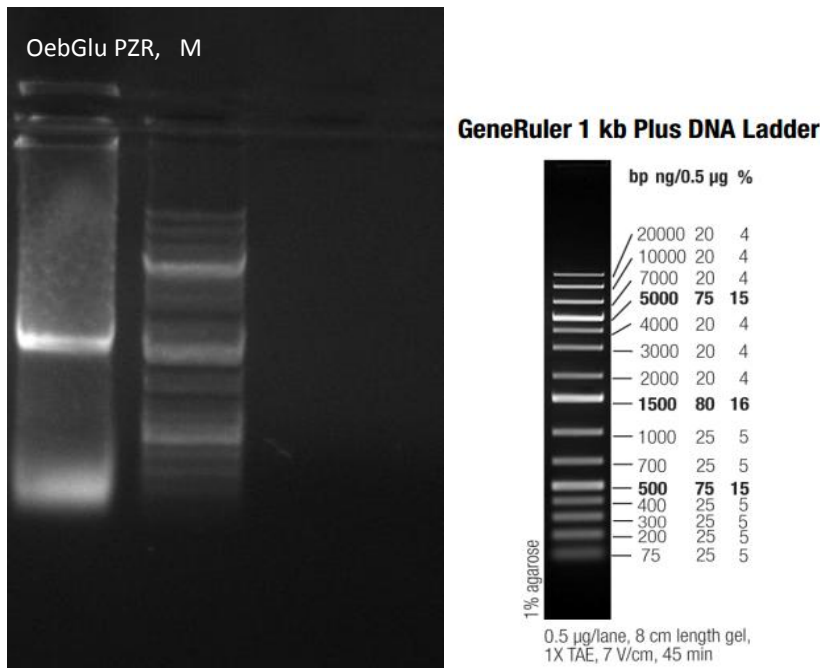
3.1.3.2.2 pLATE51 Vektörü Kullanılarak Yapılan Çalışmalara Ait Bulgular

pET21a vektörü kullanılarak yapılan klonlama çalışmalarında başarılı olunmadığı için toksik genlere ve plasmid kararsızlığı gibi durumlar için özelleştirilmiş pLATE51 ekspresyon vektörüne yapılacak klonlama çalışmalarında kullanılan primerler tablo 3.7' de belirtilmiştir.

Tablo 3.7: pLATE51 vektörüne yapılacak klonlama çalışmalarında kullanılan primerler

| PRİMERİN ADI | PRİMER DİZİSİ |
|--------------------------------|---|
| OEBGLU F | 5' GGTGATGATGATGACAAGATGGATATCCAAAGCAACGTCCTGACG 3' |
| OEBGLU R | 5' GGAGATGGGAAGTCATTAGGTGCTGCCTCTAAGCCTTTTACGAGC 3' |
| LIC Forward Sequencing primer, | 5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' |
| LIC Reverse Sequencing primer | 5' GAGCGGATAACAATTTTCACACAGG 3' |

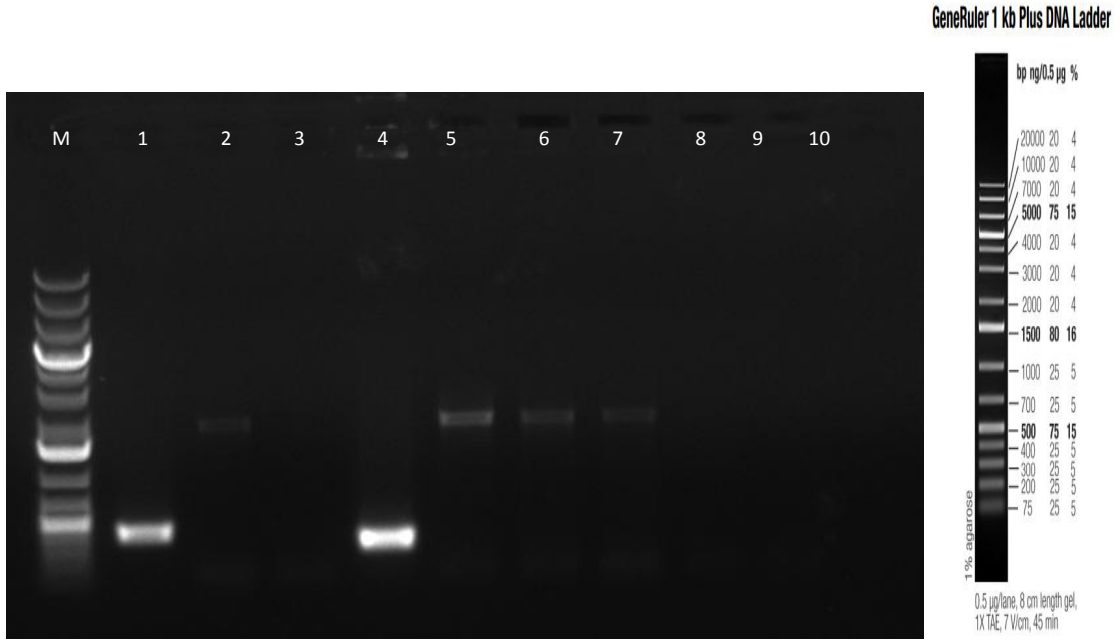
Tablo 3.7' de belirtilen OebGlu F ve OebGlu R primerleri ile yapılan PZR reaksiyonuna ait agaroz jel görüntüsü şekil 3.32' de belirtilmiştir.



Şekil 3.292: *OebGlu* genini pLATE51 vektörüne klonlama amacı ile yapılan PZR' a ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

PZR sonucu elde edilen bantlar jelden geri kazanılarak saflaştırıldı. Miktar tayini sonucu elde edilen ürünün, 75-80 ng / µL olduğu belirlenmiştir. Ligasyon için 7 µL PZR ürünü, 1 µL taq polimeraz enzimi, 1 µL ligasyon tamponu ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 0,6 µL EDTA ilave edildi. 1 µL PLATE51 vektörü eklendi ve 40 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 5 µL ligasyon ürünü Dh10b kompetan hücrelerine transforme edildi. Bir gece 37 °C' de inkübasyondan sonra elde edilen kolonilerden, tablo 3.7' de belirtilen LIC Forward Sequencing primer ve LIC Reverse Sequencing primer ile koloni taraması yapıldı. Koloni PZR sonucu

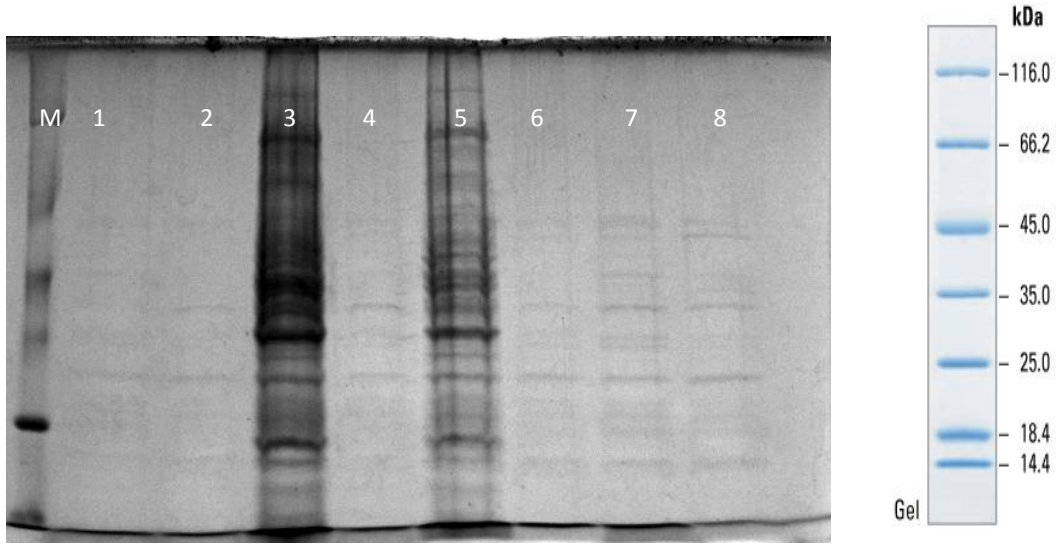
rekombinant kolonilerden *OebGlu* genine ait 1689 bp ve vektöre ait 266 bp olmak üzere toplam ~2000 bp uzunluğunda PZR bandı olması beklendi. Şekil 3.33' te belirtilen jel elektroforezi görüntüsünde; M: Markır, taranan 10 adet koloniye ait PZR ürünleri ise sırayla yüklenmiştir. 2, 5, 6 ve 7 numaralı kolonilerin Rekombinant olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3.303: Rekombinant kolonilerin belirlenmesi için yapılan koloni taramasına ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder # 1331 (Fermentas, Vilnius, Lithuania)

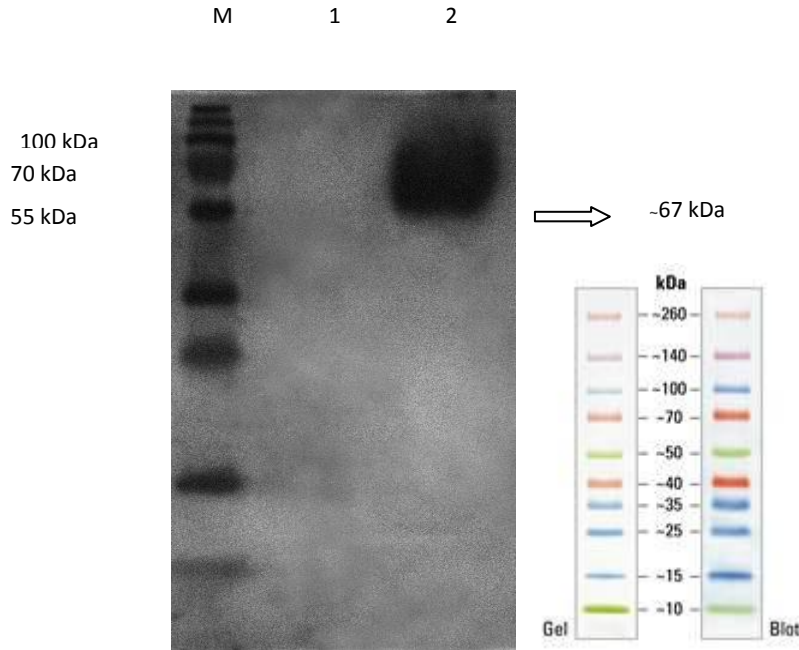
3.1.3.3 *OebGlu* Proteininin Karakterizasyon Çalışmaları

OebGlu geni pLATE51 vektörüne klonlanıp *E. coli*' de ifade edilmesiyle protein karakterizasyonu çalışmalarına devam edildi. İfade edilen rekombinant proteinin varlığı SDS-PAGE elektroforezi ile görüntülenmek istendi. Şekil 3.34' te belirtilen protein örnekleri eşit yükleme yapıldı.



Şekil 3.314: Rekombinant OebGlu proteininin ifadesine ait SDS-PAGE jel elektroforezi görüntüsü, M:Markır Fermentas Thermo Scientific Unstained Protein Molecular Weight Marker , (Fermentas, Lithuania),1:İndüklenmemiş OebGlu+pLATE 51, 2: 1saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51, 3: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 ham ekstrakt, 4: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 protamin sülfat sonrası süpernatant, 5: 3 saat indüklenmiş OebGlu+pLATE 51 pellet, 6: İndüklenmemiş kontrol plazmit, 7: 1saat indüklenmiş kontrol plazmit, 8: 3 saat indüklenmiş kontrol plazmit 51 protamin sülfat sonrası süpernatant

Sonuç olarak OebGlu' nin ekspresyonu tam olarak ispatlanamamıştır. Proteinin varlığının ispatlanması amacıyla Şekil 3.35' te belirtildiği gibi western blot yapıldı.

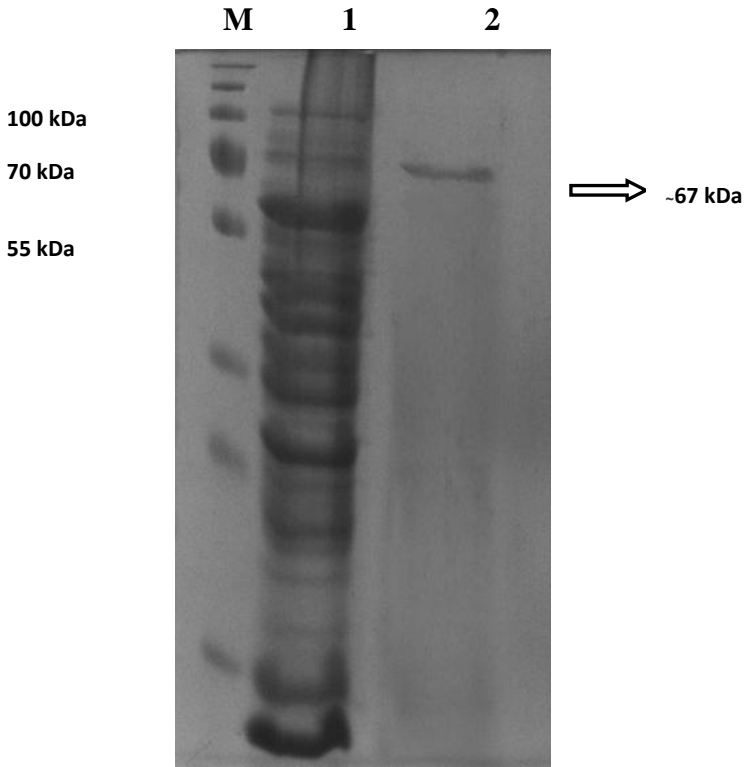


Şekil 3.325: Rekombinant OebGlu proteine ait Western blot analizi, M: Markır PageRuler™ Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas, Lithuania),1: İndüklenmemiş control, 2: OebGlu

Sonuç olarak OebGlu proteini, his-tag antikoruna affinite göstermiş ve ifade edildiği ispatlanmıştır.

3.1.3.3.1 OebGlu Enziminin Saflaştırılması

Ni-NTA affinite yöntemi ile Ni-NTA Spin Kit Qiagen, Almanya kullanılarak OebGlu enzimi saflaştırılmış, aktivite ölçümleri ve diğer biyokimyasal deneyler saf enzim üzerinden yapılmıştır. Şekil 3.36' de saflaştırılmış OebGlu proteininin SDS PAGE jel elektroforezi görüntüsü bulunmaktadır. Örnekler sırayla;



Şekil 3.36: Saflaştırılmış OebGlu enziminin SDS PAGE jel elektroforezi görüntüsü, M; PageRuler Plus Prestained Protein Markır (10–260 kDa) Fermentas, 1; ham ekstrakt, 2; saflaştırılmış rekombinant OebGlu protein olacak şekilde yüklenmiştir.

Sonuç olarak OebGlu proteininin etkin bir şekilde saflaştırıldığı, ve yaklaşık 67 kDA moleküler ağırlığa sahip olduğu SDS PAGE elektroforezi sonucu kanıtlanmıştır.

3.1.3.3.2 OebGlu Enziminin Aktivite Ölçümüne Ait Veriler

OebGlu enzimi, ticari olarak bulunan substratlar ile pNPGlu substratına karşı gösterdiği rölâtif aktiviteye ait veriler tablo 3.8' de belirtilmiştir.

Tablo 3.8: OebGlu enziminin rölâtif aktivitesi

| Substrat | Relative Aktivite (%) |
|----------|-----------------------|
| pNPGlu | 100 |
| pNPGal | 22,5 |
| oNPGlu | 19,5 |
| oNPGal | 20,7 |

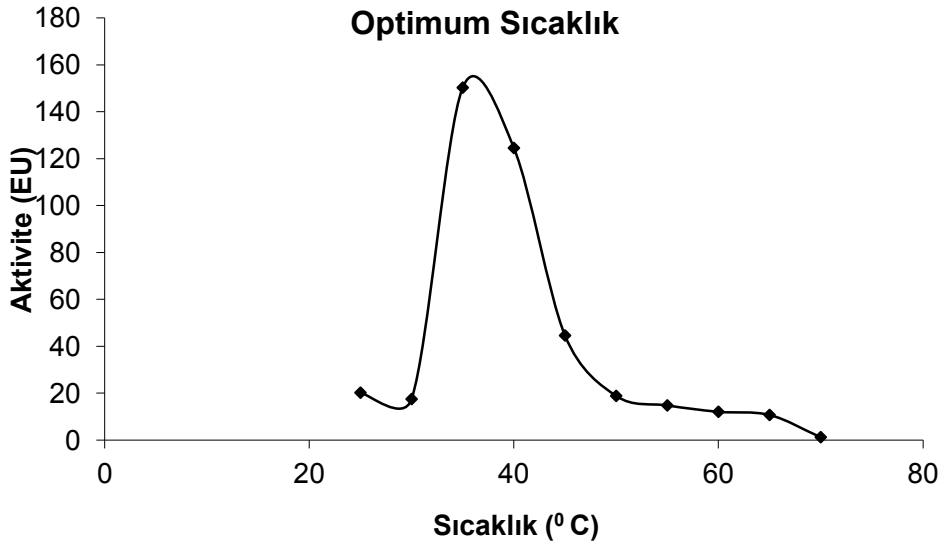
Şekil 3.37' de OebGlu enziminin 4-MUG substratına karşı ilgisine ait UV ışığı altında incelenen native jel görüntüsü belirtilmiş, sonuç olarak rekombinant OebGlu enziminin 4-MUG substratına karşı ilgisinin olduğu belirlenmiştir.



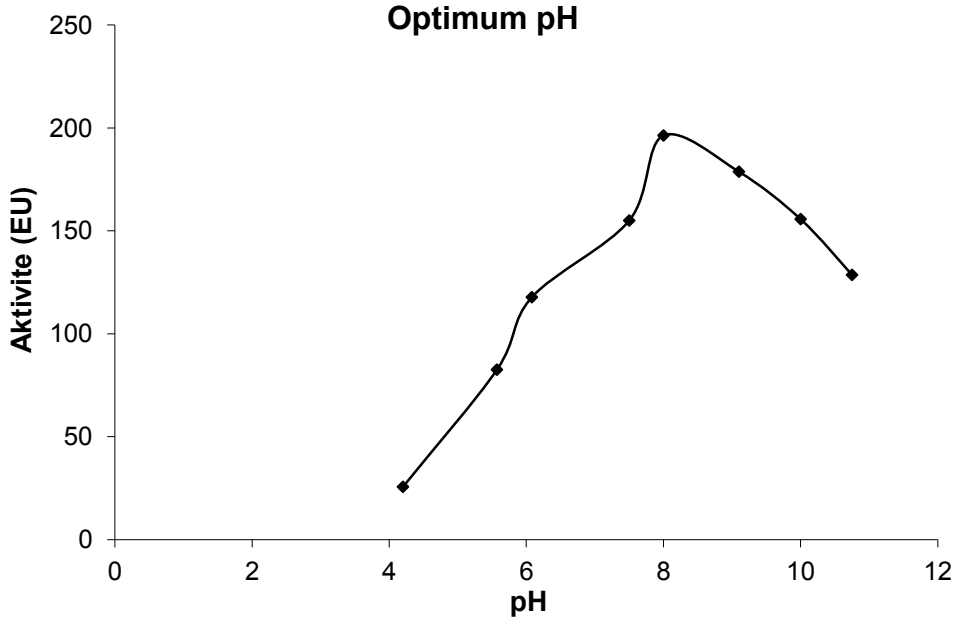
Şekil 3.337: OebGlu enziminin 4-MUG substratına karşı aktivitesi

3.1.3.3.3 OebGlu Enziminin Optimum Sıcaklık ve pH değerlerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

Sonuç olarak, OebGlu enzimi, en yüksek aktiviteyi pNPGlu substratına karşı göstermiştir. En yüksek ilgi duyduğu substrat belirlendikten sonra optimum sıcaklık (şekil 3.38) ve pH (şekil 3.39) değerlerinin belirlenmesi için pNPGlu substratı kullanıldı. Optimum sıcaklık belirlenmesi için enzim ve substrat p-NPG solusyonu karışımı 25–65°C’ de 30 dakika muamele edildi ve reaksiyon 0.5 M NaCO₃ ile durdurularak 410 nm’ de OD değeri gözlemlendi. Zeytin beta glukozidaz enzimi üzerine pH etkisini araştırmak için 25mM NaAc buffer (3.0–5.8), Sitrat-fosfat buffer (3.0–7.0) ve fosfat (6.0–8.5) bufferları kullanılmıştır.



Şekil 3.348: OebGlu enzimine ait optimum sıcaklık grafiği



Şekil 3.39: OebGlu enzimine ait optimum pH grafiği

Şekil 3.38' de belirtilen optimum sıcaklık grafiğine göre, OebGlu enzimi en yüksek aktiviteyi 37 °C sıcaklıkta, şekil 3.39' da belirtilen optimum pH grafiğine göre ise en yüksek aktiviteyi pH: 8.0' da göstermektedir.

3.1.3.3.4 OebGlu Enziminin Amonyum Sülfat Çöktürmesine Ait Veriler

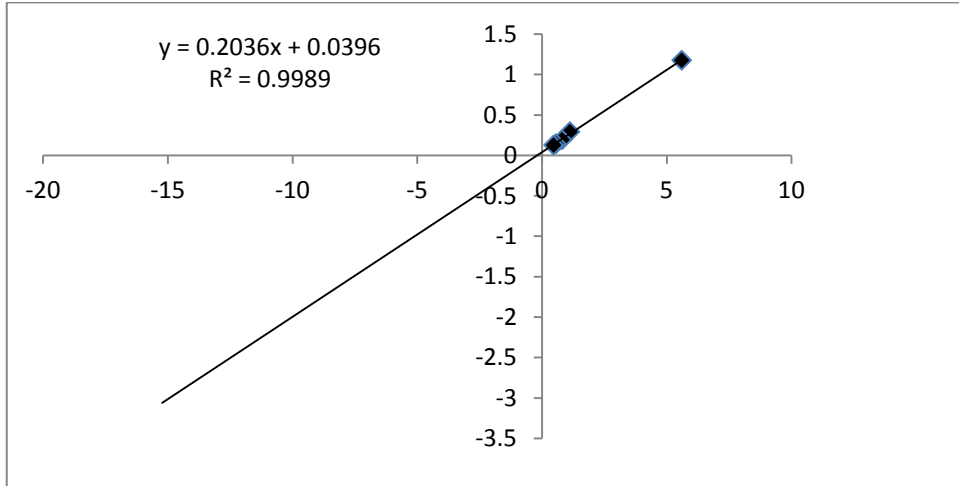
OebGlu enzimi, amonyum sülfat çöktürmesi % aralığı belirlenmesi için uygulanan amonyum sülfat çöktürmesi sonucu, OebGlu proteini tablo 3.9' da da belirtildiği gibi %30-70 aralığında çökmektedir.

Tablo 3.9: OebGlu enziminin amonyum sülfat çöktürmesine ait değerler

| Amonyum sülfat çöktürme % aralığı | 0-10 | 10-20 | 20-30 | 30-40 | 40-50 | 50-60 | 60-70 | 70-80 | 80-90 | 90-100 |
|-----------------------------------|----------|----------|----------|----------|-------|---------|-------|----------|----------|----------|
| EU | 1041,084 | 0,036585 | 3354,521 | 4786,649 | 36585 | 6300,85 | 63558 | 0,036585 | 0,036585 | 7981,397 |
| Protein miktarı | 0.129 | 0.208 | 0.307 | 0.181 | 0.571 | 0.828 | 0.905 | 0.585 | 0.449 | 0.155 |

3.1.3.3.5 OebGlu Enziminin Km ve Vmax Değerlerinin Hesaplanmasına Ait Bulgular

OebGlu enziminin Km ve Vmax değerleri şekil 3.40' ta belirtilen grafik denklemi esas alınarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.40: OebGlu enziminin Vmax değerini gösteren grafik

OebGlu enziminin Km ve Vmax değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılan substrat ve enzim çözeltilisinin hacimleri tablo 3.10' da belirtilmiştir.

Tablo 3.10: OebGlu enziminin pNPG substratı kullanılarak, Km ve Vmax değerlerinin tespitinde kullanılan çözeltilerin hacimleri, aktivite, 1/V ve 1/[S]

| 50 mM NaAc Tamponu (µL) | Enzim çözeltilisinin Hacmi (µL) | Substat çözeltilisinin Hacmi (µL) | Kuyudaki toplam hacim (µL) | Kuyudaki substrat kons. [S] (mM) | ΔA (405 nm) | Aktivite (U/ml dak) | 1/V*10 ⁻⁴ | 1/[S] |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-------------|---------------------|----------------------|----------|
| 65 | 70 | 5 | 140 | 0.178571 | 0.02 | 0.849593 | 5.6 | 1.177033 |
| 60 | | 10 | | 0.357143 | 0.042 | 1.743902 | 2.8 | |
| 55 | | 15 | | 0.535714 | 0.047 | 1.947154 | 1.866667 | |
| 50 | | 20 | | 0.714286 | 0.062 | 2.556911 | 1.4 | |
| 45 | | 25 | | 0.892857 | 0.083 | 3.410569 | 1.12 | 0.293206 |
| 40 | | 30 | | 1.071429 | 0.106 | 4.345528 | 0.933333 | |
| 35 | | 35 | | 1.25 | 0.126 | 5.158537 | 0.8 | 0.193853 |
| 30 | | 40 | | 1.428571 | 0.151 | 6.174797 | 0.7 | |
| 25 | | 45 | | 1.607143 | 0.166 | 6.784553 | 0.622222 | |
| 20 | | 50 | | 1.785714 | 0.168 | 6.865854 | 0.56 | 0.145648 |
| 15 | | 55 | | 1.964286 | 0.183 | 7.47561 | 0.509091 | |
| 10 | | 60 | | 2.142857 | 0.191 | 7.800813 | 0.466667 | 0.128192 |
| 5 | | 65 | | 2.321429 | 0.203 | 8.288618 | 0.430769 | |

Sonuç olarak OebGlu enziminin Vmax değeri: 25.25 EU, Km değeri ise 5.14 mM olarak belirlendi.

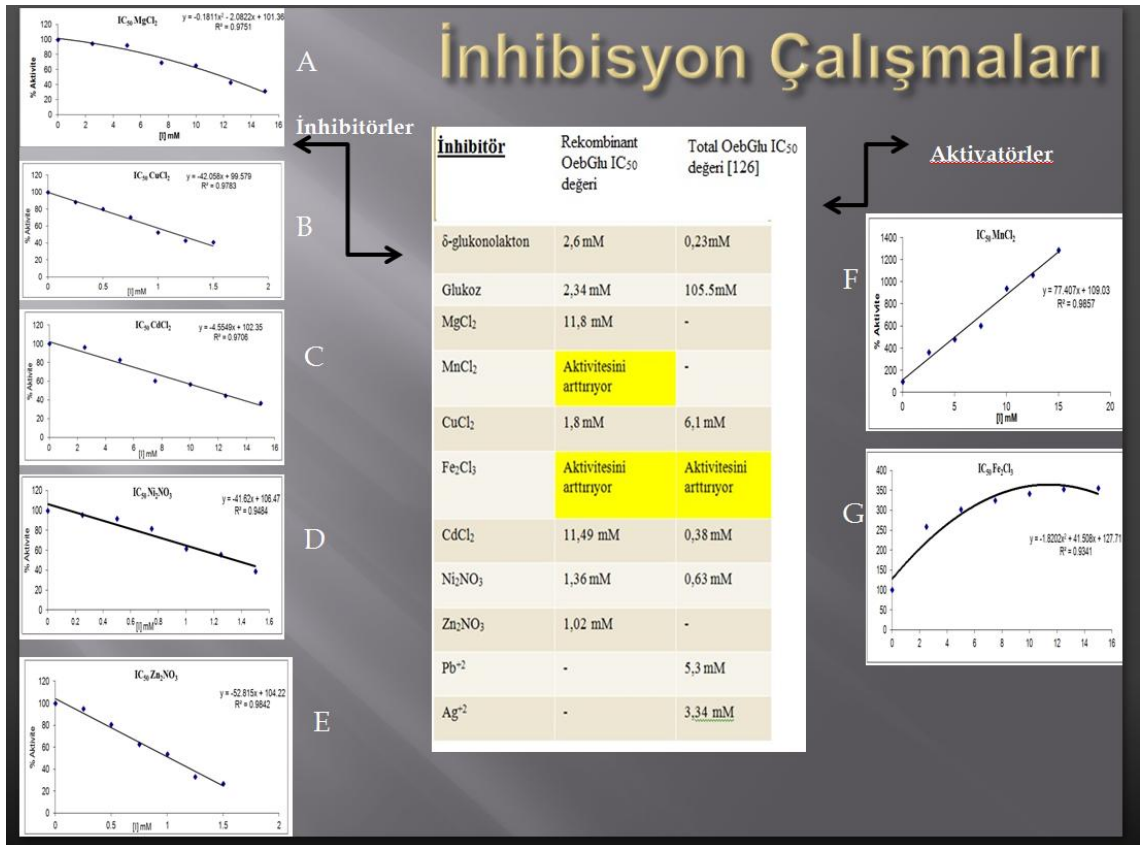
3.1.3.3.6 OebGlu Enziminin İnhibitör ve Aktivatörlerinin Tayini ve IC₅₀ Değerlerine Ait Bulgular

Yapılan literatür taraması sonucu OebGlu enzim aktivitesini aktive ya da inhibe edebilecek maddeler belirlendi. İnhibitörler için IC₅₀ değerleri hesaplandı. Glukoz ve δ-glukanolakton beta glukozidaz enzimlerinin genel inhibitörleri oldukları için bu maddelerin inhibisyona etkisi pNPGlu substratı kullanılarak incelendi. Ayrıca farklı metallerin OebGlu enzimi üzerine etkisi araştırıldı. Tablo 3.11' de Zeytin β glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi araştırılan maddelerin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözeltiler miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen veriler belirtilmiştir.

Tablo 3.11: Zeytin β glukozidaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi araştırılan maddelerin IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan çözelti miktarları ve bunlara karşılık gelen substrat, inhibitör konsantrasyonları ile elde edilen sonuçlar.

| 50 mM NaAc Tamponu (μ L) | İnhibitör | Enzim çözeltisinin Hacmi (μ L) | Substat çözeltisinin Hacmi (μ L) | İnhibitör çözeltisinin Hacmi (μ L) | Kuyudaki inhibitör kons. [I] (mM) | Δ A (405 nm) | Aktivite (U/ml dak) | % Aktivite | | |
|-------------------------------|---|-------------------------------------|---------------------------------------|---|-----------------------------------|---------------------|---------------------|------------|-------|----------|
| 60 | 0,05 M MgCl ₂ | 70 | 70 | - | 0 | 0,095 | 1.977444 | 99.99998 | | |
| 50 | | | | 10 | 0.0025 | 0,091 | 1.877193 | 94.93027 | | |
| 40 | | | | 20 | 0.005 | 0,089 | 1.827068 | 92.39542 | | |
| 30 | | | | 30 | 0.0075 | 0,071 | 1.37594 | 69.58174 | | |
| 20 | | | | 40 | 0.01 | 0,068 | 1.300752 | 65.77945 | | |
| 10 | | | | 50 | 0.0125 | 0,050 | 0.849624 | 42.96577 | | |
| - | | | | 60 | 0.015 | 0,041 | 0.62406 | 31.55893 | | |
| 60 | | | | 0,05 M MnCl ₂ | 70 | 70 | - | 0 | 0,094 | 1.952381 |
| 50 | 10 | 0.0025 | 0,298 | | | | 7.065163 | 361.8742 | | |
| 40 | 20 | 0.005 | 0,389 | | | | 9.345865 | 478.6906 | | |
| 30 | 30 | 0.0075 | 0,484 | | | | 11.72682 | 600.6418 | | |
| 20 | 40 | 0.01 | 0,746 | | | | 18.29323 | 936.9705 | | |
| 10 | 50 | 0.0125 | 0,844 | | | | 20.74937 | 1062.773 | | |
| - | 60 | 0.015 | 1,018 | | | | 25.11028 | 1286.136 | | |
| 60 | 0,005 M CuCl ₂ | 70 | 70 | | | | - | 0 | 0,102 | 2.553885 |
| 50 | | | | 10 | 0.00025 | 0,114 | 2.253133 | 88.22374 | | |
| 40 | | | | 20 | 0.0005 | 0,106 | 2.052632 | 80.37291 | | |
| 30 | | | | 30 | 0.00075 | 0,111 | 1.802005 | 70.55936 | | |
| 20 | | | | 40 | 0.001 | 0,112 | 1.350877 | 52.89499 | | |
| 10 | | | | 50 | 0.00125 | 0,104 | 1.100251 | 43.08145 | | |
| - | | | | 60 | 0.0015 | 0,099 | 1.050125 | 41.11874 | | |
| 60 | | | | 0,05 M Fe ₂ Cl ₃ | 70 | 70 | - | 0 | 0,104 | 2.203008 |
| 50 | 10 | 0.0025 | 0,244 | | | | 5.711779 | 259.2718 | | |
| 40 | 20 | 0.005 | 0,282 | | | | 6.66416 | 302.5028 | | |
| 30 | 30 | 0.0075 | 0,302 | | | | 7.165414 | 325.2559 | | |
| 20 | 40 | 0.01 | 0,317 | | | | 7.541353 | 342.3207 | | |
| 10 | 50 | 0.0125 | 0,326 | | | | 7.766917 | 352.5596 | | |
| - | | | | | | | | | | |
| 60 | 0,05 M CdCl ₂ | 70 | 70 | | | | - | 0 | 0,092 | 1.902256 |
| 50 | | | | 10 | 0.0025 | 0,089 | 1.827068 | 96.04741 | | |
| 40 | | | | 20 | 0.005 | 0,079 | 1.576441 | 82.87218 | | |
| 30 | | | | 30 | 0.0075 | 0,062 | 1.150376 | 60.4743 | | |
| 20 | | | | 40 | 0.01 | 0,059 | 1.075188 | 56.52173 | | |
| 10 | | | | 50 | 0.0125 | 0,050 | 0.849624 | 44.66402 | | |
| - | | | | 60 | 0.015 | 0,044 | 0.699248 | 36.75889 | | |
| 60 | | | | 0,005 M Ni ₂ NO ₃ | 70 | 70 | - | 0 | 0,105 | 2.22807 |
| 50 | 10 | 0.00025 | 0,101 | | | | 2.12782 | 95.50057 | | |
| 40 | 20 | 0.0005 | 0,098 | | | | 2.052632 | 92.12599 | | |
| 30 | 30 | 0.00075 | 0,089 | | | | 1.827068 | 82.00226 | | |
| 20 | 40 | 0.001 | 0,071 | | | | 1.37594 | 61.75479 | | |
| 10 | 50 | 0.00125 | 0,066 | | | | 1.250627 | 56.13049 | | |
| - | 60 | 0.0015 | 0,051 | | | | 0.874687 | 39.2576 | | |
| 60 | 0,005 M Zn ₂ NO ₃ | 70 | 70 | | | | - | 0 | 0,094 | 1.952381 |
| 50 | | | | 10 | 0.00025 | 0,090 | 1.85213 | 94.86521 | | |
| 40 | | | | 20 | 0.0005 | 0,079 | 1.576441 | 80.74454 | | |
| 30 | | | | 30 | 0.00075 | 0,065 | 1.225564 | 62.77278 | | |
| 20 | | | | 40 | 0.001 | 0,058 | 1.050125 | 53.7869 | | |
| 10 | | | | 50 | 0.00125 | 0,042 | 0.649123 | 33.24775 | | |
| - | | | | 60 | 0.0015 | 0,037 | 0.52381 | 26.82927 | | |

Farklı metallerin rekombinant OebGlu ve total OebGluenzim aktivitesi üzerine etkisi karşılaştırılmalı olarak şekil 3.41’ de belirtilmiştir. Bu çalışma kapsamında daha önce Kara ve arkadaşları [126] tarafından saflaştırılan total zeytin beta glukozidaz enzimi üzerinde etkisi araştırılmış farklı inhibitör ve metaller ile kıyaslama yapılmış, ayrıca farklı metallerin enzim aktivitesi üzerine etkileri de araştırılmıştır. Sonuç olarak demir ve manganın rekombinant OebGlu enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Enzimin bilinen genel inhibitörlerinden çalışma kapsamında IC₅₀ değerleri ve etkisi araştırılan δ-glukanolakton ve glukozu ilaveten test edilen farklı metallerden MgCl₂, MnCl₂, CuCl₂, CdCl₂, Ni₂NO₃ ve ZnNO₃’ ün de enzim aktivitesini inhibe ettikleri tespit edilmiş ve IC₅₀ değerleri belirlenmiştir (Şekil 3.41). IC₅₀ değerlerinin belirlenmesinde kullanılan denklemler tablo 3.12’ de belirtilmiştir.



Şekil 3.41: Farklı metallerin OebGlu enzim aktivitesi üzerine etkisini ve IC₅₀ değerlerinin bulunmasında kullanılan grafikler

OebGlu enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılan maddeler için kullanılan grafikler tablo 3.12’ de detaylı olarak belirtilmiştir.

Tablo 3.12: OebGlu enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılan maddeler için kullanılan grafikler

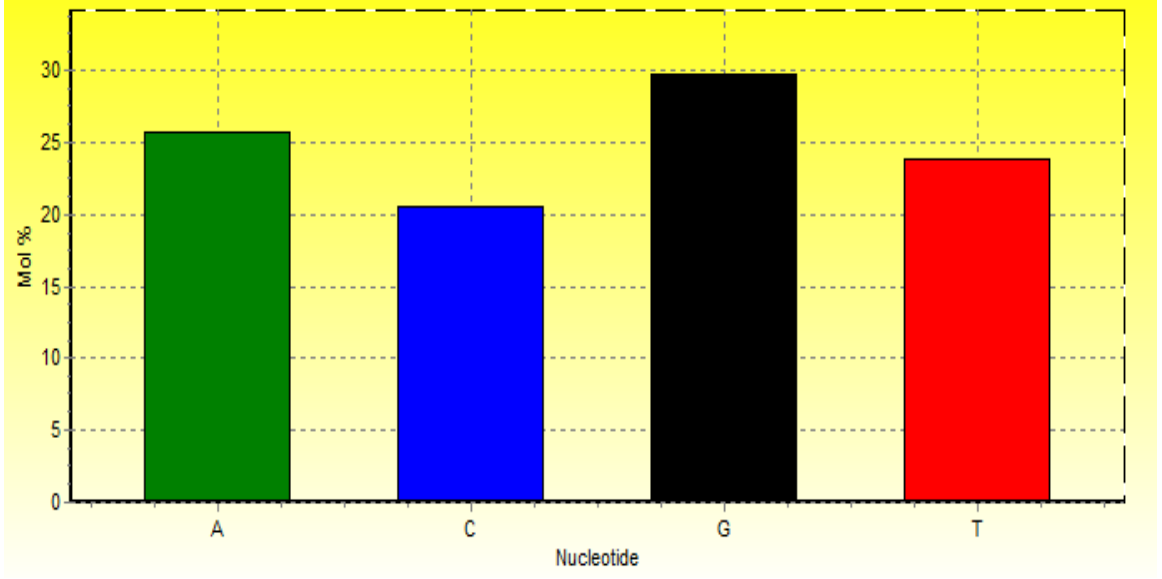
| IC ₅₀ değerleri araştırılan madde | Elde edilen grafik |
|--|---|
| 0,01 M δ-glukanolakton | $y = -10.38x^2 + 7.49x + 100.28$ $R^2 = 0.98$ |
| 0,01 M glukoz | $y = -22.486x + 102.66$ $R^2 = 0.9757$ |
| 0,05 M MgCl ₂ | $y = -0.1811x^2 - 2.0822x + 101.36$ $R^2 = 0.9751$ |
| 0,05 M MnCl ₂ | $y = 77.407x + 109.03$ $R^2 = 0.9857$ |
| 0,005 M CuCl ₂ | $y = -42.058x + 99.579$ $R^2 = 0.9783$ |
| 0,05 M Fe ₂ Cl ₃ | $y = -1.8202x^2 + 41.508x + 127.71$ $R^2 = 0.9341$ |
| 0,05 M CdCl ₂ | $y = -4.5549x + 102.35$ $R^2 = 0.9706$ |
| 0,005 M Ni ₂ NO ₃ | $y = -41.62x + 106.47$ $R^2 = 0.9484$ |
| 0,005 M Zn ₂ NO ₃ | $y = -52.815x + 104.22$ $R^2 = 0.9842$ |

3.2 Zeytin Metallothionein Genine (*OeMT2*) Ait Bulgular

3.2.1 *OeMT2* Geninin Moleküler Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.2.1.1 *OeMT2* Geninin Biyoinformatik Analizi

cDNA dizisi Dünder ve arkadaşları [167] tarafından elde edilen zeytin bitkisine ait metallothionein geni dizisi, biyoinformatik ve moleküler analizler sonucu tip II metallothionein proteinini kodladığı belirlenmiştir ve *OeMT2* olarak isimlendirilmiştir. *OeMT2* gene ve proteinine ait Bioedit [194] biyoinformatik aracı yardımıyla hazırlanan nükleotid ve aminoasit kompozisyonları şekil 3.42 ve 3.43' te belirtilmiştir.

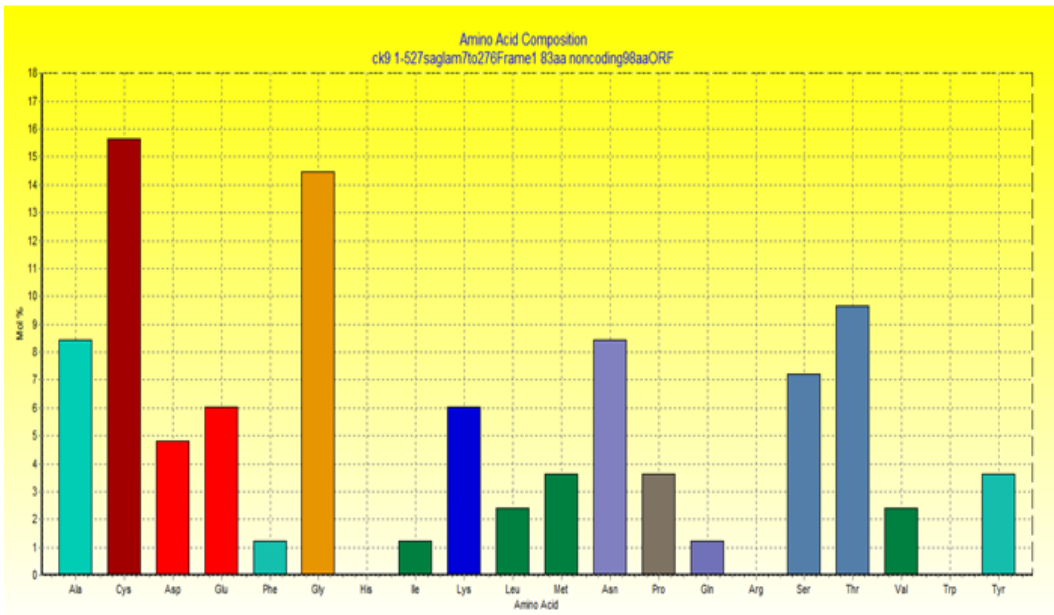


Şekil 3.42: *OeMT2* geninin nükleotid kompozisyonu

Şekil 3.42’ de belirtilen nükleotid kompozisyonuna göre; *OeMT2* geninin A+T oranının %49,6, G+C oranının ise %50,4 olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu genin çift zincirli halinin moleküler ağırlığının da 153243 dalton olduğu tespit edilmiştir.

Açık Okuma Çerçevesi: 83 aa

Molekül Ağırlığı: 8,405 kD



Şekil 3.43: *OeMT2* geninin ait aminoasit kompozisyonu

Şekil 3.43’ te belirtilen aminoasit kompozisyonu ise *OeMT2* proteininin de metallothionein proteinlerinin karakteristik özelliği olan sistein rezidüleri açısından

zengin olduğunu göstermektedir. Ayrıca apolar bir aminoasit olan glisin rezidüleri de diğer aminoasit rezidülerine oranla fazla miktarda bulunmaktadır.

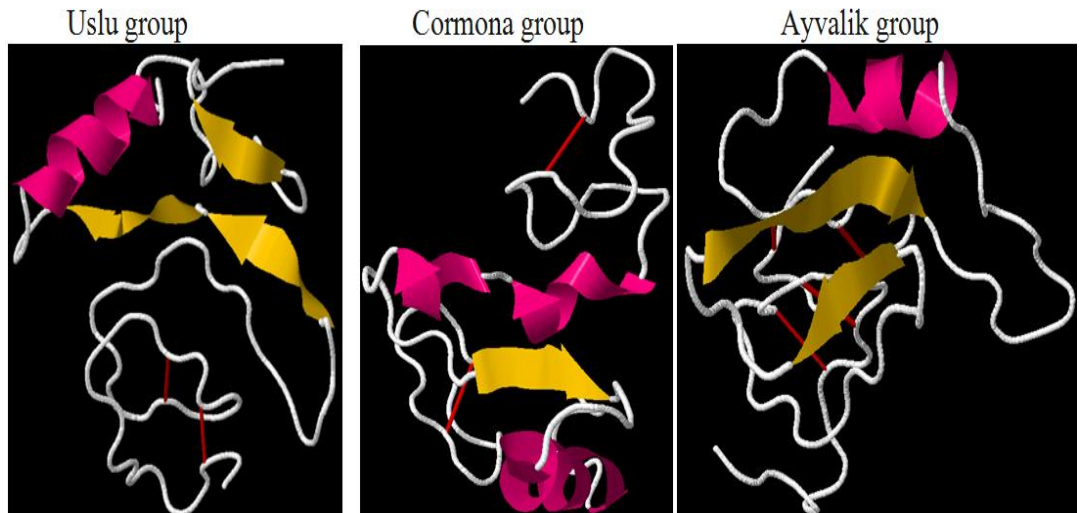
Şekil 3.44’ de TargetP [214] programı ile OeMT2 proteininin hücre içerisindeki lokalizasyonunun belirlenmesi gösterilmektedir.

| Name | Len | cTP | mTP | SP | other | Loc | RC |
|--------|-----|-------|-------|-------|-------|-----|----|
| ck9 | 83 | 0.164 | 0.130 | 0.137 | 0.825 | _ | 2 |
| cutoff | | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | | |

Şekil 3.44: TargetP programı ile OeMT2’ nin lokalizasyonunun belirlenmesi [214]

Buna göre; OeMT2 proteini plastidlerde ya da mitekondride bulunmamakta, yüksek oranda sitosolde bulunmaktadır.

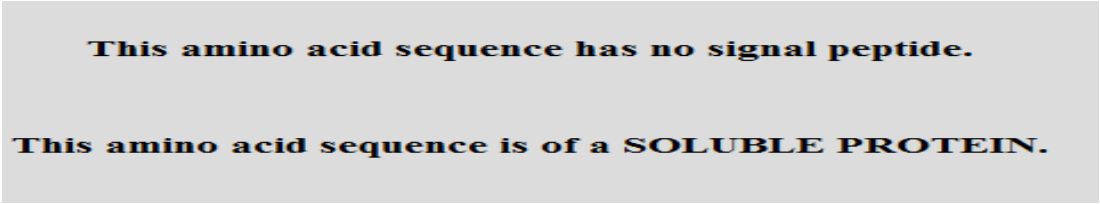
Proteine ait üç boyutlu yapı I-Tasser program ile elde edildi [203]. Yapılan polimorfizm çalışmasında, OeMT2 protein polimorfizmi açısından zeytin çeşitleri arasında üç temel grup oluşturdu. Bu farkın incelenmesi için bu farklı gruplara ait çeşitlerden her birinin üç boyutlu yapısı şekil 3.45’ te de belirtildiği gibi belirlendi.



Şekil 3.355: I-Tasser programı ile oluşturulan OeMT proteinine ait üç boyutlu yapısı [203]

Uslu, Gordales ve Negral çeşitlerinden oluşan Uslu grubunda 3 adet β -tabakası, 1 α -heliks ve 2 disülfid bağı, Cormona grubunda (tek çeşit) 1 β -tabakası, 3 α -heliks ve 2 disülfid bağı ve Ayvalık grunda ise (çalışılan çeşitlerin diğerleri), 2 β -tabakası, 1 α -heliks ve 4 disülfid bağı bulundurmaktadır.

Şekil 3.46' da belirtilen SOSUI sinyal peptid analizine göre, *OeMT2* proteini sinyal peptid içermemekle birlikte soluble bir proteindir [201].



Şekil 3.366: *OeMT2* proteinine ait SOSUI sinyal peptid analizi [201]

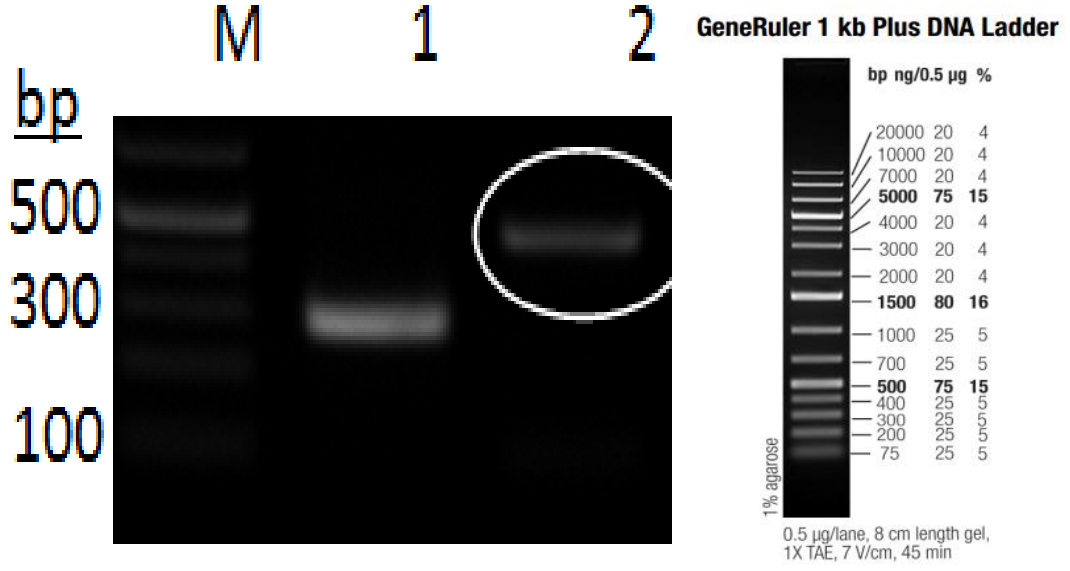
3.2.1.2 *OeMT2* Geninin İntronunun Belirlenmesi

OeMT2 geninin intronunun belirlenmesi amacıyla kullanılan primerler tablo 3.13' de belirtilmiştir.

Tablo 3.13: *OeMT2* deneylerinde kullanılan primerler ve kullanım amaçları

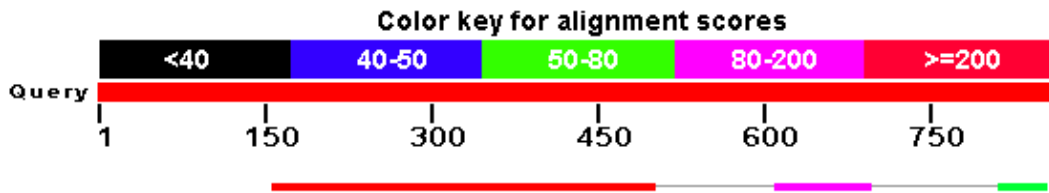
| Primer Adı | Tm | Primer Dizisi | Kullanım Amacı |
|---------------|----------|--|---|
| Ck9FL F | 50 °C | 5' GGT GAT GAT GAT GAC AAG ATG TCT TGC AAT GGA GGA AAC TGT GGA T 3' | İntron tespiti |
| Ck9FL R | 50 °C | 5' GGA GAT GGG AAG TCA TTA TTT GCA ATT GCA TGG ATT GCA AGA GC 3' | İntron tespiti |
| Ck9pol F | 55 °C | 5' CTGACGTAGTGCTCGAGCTTCATTTTCG 3' | Polimorfizm |
| Ck9pol R | 55 °C | 5' GAATCCTTATATCATCCTTGAG 3' | Polimorfizm |
| Ck9Alicator F | | 5' GGTGATGATGATGACAAGATGTCTTGCAATGGAGGAA ACTGTGGAT 3' | Klonlama ve ekspresyon |
| Ck9Alicator R | | 5' GGAGATGGGAAGTCATTATTTGCAATTGCATGGATTG CAAGAGC 3' | Klonlama ve ekspresyon |
| Ck9RT F | | 5' GAATTGTATGAATGTTTTGGGTAAATC 3' | Anlık gösterimli PZR ile kopya sayısı ve ekspresyon profili belirleme |
| Ck9RT R | | 5' TTGGTTTTTCGGTATATAATTAAGCAG 3' | Anlık gösterimli PZR ile kopya sayısı ve ekspresyon profili belirleme |

Şekil 3.47' de belirtilen intronun tespiti için yapılan PZR çalışmasında, gDNA ve cDNA kalıp olarak kullanılarak intronun tespiti jel üzerinde de gösterilmiştir.



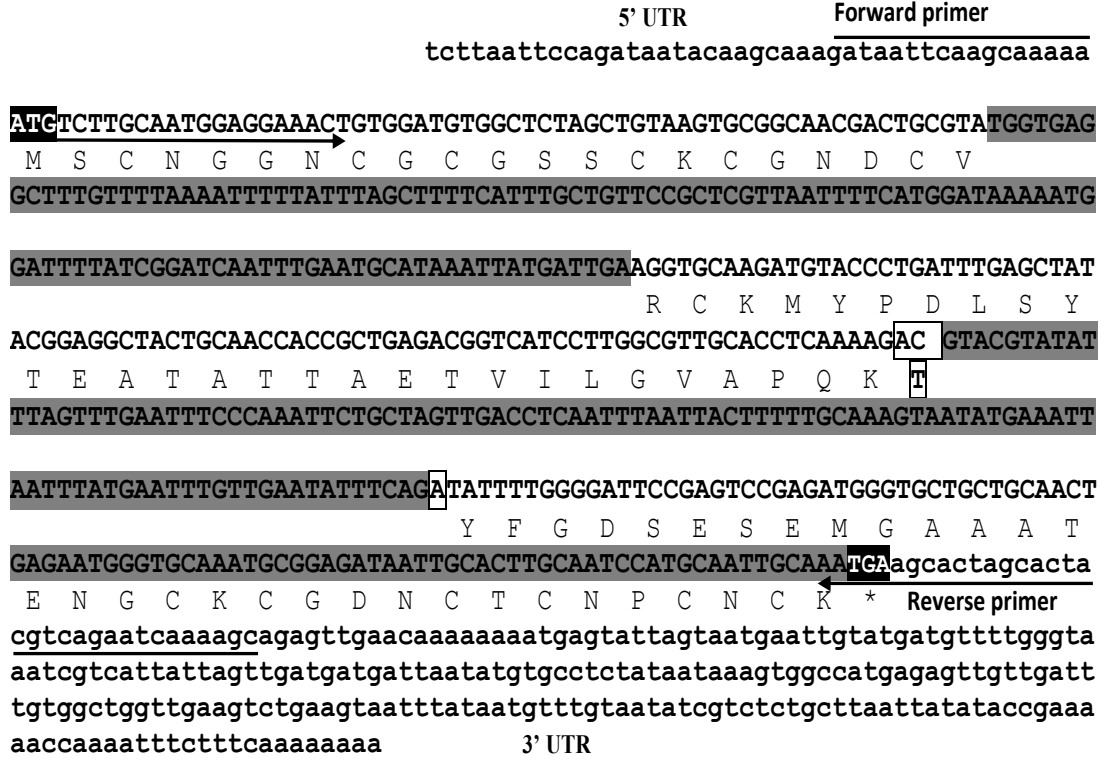
Şekil 3.377: *OeMT2* geninin intronunun belirlenmesi amacıyla yapılan PZR' a ait jel elektroforezi görüntüsü, M: Markır, 1: cDNA PZR, 2: gDNA PZR, olarak agaroz jele yüklenmiştir.

Yapılan dizi analizi sonucu *OeMT2* geninin 107 ve 117 bp olmak üzere iki adet intron içerdiği belirlenmiştir. NCBI very tabanından elde edilen Blast analizi sonucu intronlara ait bölgeler şekil 3.48' de belirtilmiştir.



Şekil 3.388: İtronların varlığını gösteren NCBI blast analizi görüntüsü

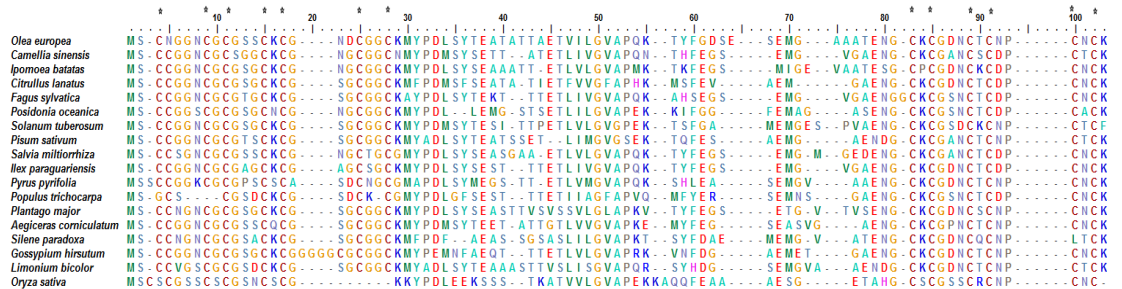
OeMT2 genine ait intron ve ekzonların dizileri şekil 3.49' da belirtilmiştir.



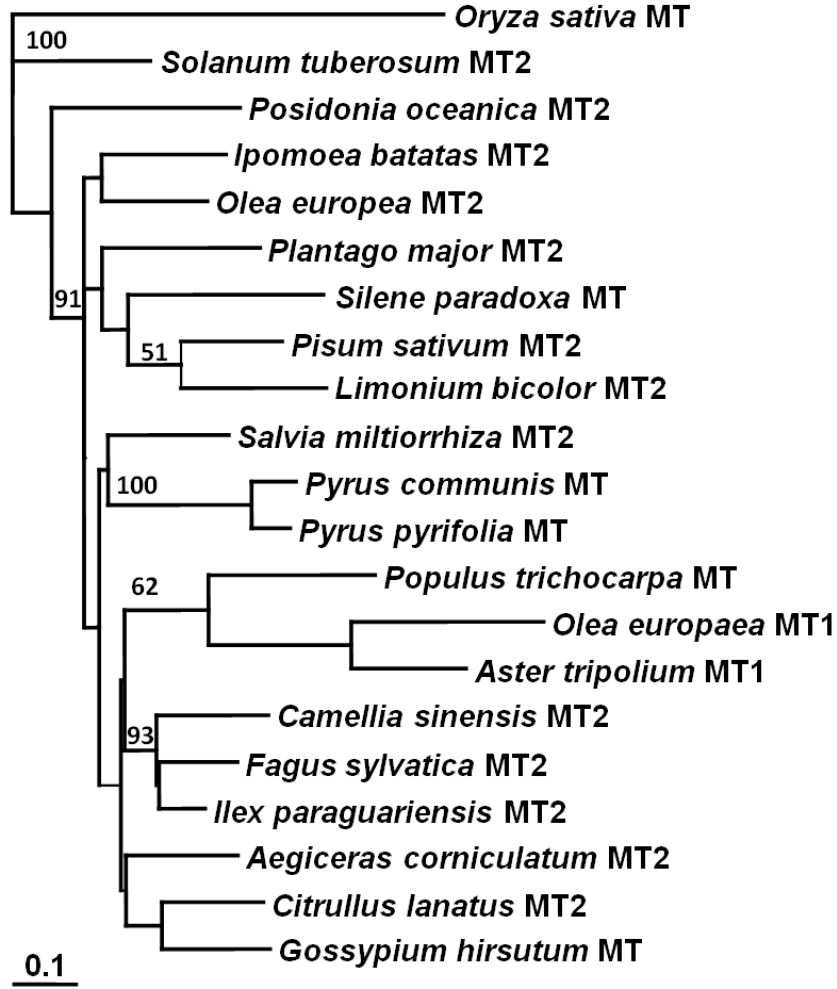
Şekil 3.399: *OeMT2* geninin intron ve ekzonlarına ait nükleotid dizileri, Gri boyalı alanlar intronları, siyah kutucuk içerisine alınmış bölgeler ise başlangıç ve bitiş kodonlarını göstermektedir.

OeMT2 proteininde bulunan korunmuş sistein rezidüleri ve *OeMT2* proteinin farklı bitkilerde bulunan çeşitli metallotionein proteinleri arasındaki polimorfizmi Şekil 3.50 ve şekil 3.51’ de gösterilmiştir.

3.2.1.3 *OeMT2* Geninin Polimorfizm Çalışmalarına Ait Bulgular



Şekil 3.50: *OeMT* proteinine ait korunmuş sistein rezidüleri ve farklı bitkilerde bulunan metallotionein proteinleri ile kıyaslanması, Sistein rezidüleri “☆” işareti ile belirtilmiştir

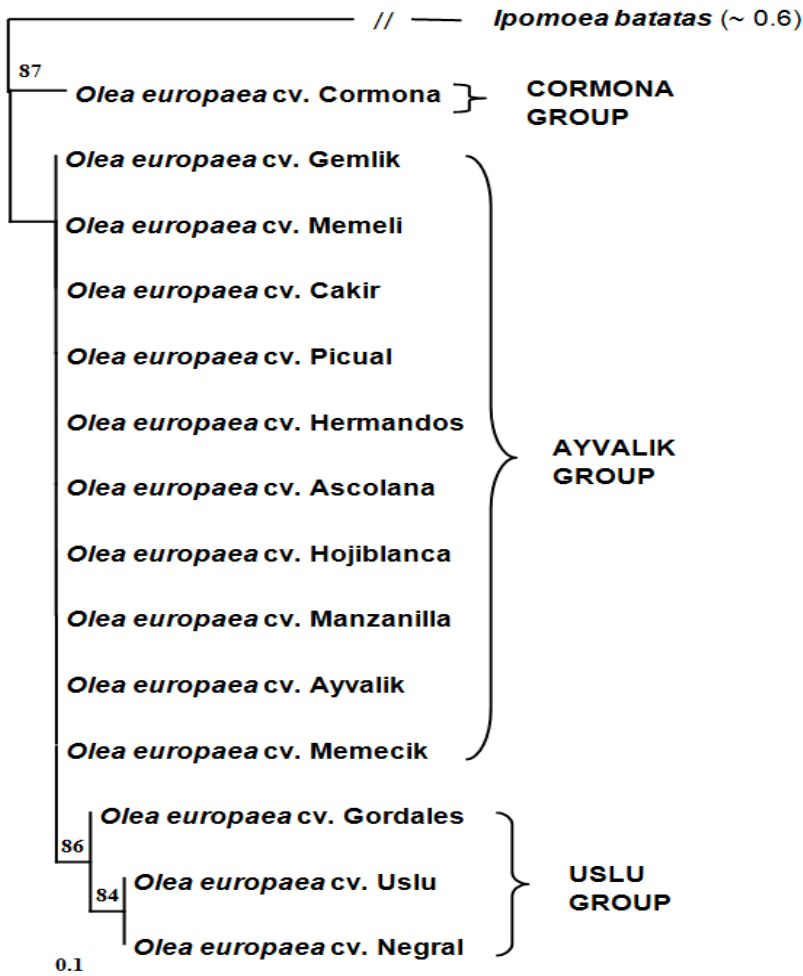


Şekil 3.51: Farklı bitkilere ait metallothionein proteinleri arasındaki polimorfizmi gösteren NJ ağacı

Şekil 3.50’ de da belirtildiği gibi OeMT proteini 13 adet korunmuş sistein rezidüsü bulundurmaktadır. Şekil 3.50 ve 3.51’ de *Salvia miltiorrhiza* MT2 ([ABR92329.1](#)), *Ilex paraguariensis* MT2 ([AFP93964.1](#)), *Plantago major* MT2 ([CAH59436.1](#)), *Aegiceras corniculatum* MT2 ([ABK59915.1](#)), *Gossypium hirsutum* MT2 benzeri protein ([AAV74186.1](#)), *Limonium bicolor* MT2 ([ABL10085.1](#)), *Camellia sinensis* MT2 ([ABD97258.1](#)), *Ipomoea batatas* MT2 ([ACJ05910.1](#)), *Citrullus lanatus* MT2 ([BAD26571.1](#)), *Fagus sylvatica* MT2 ([CAA10232.1](#)), *Posidonia oceanica* MT2 ([CAF31410.1](#)), *Solanum tuberosum* MT2 benzeri protein ([ABY21247.1](#)), *Pyrus communis* MT2 benzeri protein ([ADB03117.1](#)), *Pyrus pyrifolia* MT2 benzeri protein ([BAA96444.1](#)), *Silene paradoxa* MT2 benzeri protein ([AAO12852.1](#)), *Populus trichocarpa* MT2 benzeri protein ([ABK94874.1](#)) *Pisum sativum* MT2 ([BAD18383.1](#)), *Olea europaea* MT1 ([AFP49330.1](#)), *Aster tripolium* MT1 ([BAC57959.1](#)) ve *Oryza sativa* MT benzeri protein ([U18404.1](#)) gibi farklı bitkilerde bulunan metallothionein

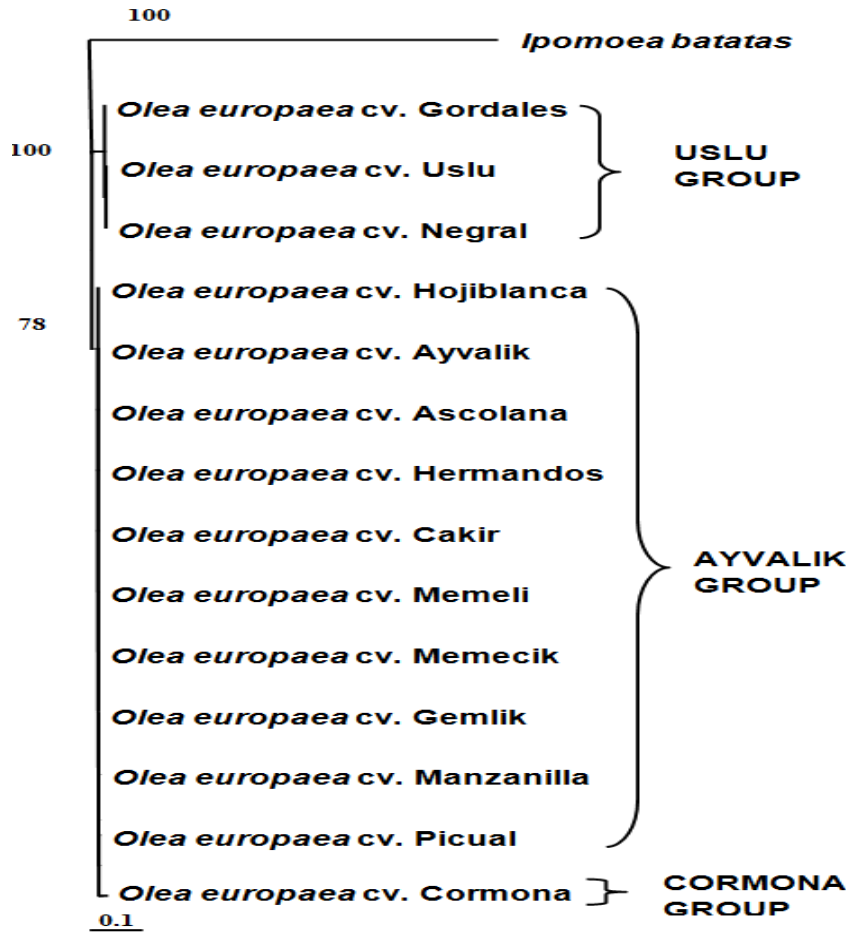
proteinleri arasında %44 ile %86 arasında benzerlik bulunmuş ve OeMT oproteinini aminoasit dizisi açısından en çok to *Ipomoea batatas* putatif metallothionin 2a proteinine benzer bulunmuştur.

Farklı zeytin çeşitleri arasında *OeMT2* geninin nükleotid dizisi açısından bir polimorfizm bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla yapılan çalışmaya ait NJ ağacı şekil 3.52’ de belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışılan çeşitler arasında *OeMT2* geni açısından temel olarak Cormona grubu (sadece *Olea europaea* cv Cormona’ nın bulunduğu), Uslu grubu (*Olea europaea* cv Uslu, *Olea europaea* cv Negral, *Olea europaea* cv Gordales) ve Ayvalık grubu (çalışılan diğer çeşitler) olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur.



Şekil 3.52: Zeytin çeşitleri arasında *OeMT2* geni nükleotid dizisi açısından görülen polimorfizmi gösteren NJ ağacı

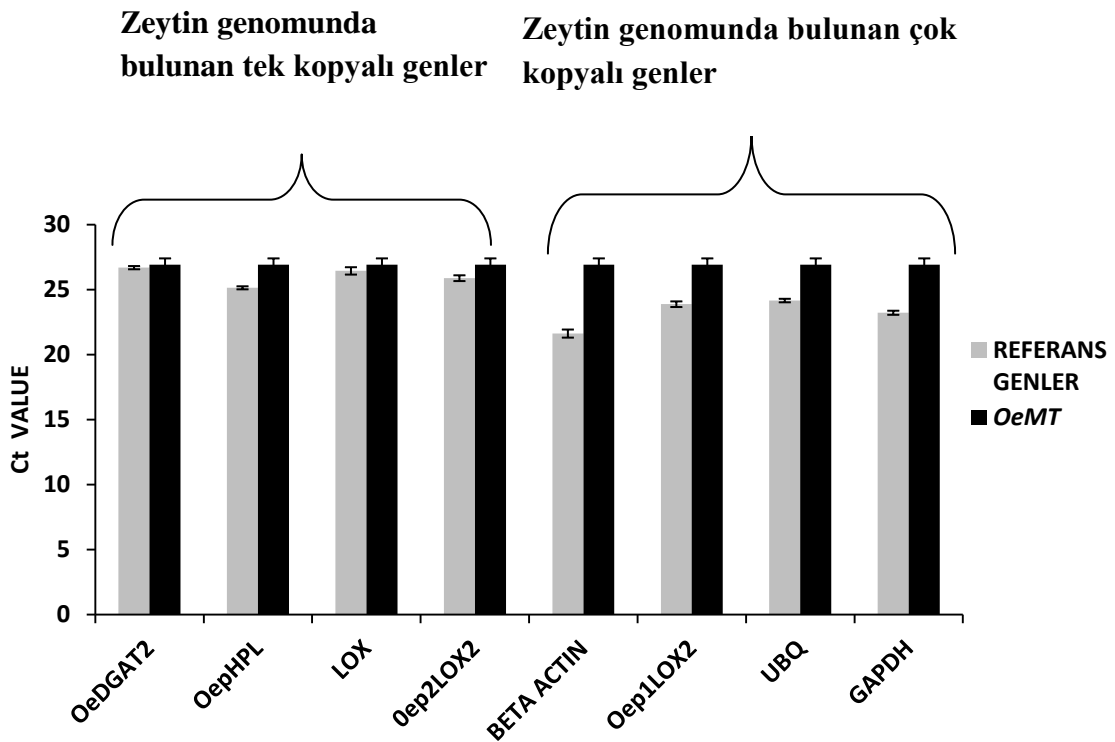
Farklı zeytin çeşitleri arasında OeMT2 proteinine ait amino asit dizisi açısından bir polimorfizm bulunup bulunmadığını belirlemek amacıyla elde ettiğimiz genomic DNA dizilerinden intronlar tespit edilip çıkartıldı. BioEdit biyoinformatik aracı kullanılarak [194] aminoasit dizileri elde edilerek yapılan çalışmaya ait NJ ağacı şekil 3.53’ te belirtilmiştir. Sonuç olarak çalışılan çeşitler arasında *OeMT2* geni açısından temel olarak Cormona grubu (sadece *Olea europaea* cv Cormona’ nın bulunduğu), Uslu grubu (*Olea europaea* cv Uslu, *Olea europaea* cv Negral, *Olea europaea* cv Gordales) ve Ayvalık grubu (çalışılan diğer çeşitler) olmak üzere 3 grup oluşturulmuştur.



Şekil 3.53: Zeytin çeşitleri arasında OeMT2 proteini açısından görülen polimorfizmi gösteren NJ ağacı

3.2.1.4 Anlık Gösterimli PZR ile *OeMT2* Geninin Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi

Anlık gösterimli PZR ile genomik kopya sayısının belirlenmesi daha önceki çalışmalarla güvenilirlik kazanmıştır [204, 205]. Yapılan çalışmalarda genel olarak daha önceden kopya sayısı belirlenmiş genler ile çalışılan genin Ct değerlerinin karşılaştırılarak [206]. Bu çalışmada kopya sayısı bilinen DGAT (GU357635), LOX (EU678670) HPL (EUS13350), Oep2LOX1 (EU513352), Oep1LOX2 (EU513353), OepUbq (AF429430.1), ubikitin (AF429430.1), GPDH (B2BGU9), β -aktin (Q8GTL3) kullanıldı. Bunlardan tek kopyalı olan genler; LOX [207], DGAT [208], HPL [209], Oep2LOX2 [210] çok kopyalı genler; Oep1LOX2 [210], GPDH [211], ubikitin [212] β -aktin [213]. Elde edilen Ct değerlerine oranlayarak çizilen grafikler Şekil 3.54' te görülmektedir



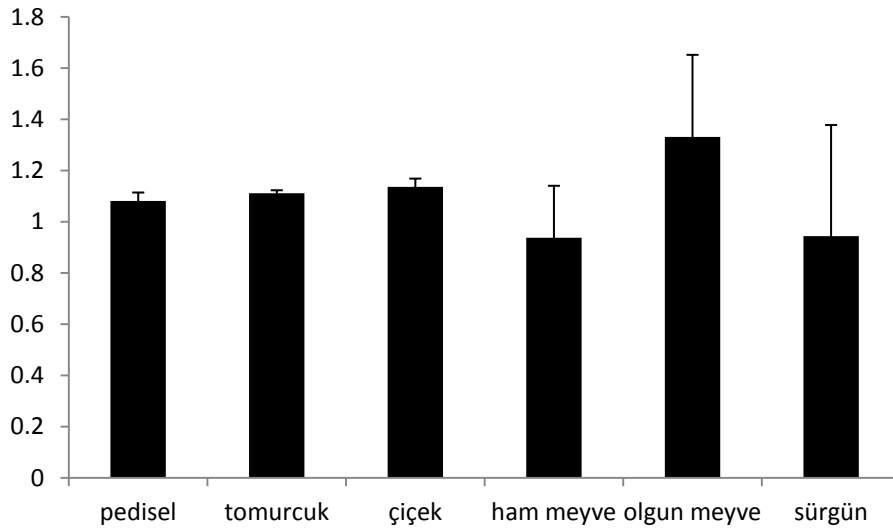
Şekil 3.54: *OeMT2* geninin kopya sayısının anlık gösterimli PZR ile belirlenmesi

Sonuç olarak, *OeMT2* geninin, referans genler dikkate alındığında zeytin genomunda tek kopya ile temsil edildiği düşünülmektedir.

3.2.2 *OeMT2* Geninin Fizyolojik Karakterizasyonuna Ait Bulgular

3.2.2.1 Anlık Gösterimli PZR İle Dokusal Ekspresyon Seviyelerinin Gözlenmesi

Farklı zeytin dokularından elde edilen cDNA' ların kalıp olarak kullanılmasıyla, tablo 3.20' de belirtilen primerler kullanılarak anlık gösterimli PZR ile dokular arası ekspresyon seviyeleri arasındaki farklılıklar şekil 3.55' te belirlenmiştir.



Şekil 3.405: *OeMT2* geninin farklı zeytin dokularındaki ekspresyon seviyelerinin anlık gösterimli PZR ile belirlenmesi

Sonuç olarak *OeMT2* geninin olgun meyvede diğer dokulara oranla daha fazla sentezlendiği fakat herhangi bir dokuya spesifik bir özellik göstermediği belirlenmiştir.

3.2.2.2 Zamansal Olarak *OeMT2* Geninin Ekspresyon Seviyesinin İncelenmesi

OeMT2 geninin zeytin ağacında gözlenen “var” yılı ve “yok” yılı üreme durumu açısından nasıl etkilendiği sorusunun cevaplandırmak amacıyla var yılı ve yok yılı durumlarında ağaçlardan alınan yaprak örneklerinden elde edilen cDNA' lar kalıp

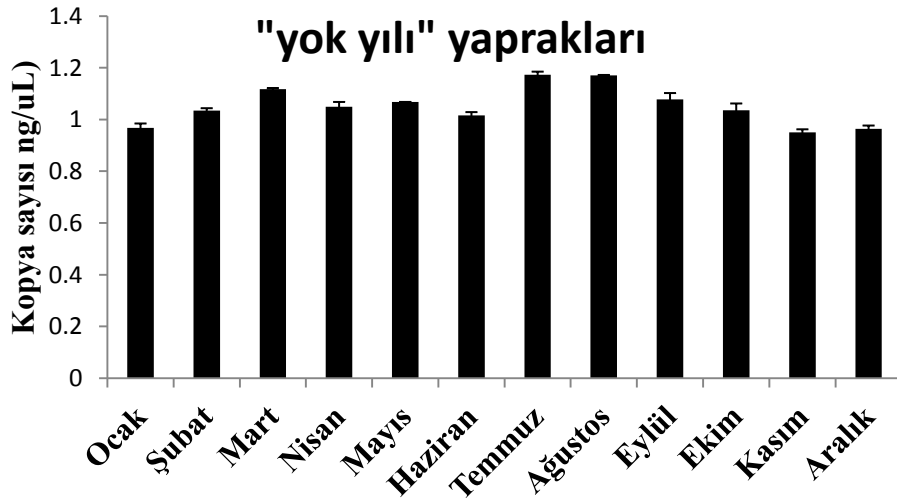
olarak kullanılarak tablo 3.20’ de belirtilen primerlerle anlık gösterimli PZR yapılmış ve ekspresyon profili araştırılmıştır.

OeMT2 geninin ekspresyon profili açısından “var” yılına ait yapraklardan alınan örnekler arasında bir farklılık bulunmadığı Şekil 3.56’ da gösterilmiştir.

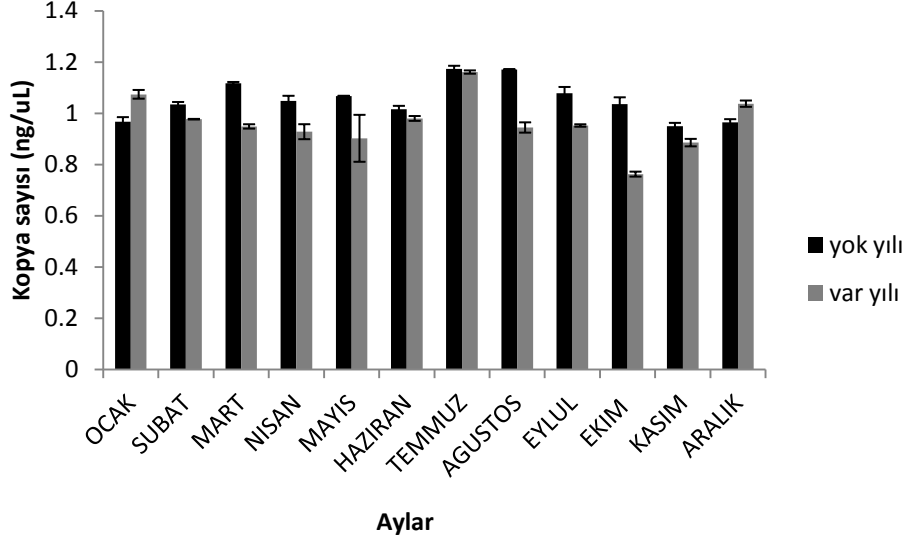


Şekil 3.416: *OeMT2* geninin “var” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği

OeMT2 geninin ekspresyon profili açısından “yok” yılına ait yapraklardan alınan örnekler arasında bir farklılık bulunmadığı Şekil 3.57’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.427: *OeMT2* geninin “yok” yılına ait yapraklarda anlık gösterimli PZR grafiği



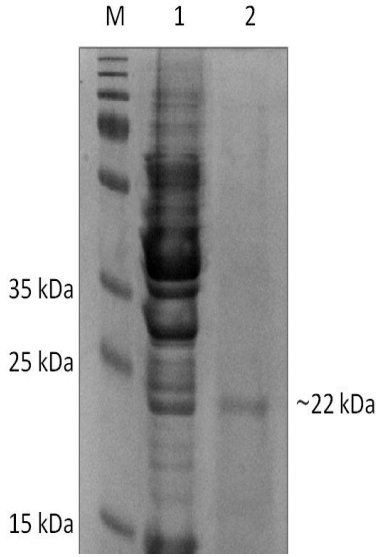
Şekil 3.438: *OeMT2* geninin ekspresyon seviyesinin "var" ve "yok" yıllarına ait kıyaslaması

Şekil 3.58’ de belirtilen “var “ ve “yok” yıllarına ait tüm aylarda alınan örneklerin bir arada gösterildiği grafik sonucu, *OeMT2* geninin periyodisite ile ilişkili olmadığını göstermektedir.

3.2.3 *OeMT2* Proteininin Fizyolojik Aktivitesi

3.2.3.1 *OeMT2* Proteininin Saflaştırılması

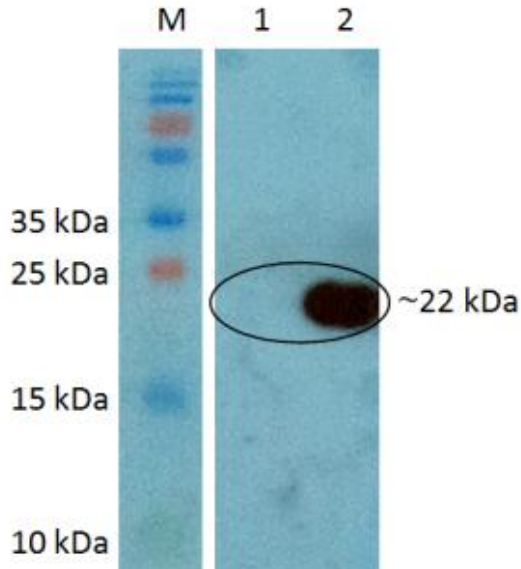
Ni-NTA affinite yöntemi ile *OeMT2* proteini saflaştırılmış, aktivite ölçümleri ve diğer biyokimyasal deneyler saf enzim üzerinden yapılmıştır. Şekil 3.59’ da saflaştırılmış *OeGlu* proteininin SDS PAGE jel elektroforezi görüntüsü bulunmaktadır.



şekil 3.449: Nİ-NTA y¼ntemi ile saflaştırılmış OeMT proteinine ait SDS PAGE elektroforezi, M; PageRuler Plus Prestained Protein Markır (10–260 kDa) Fermentas, 1; ham ekstrakt, 2; saflaştırılmış rekombinant OeMT2 proteini olacak şekilde y¼klenmiřtir.

Sonuç olarak OeMT2 proteininin etkin bir şekilde saflaştırıldığı, ve yaklaşık 22 kDa molek¼ler ağırlığa sahip olduğu SDS PAGE elektroforezi sonucu kanıtlanmıştır.

Proteinin varlığının ispatlanması amacıyla western blot yapıldı (şekil 3.60).



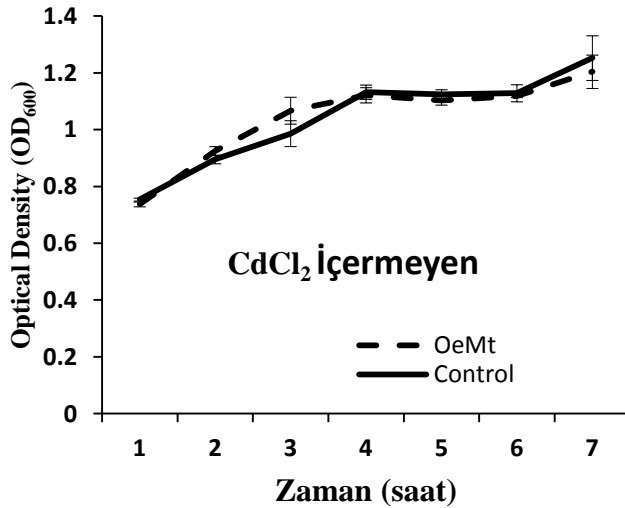
şekil 3.60: Saflaştırılmış OeMT2 proteinine ait western blot g¼r¼nt¼s¼, M: PageRuler™ Spectra Multicolor Broad Range Protein Markır (10–260 kDa) Fermentas, 1: OeMT proteininin ind¼klenmemiř kontrol¼, 2: saflaştırılmış OeMT protein olarak jele y¼klenmiřtir

Sonuç olarak OeMT2 proteini, his-tag antikoruna affinite göstermiş ve ifade edildiği ispatlanmıştır

3.2.3.2 OeMT2 Proteininin Fonksiyonunun Aydınlatılması

OeMT2 geninin klonlandığı PLATE 51 vektörü ve kontrol olarak ta kontrol plazmidinin transforme edildiği *E. coli* BL21 DE3 hücrelerinin buldukları besiyerine metal ekleyerek metal toleranslarının ölçülmesi amacıyla yapılan çalışmaya ait bakteri büyüme eğrilerini gösteren grafik şekil 3.61-3.63' te belirtilmiştir.

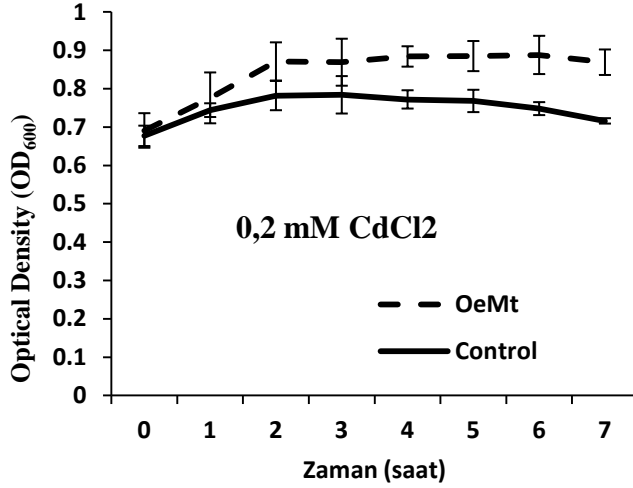
Metal içermeyen ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin büyüme eğrileri şekil 3.76' te belirtilmiştir.



Şekil 3.45: Metal içermeyen besiyerinde bakterilerin büyüme eğrisini belirten grafik

Şekil 3.61' de belirtilen grafikte; metal içermeyen ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin birbirine benzer büyüme eğrisi oluşturdukları gözlenmiştir.

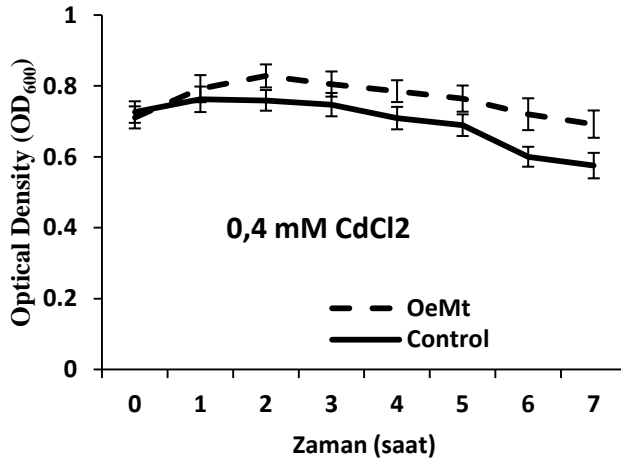
0.2 mM CdCl₂ içeren ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin büyüme eğrileri şekil 3.62' de belirtilmiştir.



Şekil 3.62: 0.2 mM CdCl₂ içeren besiyerinde bakterilerin büyüme eğrisine ait grafik

Şekil 3.62' de belirtilen grafikte; 0.2 mM CdCl₂ içeren ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin büyüme eğrilerinin birbirinden farklı olduğu, rekombinant bakterilerin metal içerikli ortama daha toleranslı oldukları, kontrol hücreleri büyümelerini durdururken rekombinant hücrelerin büyümeye devam ettiği gözlenmiştir.

0.4 mM CdCl₂ içeren ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin büyüme eğrileri şekil 3.63' te belirtilmiştir.

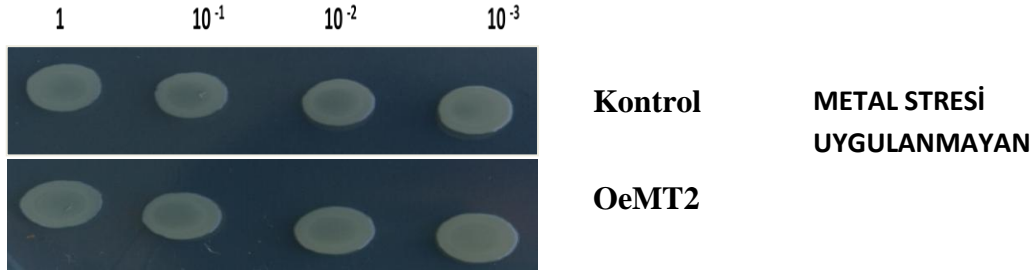


Şekil 3.63: 0.4 mM CdCl₂ içeren besiyerinde bakterilerin büyüme eğrisine ait grafik

Şekil 3.63' de belirtilen grafikte; 0.4 mM CdCl₂ içeren ortamda kontrol ve rekombinant bakterilerin büyüme eğrilerinin birbirinden farklı olduğu, rekombinant bakterilerin metal içerikli ortama daha toleranslı oldukları gözlenmiştir.

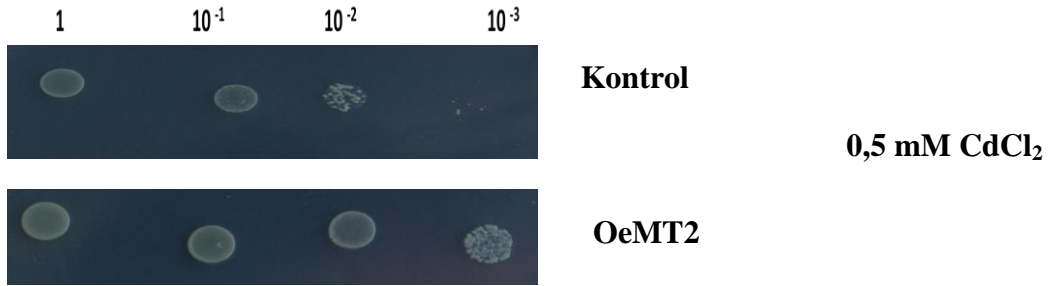
LB agar petrilere damlatılarak kurulup 12 saat sonra fotoğrafları çekilen metal içermeyen (şekil 3.79), 0,5 mM CdCl₂ (şekil 3.80), 1 mM CuSO₄ (Şekil 3.81) içeren

petri plaklarında yetiştirilmiş kontrol ve rekombinant bakterilere ait petri plak görüntülerine ait bulgulara göre; metal içermeyen ortamda her iki bakterinin de benzer büyüklükte koloni oluşturduğu gözlemlendi (şekil 3.64).



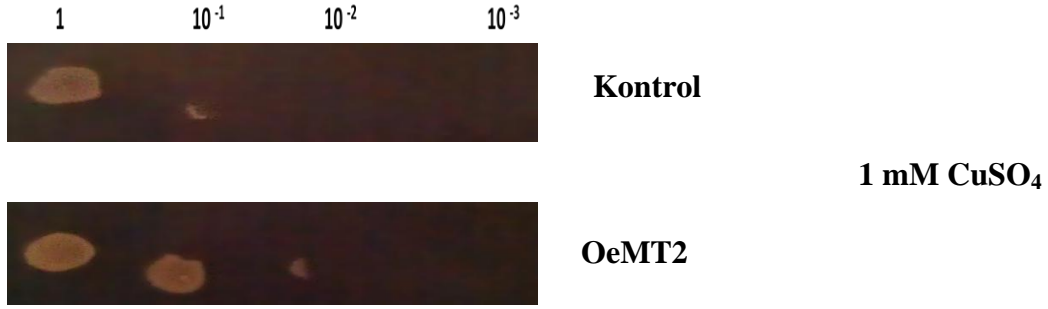
Şekil 3.64: Metal içermeyen katı besiyerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin petri görüntüsü

0.5 mM CdCl₂ içeren petri plaklarında yetiştirilmiş kontrol ve rekombinant bakterilere ait petri plak görüntülerine ait bulgulara göre; rekombinant bakterilerin belirtilen dilüsyon aralıklarında daha büyük koloni oluşturdukları gözlemlendi (şekil 3.65).



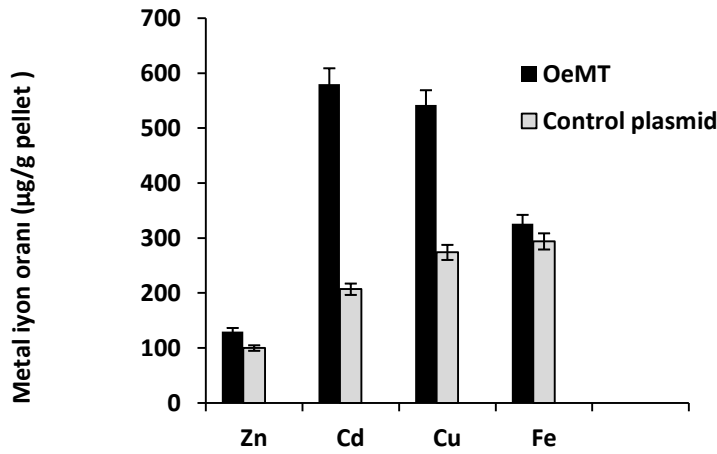
Şekil 3.465: 0.5 mM CdCl₂ içeren katı besiyerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin petri görüntüsü

1 mM CuSO₄ içeren petri plaklarında yetiştirilmiş kontrol ve rekombinant bakterilere ait petri plak görüntülerine ait bulgulara göre; rekombinant bakterilerin belirtilen dilüsyon aralıklarında daha büyük koloni oluşturdukları gözlemlendi (şekil 3.66).



Şekil 3.476: 1 mM CuSO₄ içeren katı besiyerinde kontrol ve rekombinant hücrelerin petri görüntüsü

OeMT proteininin, daha toleranslı olduğu kontrol plazmidinin (his tag içeren) transfrome edildiği rekombinant bakterilere nazaran ne kadar metal bağlayabildiğinin belirlenmesi için ICP (Optima-2000 DV, Perkin Elmer, USA). kullanılarak bakteri kuru ağırlıklarında bulunan metal içerikleri belirlendi ve şekil 3.67’ de OeMT proteininin sırayla; çinko, kadmiyum, bakır ve demir metallerine karşı olan bağlama kapasitesi gösterildi.



Şekil 3.67: ICP analizi sonucu elde edilen metal iyon içerikleri

Şekil 3.67’ de belirtilen grafikte çinko, cadmiyum, bakır ve demir gibi çeşitli ağır metaller arasında OeMT proteini en çok kadmiyum (1 gram bakteri pelletinde 550-600 µg) ve bakır (1 gram bakteri pelletinde 500-550 µg) metallerini bağlayabildiği ve kontrol grubuna nazaran 3 kat daha fazla metal tutabildiği, fakat demir ve çinko için ise kontrol grubundan her ne kadar fazla olsa da kayda değer bir kapasitesinin olmadığı belirlenmiştir.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

β -Glukozidazlar; prokaryot ve ökaryot canlıların her ikisinde de bulunan, glikozidik bağları parçalayan enzimlerdir [123]. *Olea europaea* L., Akdeniz' e özgü herdem yeşil bir ağaçtır [215]. Zeytin yağı; zeytin ağacının meyvesinden elde edilen ve diğer yağ çeşitlerinden içermeyen bir yağ tipidir [216]. Glukozidazlar, oleuropein sekonder metabolitinin glikozidik bağını kopararak, secoiridoid bileşiklerin açığa çıkmasını sağlar. Bu durum zeytin yağının acı tadı ile oldukça ilişkilidir [125]. Günümüzde zeytin β glukozidaz genine ait sadece bir cDNA dizisi gibi oldukça sınırlı bilgi bulunmaktadır (GeneBank Accession no. AY083162.1) [186].

Bu çalışma kapsamında zeytin β glukozidaz geni moleküler teknikler kullanılarak karakterize edilmiş, anlık gösterimli PZR ile dokusal, zamansal ve zeytin kültürbarları arasındaki ekspresyon seviyesi farkı tespit edilerek fizyolojik karakterizasyonu yapılmış ve rekombinant protein elde edilerek biyokimyasal özellikleri belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda zeytin β glukozidaz proteininde polar ve apolar aminoasitlerin de bulunduğu fakat apolar aminoasitlerin daha yoğun olduğu gözlenmiştir. Bu durum insan safrasında bulunan β glukozidaz proteininde olduğu gibi [217] çamda bulunan ksilem spesifik β glukozidaz proteinin de de apolar aminoasitler çoğunluktadır [218].

Zeytin β glukozidaz geninin 9 adet intron içerdiği tespit edilmiştir. Yaklaşık 5 kb uzunluğu bulunmaktadır. Arpa tohumunda bulunan *bgq60* β glukozidaz geni de yaklaşık 5 kb uzunluğunda olup 9 adet intron içermektedir [219]. *Zea mays* L. e *ZmBGLU* gen ailesinden *bglu 1* ve *bglu 2* genleri ise 11 adet intron içermektedir [220].

Zeytin β glukozidaz genine ait promoter bölgesinin tespiti için AIL-PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle genin 5' ucuna ait yaklaşık 804 bp uzunluğunda dizi elde edildi. Bu dizinin yaklaşık 300 nükleotidlik kısmı primerlerin ve dizinin kontrolü için cDNA ile karşılaştırılarak primerlerin özgünlüğü tespit edildi. Yapılan çalışmada dizinin zeytin β glukozidaz genine ait olduğu, olası TATA kutusunu bulundurduğu biyoinformatik araçlarla tespit edildi fakat promoter bölgesinin tamamı izole edilemedi.

Zea mays L. *ZmGlu1* genine ait karakterize edilmiş promotörün uzunluğu yaklaşık 1677 bp uzunluğundadır. *Arabidopsis thaliana*' dan izole edilen *AtBXL1* B-xylosidase genine ait promotörün uzunluğu ise yaklaşık 2 kb' dir [221].

B glukozidaz genlerine ait polimorfizm çalışmaları daha öncede birçok β glukozidaz geni için yapılmış ve polimorfizm çalışmaları için ayırt edici bir bölge olabileceği tespit edilmiştir [222-224]. Bu çalışmada 15 zeytin çeşidi, zeytin β glukozidaz geni içerisindeki polimorfizm açısından taranmış ve Ayvalık çeşidinin taranan örnekler arasında en fazla "Hojiplanca" çeşidine yakınlık gösterdiği tespit edilmiştir.

Zeytin çeşitleri arasında zeytin β glukozidaz geni açısından polimorfizm tespiti çalışmasında ise Ayvalık çeşitlerine en yakın "Domat", "Picual" ve "Koroneiki" çeşitleri olduğu belirlenmiştir. Ayrıca "Ayvalık " çeşidi klonları da tek bir dal oluşturarak ağacın güvenilirliğini teyit etmiştir.

Zeytin β glukozidaz geninin moleküler karakterizasyonu kapsamında genin zeytin genomunda kaç kopya ile temsil edildiği aydınlatılmak istenmiştir. Bu amaçla radyoaktif prob kullanarak Southern blot deneyleri Cardiff Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiş fakat sonuçlandırılmamıştır. Anlık gösterimli PZR reaksiyonu ile referans genler kullanılarak yaptığımız çalışma ile zeytin β glukozidaz geninin zeytin genomunda 1 kopya ile temsil edildiği sonucuna ulaşıldı. B glukozidaz genleri hakkında yapılan çalışmalarda genin organizmada kaç kopya ile temsil edildiği hakkında netlike bulunmazken, *Catharanthus roseus* striktozidin β -glukozidaz geninde olduğu gibi 1 kopyalı [225], pamuk GhBg geninde olduğu gibi 2 kopyalı [226] ya da fare glukozidaz 1 geninde olduğu gibi çok kopyalı olabilir [227].

Zeytin β glukozidaz genini fizyolojik olarak karakterize etmek amacıyla anlık gösterimli PZR reaksiyonları kuruldu. Zeytin bitkisinde gözlenen "var yılı" ve "yok yılı" meyve durumları üzerinde bir etkisinin bulunup bulunmadığı tespit edildi. Sonuç olarak zeytin β glukozidaz geninin zeytin yapraklarında hem var yılında hem de yok yılında sentezlendiği tespit edildi.

Anlık gösterimli PZR ile zeytin bitkisine ait farklı dokulardaki ekspresyon seviyeleri tespit edildi ve zeytin β glukozidaz geninin zeytin bitkisinin hemen hemen

tüm dokularında eşit seviyede ifade edildiği fakat en yüksek ekspresyon seviyesinin meyvede olduğu aydınlatıldı.

Zeytin β glukozidaz geninin en çok meyvede ifade edilmesi ile bu genin meyve oluşumunun hangi aşamasında ifade edildiğini, genin ifadesinin meyvede β glukozidaz enzimi tarafından zeytinde yoğun olarak bulunan oleuropein maddesinin parçalanması sonucu açığa çıkan fenolik maddelerin yoğunluğu ile ilişkisinin tespiti amacıyla zeytinin ham olduğu temmuz ayından meyvenin olgunlaşma aşaması olan aralık ayına kadar toplanan örnekler incelendi. Sonuç olarak zeytin β glukozidaz geninin en yüksek meyvenin en olgun olduğu kasım ve aralık ayı içerisinde en yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu belirlendi. Bu durum zeytinde bulunan fenolik maddelerin incelendiği diğer çalışmalarla da desteklenmektedir. Zeytin meyvesinin gelişiminin ilk basamaklarında gelişim için gereklilik olduğu Amiot ve arkadaşları tarafından belirtilmiştir [228]. Gelişimin sonlarına doğru olan olgunlaşma periyodunda ise oleuropein maddesinin miktarının azaldığı, onun türevleri olan fenolik maddelerin ise arttığı gözlenmiştir [167, 229-231]. Bu sonuç bize zeytin β glukozidaz geninin oleuropeinin parçalanmasında aktif olarak görev aldığını, meyvenin olgunlaşmaya başlamasıyla mevcut oleuropeinin parçalanarak türevlerinin oluşturulmasında rol oynadığını göstermektedir. Meyvenin olgunlaştığında oleuropeinin miktarının zeytin β glukozidaz tarafından parçalanması sonucu azalması zeytin yağının acı tadı ile ilişkili olduğundan zeytin β glukozidazının aktivitesi de Ayvalık çeşidinden elde edilen sofralık zeytin ve zeytin yağının ticari önemi açısından değer kazanmaktadır.

Farklı zeytin çeşitleri arasında anlık gösterimli PZR ile yapılan ekspresyon seviyelerinin tespiti sonucunda ise zeytin beta glukozidaz genin (mRNA'sının) çalışılan çeşitler arasında en yüksek ifadesinin Gemlik çeşidinde olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

OebGlu geninin biyokimyasal karakterizasyonu amacıyla *OebGlu* enzimini kodlayan cDNA dizisi NCBI veribankasından temin edilmiştir (Kayıt no: AY083162.1). Protein ilk olarak *Pichia pastoris*' te ifade edilmek istendi. Yapılan çalışmalar sonucu klonlamanın başarılı olduğu fakat protein üretiminin başarısız olduğu gözlemlendi. Bu sonucun, ZBG geninin sık kullanılmayan kodonlar bulundurması nedeniyle olabileceği düşünüldü. Düşük olasılıklı kodonlar protein ekspresyonu için kullanılan organizmalar tarafından tam olarak ifade edilemeyerek ekspresyonun başarı ile sonuçlanmamasına sebep olmaktadır [232].

Pichia pastoris' te protein üretiminin başarı ile sonuçlanmaması nedeniyle bir başka organizma olarak *Echerichia coli* denendi. *Echerichia coli* ile protein üretimi amacıyla PET21a, PET21b ekspresyon vektörlerine klonlama çalışmaları yapıldı. Fakat klonlamalar her denemede hücre ölümleriyle sonuçlanarak başarısız oldu. Bu sonuç OebGlu proteininin *Echerichia coli* için zehirli olabileceğini göstermiştir [233].

OebGlu proteininin *Echerichia coli* için zehirli olabileceği nedeniyle bu tip proteinler için geliştirilmiş bir sistem olan aLICator™ LIC Cloning and Expression Set 1 (Fermentas Vilnius, Lithuania Kat. No: 1271) kiti kullanılarak çalışmaya devam edildi. N-terminal ucunda histidin kuyruğu bulunan pLATE51 vektörüne klonlama yapıldı. *E. coli* BL21DE3 suşu kullanılarak ekspresyon çalışmalarına devam edildi. Western blot ile proteinin işaretlenmesi denendi. Kontrol olarak membranda bulunan grubun işaretlenmesi fakat OebGlu proteininin işaretlenmemesi protein üretiminin başarı ile sonuçlanmadığını gösterdi. Bunun üzerine sık olarak kullanılmayan kodonları içeren proteinler için daha uygun olan *E. coli* RosettaGami2 PlysS suşu kullanıldı. Western blot ile yapılan spesifik işaretleme ile proteinin varlığı tespit edildi [234, 235].

İfade edilen OebGlu eproteini yaklaşık olarak 67 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğu western blot ile ispatlanmıştır. Yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucu OebGlu proteininin 62,89 kDa molekül ağırlığında olduğu tespit edilmiştir. Rekombinant proteinlerin işaretlenmesinde ve SDS PAGE jel elektroforezi ile yürütüldüklerinde bu tür sapmaların olabileceği daha önce yapılan çalışmalar tarafından kanıtlanmıştır [236, 237].

Rekombinant olarak ifade edilen OebGlu proteini Ni-NTA affinite yöntemi ile saflaştırıldı, saflaştırılan protein ve saf protein SDS PAGE jel elektroforezi ile teyit edildi. Yapılan elektroforez sonucu proteinin uygun biçimde saflaştırıldığı, moleküler ağırlığının Western blot ile işaretlenen 67 kDa' na denk geldiği belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen yaklaşık 67 kDa' luk ağırlığın daha önce Kara ve arkadaşları tarafından saflaştırılan zeytin β glukozidaz enzimi ile benzerlik göstermektedir [126]. Farklı organizmalara ait β glukozidaz enzimlerinden 1 *Rhynchophorus palmarum*' dan izole edilen β glukozidaz enziminin 60 kDa [238], *Trichoderma reesei*' den izole edilen fungal bir glukozidaz olan BGLU1 enziminin 117 kDa, [239], Soya fasülyesinden izole edilen β glukozidaz proteininin 75kDa [240], *Orobanche minor* Sm β glukozidaz enzimi ise 33 kDa [241] olarak tespit edilmiştir.

OebGlu enziminin Ni NTA yöntemiyle saflaştırma çalışmaları devam ederken aynı zamanda kontrol amacıyla denemesi yapılan hidrofobik jel ile saflaştırma yöntemi için yapılan amonyum sülfat çöktürme aralığı çalışmamızda %30-70 olarak bulunmuş ve saflaştırma işlemlerinde ham ekstrakta önce %0-30, daha sonar da %30-70 amonyum sülfat tuz çöktürmesi uygulanmıştır. Yapılan çalışmalarda β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için amonyum sülfat çöktürme aralıkları farklı kaynaklarda eğişik aralıklar tespit edilmiştir. Örneğin β -glukosidaz enziminin saflaştırılması için portakal meyvesi için %75 [242], kiraz meyvesi için %30-70 *Rauvolfia serpentina* strigtozidin β glukozidazında %30-75 [243], Kara ve arkadaşları tarafından zeytin meyvesinden saflaştırılan β glukozidaz enzimi ise %0-50 amonyum sülfat çöktürmesi aralıklarının uygulandığı görülmektedir [126].

Ni NTA yöntemi ile saflaştırılan protein üzerinden devam edilen biyokimyasal karakterizasyon çalışmalarında; OebGlu enziminin göreceli aktivitesi belirlenmiş, en yüksek aktiviteyi pNPGlu substratına gösterdiği tespit edilmiştir. oNPGal, oNPGlu, pNPGal substratlarına karşı aktivite göstermemiştir. Kara ve arkadaşları tarafından saflaştırılan zeytin β glukozidaz proteini de benzer olarak pNPGlu sentetik substratına karşı en yüksek aktivite göstermiştir [126]. Vanilya [106], portakal [244] ve pirinç [245] gibi farklı bitkilerden izole edilen β glukozidazlarda da benzer sonuç gözlenmiştir. Kiraz bitkisinden saflaştırılan β glukozidaz enzimi ise farklı olarak oNPGlu substratına yüksek affinite göstermiştir [242].

OebGlu enziminin 4-MUG substratına karşı olan ilgisi native jel elektroforezi ile belirlenmiştir. Benzer sonuç Kara ve arkadaşları tarafından zeytin meyvesinden saflaştırılan β glukozidaz enziminde de bulunmuştur [126].

OebGlu enziminin karakterizasyon çalışmalarında enzimin optimum sıcaklığı 37 °C olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç daha önce zeytin meyvesinden saflaştırılan β glukozidaz enzimi ile örtüşmektedir [126].

Optimum pH aralığının belirlenmesi için yapılan çalışmada OebGlu enziminin en yüksek aktiviteyi pH: 8.0' da gösterdiği belirlenmiştir. Spesifik olmayan β glukozidaz enzimleri için en uygun pH aralığı olarak pH: 4-5 arası olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır [246].

Kinetik parametrelerin belirlenmesi çalışmalarında saflaştırılmış recombinant enzimle *p*NPGlu substratı için K_m değeri 5.14 mM ve V_{max} değeri 25.25 EU olarak bulunmuştur. Kara ve arkadaşları tarafından zeytin meyvesinden saflaştırılan β glukozidaz enzimi için ise bulunan K_m değeri 2.2 mM, V_{max} değeri ise 370.37 EU olarak hesaplanmıştır [126]. Rekombinant olarak sentezlenen OebGlu enziminin tabii enzime oranla *p*NPGlu substratına karşı olan düşük affinitesi, enzimi kodlayan cDNA' da bulunan sık kullanılmayan kodonlardan ve *E. coli*' de ifade edilmesinden kaynaklanan katlanma ve 3 boyutlu yapısındaki eksikliklerden dolayı olduğu düşünülmekte, enzimin doğal substratı olan oleuropeine karşı çok daha yüksek affinite göstereceği tahmin edilmektedir.

Araştırmamızda β -glukozidaz enzimlerinin genel inhibitörlerinden δ -glukonolaktonun *p*-NPG substratı varlığındaki zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösterdiği ve enzim aktivitesini % 50 oranında azaltan konsantrasyonu olan IC_{50} değerinin 2.6 mM olduğu tespit edilmiştir Tabii zeytin β glukozidaz enzimi için ise bu değer Kara ev arkadaşları tarafından 0.227 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda recombinant enzimin tabii olan β glukozidaz enzimine oranla çok daha yüksek δ -glukonolakton konsantrasyonda inhibe olduğu belirlenmiştir. Ayrıca farklı çalışmalarda bu değer *Pichia pastoris* β glukozidaz enzimi için 0,12 mM [247], soyada ise çok etkili bir inhibitör olmadığı, 24 mM gibi yüksek bir değer olduğu belirlenmiştir [240].

β -glukozidaz enziminin genel inhibitörlerinden olan glukozun zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldığında IC_{50} değerinin 2.14 mM olduğu bulunmuştur. β -glukozidaz enziminin genel inhibitörleri olarak bilinen glukoz ve δ -glukonolakton maddelerinin zeytin β -glukozidaz enzim aktivitesi üzerine etkileri karşılaştırıldığında her iki maddenin de enzimi inhibe ettiği fakat glukozun enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisinin δ -glukonolaktona göre çok az da olsa daha kuvvetli olduğu belirlenmiştir. Kara ve arkadaşları tarafından saflaştırılan tabii toplam zeytin β glukozidaz enzim aktivitesi üzerine glukozun etkisi araştırılmış ve IC_{50} değeri 111.96 olarak bulunmuştur [126]. Bu sonuç, recombinant OEBGLU enzimi sonuçları ile örtüşmemekte ve rekombinant enzimin inhibisyon özelliklerinin daha farklı olduğunu göstermektedir.

OebGlu enzim aktivitesi üzerine Cu, Ni, Mg, Mn, Zn, Cd ve Fe'in etkisi araştırıldığında demir ve mangan haricindeki kullanılan diğer ağır metallerin enzimi inhibe ettiği görülmüştür. *p*NPGLu substratı varlığındaki enzim aktivitesi üzerine yapılan çalışmalarda Mn ve Fe'in enzim aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Kara ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Fe' nin tabii toplam zeytin β glukozidaz enzim aktivitesini arttırdığı tespit edilmiş fakat Mn' nin etkisi hakkında bir bilgi verilmemiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, Mn ve Fe içeren bileşiklerin zeytin tarımında β -glukozidaz enzim aktivitesi açısından zirai ilaç olarak uygun olabileceğini göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında karakterizasyonu yapılan diğer gen ise metalotiyonein proteinini kodlayan, daha önce Dündar ve arkadaşları tarafından cDNA dizisi elde edilen [248] ve moleküler ve fonksiyonel özellikleri belirlendikten sonra *OeMT2* olarak isimlendirilen zeytin metalotiyonein genidir.

OeMT2 proteini 83 adet amino asitten oluşmaktadır ve moleküler ağırlığı 8.4 kDa olarak belirlenmiştir. Farklı bitkilere ait diğer metalotiyonein tip 2 proteinlerinden *Colocasia esculenta* CeMT2b proteini 84 amino asitten oluşmakta ve 8,4 kDa ağırlığındadır [129], *Silene nicaeensis* SnMT2 proteini ise 79 adet amino asitten oluşmakta ve 7,78 kDa ağırlığındadır [249]. *OeMT2* proteini amino asit benzerliklerine göre farklı bitkilere ait metalotiyonein proteinleri ile kıyaslandığında en fazla *Ipomoea batatas* MT2 proteinine benzediği görülmektedir.

OeMT2 proteininin aminoasit dizisi 13 adet sistein rezidüsü içermektedir. *Quercus suber* L.' den izole QsMT proteini 14 adet [250], *Colocasia esculenta* CeMT2b proteini 15 adet [129], *Musa acuminata* MT3 proteini ise 10 adet [236] sistein rezidüsü içermektedir.

Yaptığımız çalışma; *OeMT2* geninin 2 adet intron ve 3 adet ekzon içerdiğini aydınlatmıştır. Farklı metalotiyonein proteinlerini kodlayan genler ile ilgili yapılan çalışmalarda pirinç [251, 252], *Elsholtzia haichowensis* [253] ve pamuk metalotiyonein genlerinde de iki adet introna rastlanmıştır [254].

MT proteinlerinin farklı ekosistemlerdeki ağır metallerin tespiti için biyolojik işaret olarak kullanılması daha önce yapılan çalışmalar tarafından aydınlatılmıştır. [255,

256] *CgMT1* geninin varlığı ve polimorfizmi bu çalışmalara örnek olarak gösterilebilir [255]. *CgMT4* geni de benzer şekilde ağır metal varlığının tespiti için yeni bir genetik işaretçi olarak belirlenmiştir [256]. Yabani pirinç *O. rufipogon* metalotiyonein genleri üzerine yapılan bir çalışmada, MT2 geninin çalışmada kullanılan diğer 4 genden (MT1, MT2, MT5 ve MT6) daha fazla DNA varyasyonu içerdiği tespit edildi [252]. Zeytin çeşitleri arasında yapılan polimorfizm çalışması sonucu çalışılan örnekler 3 grup oluşturmuştur. Bu çalışmada *OeMT2* geninin de polimorfik bir gen olduğu ve çalışmada kullanılan çeşitler arasında *Olea europaea* L cv. Cormona' nın en fazla DNA varyasyonuna sahip olduğu aydınlatıldı. Bu üç gruba mensup birer çeşide ait oluşturulan 3 boyutlu protein yapıları da yine farklılık göstermektedir. Uslu, Gordales ve Negral çeşitlerinden oluşan Uslu grubunda 3 adet β -tabakası, 1 α -heliks ve 2 disülfid bağı, Cormona grubunda (tek çeşit) 1 β -tabakası, 3 α -heliks ve 2 disülfid bağı ve Ayvalık grunda ise (çalışılan çeşitlerin diğerleri), 2 β -tabakası, 1 α -heliks ve 4 disülfid bağı bulundurmaktadır. Daha önceki çalışmalarda 3 boyutlu yapıları aydınlatılan metalotiyonein proteinleri de benzer şekilde α -heliksler ve β -tabakalar bulundurmaktadır [249, 257-260]. Bu sonuç bize zeytin OeMT proteininin, her ne kadar çeşitler arasında yapısal çeşitlilik gösterse de diğer metalotiyonein proteinleri ile kıyaslandığında özgün bir yapısının bulunmadığını göstermiştir.

Anlık gösterimli PZR analizleri genlerin genomik kopya sayılarının belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır [204, 205, 261]. Bu çalışmada Anlık gösterimli PZR analizi ile *OeMT2* geninin genomik kopya sayısı belirlenmiştir. Elde edilen veriler *OeMT2* geninin zeytin genomunda tek bir kopya ile temsil edildiği düşünülmektedir. Farklı bitkilere ait metalotiyonein tip II genlerinden *SbMT2* geni de benzer şekilde halofit ve sukulent bir bitki olan *Salicornia brachiata* genomunda tek kopya ile temsil edildiği belirtilmiştir [156].

Bitkilerde bulunan tip II metalotiyonein genellikle yaprak, gövde ve çiçek gibi bitkinin toprak üstü yapılarında ifade edilir [130, 141, 262]. Yaptığımız çalışmada anlık gösterimli PZR analizi ile *OeMT2* geninin konstitutif olarak bitkinin analiz edilen tüm yapılarında (yaprak, pedisel, meyve, tomurcuk ve çiçek) hemen hemen benzer oranda ifade edildiği, zeytin bitkisinde gözlenen “var yılı” ve “yok yılı” meyve durumunun bu genin ifade edilmesinde etkili bir parameter olmadığı ispatlanmıştır [248].

Bitkilerde bulunan Tip II metalotiyonein proteinleri daha önce yapılan çalışmalarda *E. coli*' de füzyon proteinler erolarak ifade edilmesi sağlanmıştır [133, 139, 250, 253]. Bu kapsamda OeMT2 proteini histidin kuyruğu (His-tag) eklenerek füzyon protein olarak *E. coli*' de ifade edilmesi sağlandı. Yapılan western blot ve SDS-PAGE sonuçlarına göre yaklaşık 22 kDa moleküler ağırlığında olduğu belirlendi. Biyoinformatik araçlar kullanılarak hesaplanan 8.4 kDa olan moleküler ağırlığı ile olan bu fark [194], metalotiyonein proteinlerinin SDS analizlerinde sıklıkla karşılaşılan bir durum olduğu yapılan literature araştırmalarında tespit edilmiştir [236, 237].

Ağır metale maruz kalma durumunda organizmalarda metalotiyonein ekspresyonunun arttığı araştırmacılar tarafından belirtilmiştir [263]. Genel olarak bitkilerde bulunan tip II metalotiyonein proteinlerinin, yapılan literatur araştırmasında bakır ve kadmiyumun bağlanması, oksidatif stress ve detoksifikasyon ile bağlantılı biyolojik fonksiyonlarının olduğu belirlenmiştir [249, 250, 257, 263]. Aralarında gösterdikleri homolojiye rağmen, farklı bitkilerde bulunan metalotiyonein proteinlerinin ekspresyonunun metal ile muameleye verdikleri cevap bitki türleri arasında farklılık göstermektedir [264]. *Quercus suber* tip II metalotiyonein proteini ile yapılan bir çalışmada MT2 proteininin bakır ve çinkoyu bağlayabildiği tespit edilmiştir [250]. Bu çalışmada, OeMT2 proteinini ifade edilmesi sağlanan rekombinant *E. coli* hücreleri kullanılarak bakterilerin ağır metal içeren ortama gösterdikleri direnç ölçülmüş, ve OeMT2 proteininin bakır ve kadmiyum metallerini etkin bir şekilde bağlayabildiği fakat çinkoya karşı böyle bir aktivite göstermediği belirlenmiştir. ICP analizi sonuçları aynı şekilde OeMT2 proteininin bakır ve kadmiyum metallerini etkin bir şekilde bağlayabildiği fakat çinkoya karşı böyle bir aktivite göstermediği sonucunu desteklemiştir.

Son yıllarda, biyosorpsiyon (biyoemilim) çalışmaları oldukça önem kazanmıştır. Bu çalışmalarda ucuz, ölü yada canlı mikrobiyal biyokütle endüstriyel atık sularında uygun fiyatlı ve özgün olmalarından dolayı tercih edilmektedir [175-177]. İmmobilize edilmiş biyokütleden ağır metali uzaklaştıran sistemin oluşturulması, metal bağlayıcı peptide barındıran hücre ya da hücre kalıntılarının uygun bir matrikse bağlanmasıyla gerçekleştirilir [177]. Metallerin uzaklaştırılması için kullanılan biyokütle olarak bakteri, alg, mantar ve maya gibi bir çok canlıdan faydalanılmıştır [178-182]. Bu kapsamda yapılan çalışmalardan ye klonlanan insan metalotiyonein II genini ifade etmesi

için kullanılan recombinant *E. coli* hücreleri, biyosorbent olarak kullanılmış ve yüksek konsantrasyonda kadmiyumu endüstriyel atık suda etkin bir şekilde bağlamıştır [184]. Romeyer ve arkadaşları [185] *Neurospora crassa* metalotiyonein proteinini ifade eden *E. coli* hücrelerinin kadmiyumu etkin bir şekilde bağladığı rapor edilmiştir.

Bu sonuçlar, daha önce bitki metalotiyonein proteinleri ile yapılan ağır metal absorpsiyon çalışmaları ile benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında, metalotiyonein proteinleri; bitkilerde ve diğer canlılarda bulunan en iyi karakterize edilmiş metal bağlayıcı ligandlar olarak nitelendirilebilir [145, 250, 257, 258, 265].

5. KAYNAKLAR

- [1] Zamora, R., Alaiz, M., and Hidalgo, F.J., "Influence of Cultivar and Fruit Ripening on Olive (*Olea Europaea*) Fruit Protein Content, Composition, and Antioxidant Activity", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4267-4270, (2001).
- [2] Besnard, G., Khadari, B., Navascués, M., Fernández-Mazuecos, M., El Bakkali, A., Arrigo, N., Baali-Cherif, D., Brunini-Bronzini de Caraffa, V., Santoni, S., Vargas, P., and Savolainen, V., "The Complex History of the Olive Tree: From Late Quaternary Diversification of Mediterranean Lineages to Primary Domestication in the Northern Levant", *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756), (2013).
- [3] Hamilakis, Y., "Wine, Oil and the Dialectics of Power in Bronze Age Crete: A Review of the Evidence", *Oxford Journal of Archaeology*, 15(1), 1-32, (1996).
- [4] Principe, D.V., *Dünya Zeytin Ansiklopedisi*, Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, (1998).
- [5] Vossen, P., *Organic Olive : Production Manual* , Oakland, University of California Agriculture & Natural, (2007).
- [6] Koca, N., "Çanakkale’de Zeytin Yetiştiriciliğinin Coğrafi Esasları (The Geographical Principals of Olive Cultivation in Canakkale)", *Marmara Coğrafya Dergisi*, 9, 119-138, (2004).
- [7] Breton, C.M., Warnock, P., and Bervillé, A.J., *Origin and History of the Olive*, (2012).
- [8] Besnard, G. and Bervillé, A., "Multiple Origins for Mediterranean Olive (*Olea Europaea* L. *ssp. europaea*) Based Upon Mitochondrial DNA Polymorphisms", *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 323(2), 173-181, (2000).
- [9] Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., and Villemur, P., "Cultivated Olive and Oleaster: Two Very Closely Connected Partners of the Same Species (*Olea Europaea*). Evidence from Enzyme Polymorphism", *Boccone*, 7, 39-42, (1997).
- [10] Özkaya, M., Tunalıoğlu, R., Eken, Ş., Ulaş, M., Tan, M., Danacı, A., İnan, N., and Tibet, Ü., "Türkiye Zeytinciliğinin Sorunları ve Çözüm Önerileri", *TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi*, 11-15, (2010).
- [11] Kaplan, M. and Karaöz Arihan, S., "Antik Çağdan Günümüze Bir Şifa Kaynağı Zeytin ve Zeytin Yağı Halk Tıbbında Kullanımı", *VIII.Milletlerarası Türk Halk Kültürü Kongresi*, İzmir, (2011).

- [12] Tunalıoğlu, R. Türkiye'de Zeytincilik ve Pazarlama Politikaları 2000-2010, *Tarım 2015 Zeytin ve Zeytinyağı Sempozyumu*, Yaşar Üniversitesi, (2009).
- [13] Aktas, E., "Improvements in Olive Production and Canakkale", *MPRA Paper*, 28833, 1-12, (2011).
- [14] Zohary, D., Frankel, O., and Bennett, E., *Centres of Diversity and Centers of Origin*, 33-42, (1970).
- [15] Filippou, M., Fasseas, C., and Karabourniotis, G., "Photosynthetic Characteristics of Olive Tree (*Olea Europaea*) Bark", *Tree physiology*, 27(7), 977-984, (2007).
- [16] Schneider, G. and Lobenberg, L., "Morphology and Anatomy of Olive Tree Leaves", *Planta Med*, 22(2), 117-21, (1972).
- [17] Kutlu, E. and Şen, F., "Farklı Hasat Zamanlarının Gemlik Zeytin (*Olea Europea* L.) Çeşidinde Meyve Ve Zeytinyağı Kalitesine Etkileri ", *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 48(2), 85-93, (2011).
- [18] Pinney, K. and Polito, V.S., "Flower Initiation in "Manzanilla" Olive.", *Acta Hort.*, 286, 203-206, (1990).
- [19] Tombesi, A., "Olive Fruit Growth and Metabolism", *Acta Hort.*, 356, 225-232, (1994).
- [20] Al-Shdiefat, S.M. and Qrunfleh, M.M., "Alternate Bearing of the Olive (*Olea Europaea* L.) as Related to Endogenous Hormonal Content", *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 4(1), 12-26, (2008).
- [21] Goldschmidt, E.E., "Regulatory Aspects of Alternate Bearing in Fruit Trees.", *Italus Hortus*, 12, 11-17, (2005).
- [22] Monselise, P.S. and Goldschmidt, E.E., "Alternate Bearing in Fruit Trees.", *Hortic. Rev.*, 4, 128-173, (1982).
- [23] Lavee, S., "Biennial Bearing in Olive (*Olea Europaea* L.)", *Annales. Ser. hist. nat*, 17, 102-112, (2006).
- [24] Tombesi, A., "Olive Fruit Growth and Metabolism", *Acta Hort*, 356, 225-232 (1994).
- [25] Hartmann, H., "Spray Thinning of Olives", *California Agriculture*, 6, 7, (1952).
- [26] Lavee, S. and Spiegel-Roy, P., "The Effect of Time of Aslication of Two Growth Sunstances on the Thinning of Olive Fruit", *Proc.Amer. Soc. Hort. Sci*, 91, 180-185, (1967).

- [27] Suarez, M.P., Fernandez, E.R., and Rallo, L., "Competition among Fruits in Olive II. Influence of Inflorescence or Fruit Thinning and Cross-Pollination on Fruit Set Components and Crop Efficiency", *Acta Hort.*, 149, 131-144, (1984).
- [28] Ben-Tal, Y. and Lavee, S., "Girdling Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. Iii. Chemical Girdling: Its Influence on Flowering and Yield.", *Riv. Ortoflorofrutti. It.*, 69, 1-11, (1985).
- [29] Badr, S.A. and Hartmann, H.T., "Flowering Response of Olive (*Olea Europaea* L.) to Certain Growth Regulators Applied under Inductive and Noninductive Environments", *Bot. Gaz.*, 133, 387-392, (1972).
- [30] Drobish, H.E., *Olive Thinning and Other Means of Increasing Size of Olives*, Universita della California, Berkeley, 490, (1930).
- [31] Lavee, S., "Involvement of Plant Growth Regulators and Endogenous Growth Substances in the Control of Alternate Bearing.", *Acta Hort.*, 239, 311-322, (1989).
- [32] Lavee, S. and Spiegel-Roy, P., "The Effect of Time of Application of Two Growth Substances on the Thinning of Olive Fruit.", *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 91, 180-185, (1967).
- [33] Cuevas, J., Rallo, J., and Rapaport, H.F., "Crop Load Effects on Floral Quality in Olive.", *Scientia Hort.*, 59, 123-130, (1994).
- [34] Hoad, G.V., "Hormonal Regulation of Fruit-Bud Formation in Fruit Trees", *Acta Hort.*, 149, 13-23, (1984).
- [35] Grochowska, M.J., "Studies on Natural Growth Regulators in Olive Trees in Relation to Biennial Bearing", *Bu. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol.*, 11, 585-590 (1963).
- [36] Badr, S.A., Bradley, M.V., and Hartmann, H.T., "Effect of Gibberellic Acid and Indol Acetic Acid on Shoot and Xylem Differentiation and Development in Olive, *Olea Europaea* L.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 95, 431-431, (1970).
- [37] Stutte, G.W. and Martin, G.C., "Effect of Killing Seed on Return Bloom of Olive.", *Scientia Hort.*, 29, 107-113, (1986).
- [38] Badr, S.A., Hartmann, H.T., and Martin, G.C., "Endogenous Gibberellins and Inhibitors in Relation to Flower Induction and Inflorescence Development in the Olive.", *Plant Physiol.*, 46, 674-679, (1970).
- [39] Fernandez-Escobar, R., Moreno, R., and Garcia-Creus, M., "The Time of Floral Induction in the Olive.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 117, 304-307, (1999).
- [40] Fernandez-Escobar, R., Moreno, R., and Sanchez-Zamora, M.A., "Nitrogen Dynamics in the Olive Bearing Shoot.", *HortScience.*, 39, 1406-1411, (2004).

- [41] Troncoso, A., Garcia, J.L., and Lavee, S., "Evaluation of the Present Information on the Mechanism Leading to Flower Bud Induction, Evocation and Differentiation", *5th Int. Congress on olive growing*, Turkey, (2006).
- [42] Fernandez-Escobar, R., Gómez-Vellador, G., and Rallo, J., "Influence of Pistil Extract and Temperature on in Vitro Pollen Germination and Pollen Tube Growth of Olive Cultivars ", *J. Hort. Sci.*, 58, 219-227, (1992).
- [43] Lavee, S. and Haskal, A., "Partial Fruiting Regulation of Olive Trees (*Olea Europaea* L.) with Paclobutrazol and Gibberellic Acid in the Orchard.", *Adv. Hort. Sci.*, 7, 83-86, (1993).
- [44] Lavee, S., Harshemesh, H., and Avidan, N., "Phenolic Acids - Possible Involvement in Regulating Growth and Alternate Fruiting in Olive Trees", *Acta Hort.*, 179, 317-328, (1986).
- [45] Hartmann, H.T., "Time of Floral Differentiation of the Olive in California", *Bot. Gaz.*, 112, 323-327, (1951).
- [46] Morettini, A., *Olivicoltura*, First Ramo Editoriale degli Agricoltori, Rome, (1950).
- [47] Fontanazza, R. and Preziosi, P., "L'olive E Le Basse Temperature. Osservazioni Su 37 Cultivar Di Olio E 20 Cultivar Da Tavola", *L'Italia Agricola*, 106, 7-8, (1969).
- [48] Baktir, I., Ulger, S., and Himelrick, D.G., "Relationship of Seasonal Changes in Endogenous Plant Hormones and Alternate Bearing of Olive Trees.", *HortScience.*, 39, 987-990, (2004).
- [49] Hackett, W. and Hartmann, H.T., "Inflorescence Formation in Olive as Influenced by Low Temperature, Photoperiod, and Leaf Area.", *Bot. Gaz.*, 125, 65-72 (1964).
- [50] Hartmann, H.T. and Prolingis, I., "Effect of Different Amounts of Winter-Chilling on Fruitfulness of Several Olive Varieties.", *Bot. Gaz.*, 119, 102-104 (1957).
- [51] Rallo, L., Torreno, P., Vargas, A., and Alvarado, J., "Dormancy and Alternate Bearing in Olive ", *Acta Hort*, 356, 127-136, (1994).
- [52] Rallo, J. and Martin, G.C., "Relationship between Abnormal Embryo Sac Development and Fruitfulness in Olive.", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106, 813-817, (1991).
- [53] Erez, A. and Lavee, S., "Prunin Identification, Biological Activity and Quantitative Change in Comparison to Naringenin in Dormant Peach Buds.", *Plant Pysiol.*, 44, 342-346, (1969).

- [54] Martin, G.C., Lavee, S., Sibbett, G.C., Nishijima, C., and Carlson, S.P., "A New Approach to Thinning Olives.", *Calif. Agric.*, 34, 7-8, (1980).
- [55] Ben-Tal, Y. and Lavee, S., "Girdling Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. II. Influence of Consecutive Mechanical Girdling on Flowering and Yield.", *Riv. Ortoflorofrutt. It.*, 68, 441-451, (1984).
- [56] Lavee, S., Haskal, A., and Ben-Tal, Y., "Girdling Olive Trees, a Partial Solution to Biennial Bearing. I. Methods, Timing and Direct Tree Response", *J. Hort. Sci.*, 58, 209-218, (1983).
- [57] Chuenchor, W., Pengthaisong, S., Robinson, R.C., Yuvaniyama, J., Oonant, W., Bevan, D.R., Esen, A., Chen, C.-J., Opassiri, R., Svasti, J., and Cairns, J.R.K., "Structural Insights into Rice Bglu1 [Beta]-Glucosidase Oligosaccharide Hydrolysis and Transglycosylation", *Journal of Molecular Biology*, 377(4), 1200-1215, (2008).
- [58] Coutinho, P.M., Stam, M., Blanc, E., and Henrissat, B., "Why Are There So Many Carbohydrate-Active Enzyme-Related Genes in Plants?", *Trends in Plant Science*, 8(12), 563-565, (2003).
- [59] Escamilla-Treviño, L.L., Chen, W., Card, M.L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., and Poulton, J.E., "Arabidopsis Thaliana [Beta]-Glucosidases Bglu45 and Bglu46 Hydrolyse Monolignol Glucosides", *Phytochemistry*, 67(15), 1651-1660, (2006).
- [60] Gantulga, D., Turan, Y., Bevan, D.R., and Esen, A., "The Arabidopsis At1g45130 and At3g52840 Genes Encode [Beta]-Galactosidases with Activity toward Cell Wall Polysaccharides", *Phytochemistry*, 69(8), 1661-1670, (2008).
- [61] Wallecha, A. and Mishra, S., "Purification and Characterization of Two [Beta]-Glucosidases from a Thermo-Tolerant Yeast *Pichia Etchellsii*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics*, 1649(1), 74-84, (2003).
- [62] Yenil, N., Kuzu, S., Ay, K., and Ay, E., "Monosakkarit Birimlerinin O-Glikozidik Bağlanması; O-Disakkarit Oluşumları", *C.B.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 5(1), 59-74, (2009).
- [63] Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., Palmieri, S., and Henrissat, B., "The Crystal Structures of *Sinapis alba* Myrosinase and of a Covalent Glycosylenzyme Intermediate Provide Insights into the Substrate Recognition and Active-Site Machinery of an S-Glycosidase", *Structure*, 663-675, (1997).
- [64] Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Burmeister, W.P., Bevan, D.R., Henrissat, B., and Esen, A., "Crystal Structure of a Monocotyledon (Maize Zmglu1) Beta-Glucosidase and a Model of Its Complex with P-Nitrophenyl Beta-D-Thioglucoside", *Biochemical Journal*, 354(1), 37, (2001).

- [65] Sansenya, S., Opassiri, R., Kuaprasert, B., Chen, C.-J., and Ketudat Cairns, J.R., "The Crystal Structure of Rice (*Oryza sativa* L.) Os4bglu12, an Oligosaccharide and Tuberonic Acid Glucoside-Hydrolyzing B-Glucosidase with Significant Thioglucohydrolase Activity", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 510(1), 62-72, (2011).
- [66] Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J.A., Martinez-Ripoll, M., Lequerica, J.L., and J., P., "Crystal Structure of B-Glucosidase a from *Bacillus polymyxa*: Insights into the Catalytic Activity in Family 1 Glycosyl Hydrolases", *Journal of Molecular Biology*, 275, 491-502, (1998).
- [67] Esen, A., "A Simple Method for Quantitative, Semiquantitative, and Qualitative Assay of Protein", *Analytical Biochemistry*, 89(1), 264-273, (1978).
- [68] Esen, A., "A Proposed Nomenclature for the Alcohol-Soluble Proteins (Zeins) of Maize (*Zea mays* L.)", *Journal of Cereal Science*, 5(2), 117-128, (1987).
- [69] Esen, A., Bietz, J.A., Paulis, J.W., and Wall, J.S., "Isolation and Characterization of a Methionine-Rich Protein from Maize Endosperm", *Journal of Cereal Science*, 3(2), 143-152, (1985).
- [70] Esen, A. and Cokums, C., "Ph- and Temperature-Dependent β -Glucosidase Multiplicity in Maize (*Zea mays* L.) Is a Proteolysis Artifact", *Plant Science*, 74(1), 17-26, (1991).
- [71] Nam, K.H., Sung, M.W., and Hwang, K.Y., "Structural Insights into the Substrate Recognition Properties of Beta-Glucosidase", *Biochem Biophys Res Commun*, 391(1), 1131-5, (2010).
- [72] Henrissat, B. and Davies, G., "Structural and Sequence-Based Classification of Glycoside Hydrolases", *Current Opinion in Structural Biology*, 7(5), 637-644, (1997).
- [73] Henrissat, B., "A Classification of Glycosyl Hydrolases Based on Amino Acid Sequence Similarities", *Biochem. J.*, 280, 309-316, (1991).
- [74] Bourne, Y. and Henrissat, B., "Glycoside Hydrolases and Glycosyltransferases: Families and Functional Modules", *Current Opinion in Structural Biology*, 11(5), 593-600, (2001).
- [75] Burmeister, W.P., Cottaz, S., Driguez, H., P., S., and Henrissat, B., "The Crystal Structures of *Sinapis alba* Myrosinase and of a Covalent Glycosyl-Ezyme Intermediate Provide Insights into the Substrate Recognition and Active-Site Machinery of an S-Glycosidase", *Structure*, 5, 663-675, (1997).
- [76] Bojarová, P. and Kren, V., "Glycosidases: A Key to Tailored Carbohydrates", *Trends in Biotechnology*, 27(4), 199-209, (2009).
- [77] Davies, G.a.H., B. , " Structure and Mechanisms of Glycosyl Hydrolases", *Structure*, 3, 853-859, (1995).

- [78] Davies, G.J., Wilson, K.S., and Henrissat, B., "Nomenclature for Sugarbinding Subsites in Glycosyl Hydrolases", *Biochemical Journal*, 321, 557-559, (1997).
- [79] P., C., "Structural and Functional Characterization of B-Glucosidase from *Dalbergia nigrescens* Kurz", Published PhD Thesis, Suranaree University of Technology, (2004).
- [80] Henrissat, B. and Bairoch, A., "Updating the Sequence-Based Classification of Glycosyl Hydrolases", *Biochemical Journal*, 316, 695-696, (1996).
- [81] Barrett, T., Suresh, C.G., Tolley, S.P., Dodson, E.J., and Hughes, M.A.T., "The Crystal Structure of Cyanogenic B-Glucosidase from White Clover (*Trifolium Repens* L.) a Family 1 Glycosyl Hydrolase", *Structure*, 3, 951-960, (1995).
- [82] Varghese, J.N., Garret, T.P.J., Colman, P.M., Chen, L., Hoj P. B., and Fincher, G.B., "The Three-Dimensional Structures of Two Plant-B-Glycan Endohydrolases with Distinct Substrate Specificities", *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 91, 2785-2789, (1994).
- [83] Clarke, A.J., Bray, M.R., and Strating, H., *Glucosidases, Glucanases, and Xylanases*, in *β -Glucosidases*, American Chemical Society, 27-41, (1993).
- [84] Günter, L. "Glycoside Hydrolases", *Adv Carb Chem & Biochem*, 48, 319-384, (1990).
- [85] G., W. and S.G., W., "Substrate-Assisted Catalysis in β -Glycosidases.", *J. Amer.Chem Soc.*, 117, 10137-10138, (1995).
- [86] Hrmova, M. and Fincher, G.B., "Plant Enzyme Structure. Explaining Substrate Specificity and the Evolution of Function", *Plant Physiol*, 125(1), 54-7, (2001).
- [87] Czjzek, M., Cicek, M., Zamboni, V., Bevan, D.R., Henrissat, B., and Esen, A., "The Mechanism of Substrate (Aglycone) Specificity in B-Glucosidases Is Revealed by Crystal Structures of Mutant Maize B-Glucosidase-Dimboa, -Dimboaglc, and -Dhurrin Complexes", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13555-13560, (2000).
- [88] Verdoucq, L., Morinière, J., Bevan, D.R., Esen, A., Vasella, A., Henrissat, B., and Czjze, M., "Structural Determinants of Substrate Specificity in Family 1 B-Glucosidases: Novel Insights from the Crystal Structure of Sorghum Dhurrinase-1, a Plant B-Glucosidase with Strict Specificity, in Complex with Its Natural Substrate", *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), 31796-31803, (2004).
- [89] Cicek, M. and Esen, A., "Structure and Expression of a Dhurrinase (Beta-Glucosidase) from Sorghum", *Plant Physiol*, 116(4), 1469-78, (1998).
- [90] Babcock, G.D. and Esen, A., "Substrate Specificity of Maize [Beta]-Glucosidase", *Plant Science*, 101(1), 31-39, (1994).
- [91] Vetter, J., "Plant Cyanogenic Glycosides", *Toxicon*, 38(1), 11-36, (2000).

- [92] Niemeyer, H.M., "Hydroxamic Acids (4-Hydroxy-1,4-Benzoxazin-3-Ones) Defense Chemicals in the Gramineace", *Phytochemistry*, 27, 3349-3358, (1988).
- [93] Fenwick, G.R., Heaney, R.K., and Mullin, W.J., "Glucosinolates and Their Breakdown Products in Food and Food Plants", *Crit Rev Food Sci Nutr*, 18(2), 123-201, (1983).
- [94] Poulton, J.E., "Cyanogenesis in Plants", *Plant Physiol*, 94(2), 401-405, (1990).
- [95] Nowacki, J. and Bandurski, R.S., "Myo-Inositol Esters of Indole-3-Acetic Acid as Seed Auxin Precursors of Zea Mays L", *Plant Physiol*, 65(3), 422-7, (1980).
- [96] Schliemann, W., "Hydrolysis of Conjugated Gibberellins by Beta-Glucosidases from Dwarf Rice (*Oryza Sativa* L. Cv. <<Tan-Ginbozu>>)", *J Plant Physiol*, 116(2), 123-32, (1984).
- [97] Thayer, S.S. and Conn, E.E., "Subcellular Localization of Dhurrin Beta-Glucosidase and Hydroxynitrile Lyase in the Mesophyll Cells of Sorghum Leaf Blades", *Plant Physiol*, 67(4), 617-22, (1981).
- [98] Stotz, H.U., Pittendrigh, B.R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A., and Mitchell-Olds, T., "Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of Arabidopsis against Egyptian Cotton Worm but Not Diamondback Moth", *Plant Physiol*, 124(3), 1007-18, (2000).
- [99] Shipkowski, S. and Brenchley, J.E., "Characterization of an Unusual Cold-Active B-Glucosidase Belonging to Family 3 of the Glycoside Hydrolases from the Psychrophilic Isolate *Paenibacillus* sp. Strain C7", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4225-4232, (2005).
- [100] Wimmer, M.A., Lochnit, G., Bassil, E., Muehling, K.H., Brown, P.H., and Goldbach, H.E., "Identification of Boron-Binding Proteins Supports a Function of Boron at the Cell Membrane", *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*, UC Davis, (2009).
- [101] Grohmann, K., Manthey, J.A., Cameron, R.G., and Buslig, B.S., "Purification of Citrus Peel Juice and Molasses", *J Agric Food Chem*, 47(12), 4859-67, (1999).
- [102] Maicas, S. and Mateo, J.J., "Hydrolysis of Terpenyl Glycosides in Grape Juice and Other Fruit Juices: A Review", *Applied microbiology and biotechnology*, 67(3), 322-335, (2005).
- [103] Sarry, J.-E. and Günata, Z., "Plant and Microbial Glycoside Hydrolases: Volatile Release from Glycosidic Aroma Precursors", *Food Chemistry*, 87(4), 509-521, (2004).
- [104] Mithen, R.F., "Glucosinolates and Their Degradation Products", *Advances in Botanical Research*, 35, 213-232, (2001).

- [105] Fenwick, G.R., Heaney, R.K., Mullin, W.J., and VanEtten, C.H., "Glucosinolates and Their Breakdown Products in Food and Food Plants", *C R C Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2), 123-201, (1982).
- [106] Odoux, E., Chauwin, A., and Brillouet, J.M., "Purification and Characterization of Vanilla Bean (*Vanilla Planifolia* Andrews) Beta-D-Glucosidase", *J Agric Food Chem*, 51(10), 3168-73, (2003).
- [107] Shoseyov, O., Bravdo, B.A., Siegel, D., Goldman, A., Cohen, S., Shoseyov, L., and Ikan, R., "Immobilized Endo-Beta-Glucosidase Enriches Flavor of Wine and Passion Fruit Juice", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(6), 1387-1390, (1990).
- [108] Li, Y.Y., Jiang, C.J., Wan, X.C., Zhang, Z.Z., and Li, D.X., "Purification and Partial Characterization of Beta-Glucosidase from Fresh Leaves of Tea Plants (*Camellia Sinensis* (L.) O. Kuntze)", *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37(6), 363-70, (2005).
- [109] Teeri, T.T., "Crystalline Cellulose Degradation: New Insight into the Function of Cellobiohydrolases", *Trends in Biotechnology*, 15(5), 160-167, (1997).
- [110] Ljungdahl, L.G., "The Cellulase/Hemicellulase System of the Anaerobic Fungus *orpinomycespc-2* and Aspects of Its Applied Use", *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 308-321, (2008).
- [111] Enari, T.M. and Markkanen, P., "Production of Cellulolytic Enzymes by Fungi", *Advances in Biochemical Engineering*, 5, 1-24, (1977).
- [112] Beguin, P., "Molecular Biology of Cellulose Degradation", *Annu Rev Microbiol*, 44, 219-48, (1990).
- [113] Hösel, W. and Todenhagen, R., "Characterization of a B-Glucosidase from *Glycine Max* Which Hydrolyses Coniferin and Syringin", *Phytochemistry*, 19(7), 1349-1353, (1980).
- [114] Surholt, E. and Hösel, W., "Identification of Coniferin-Specific-Glucosidases in *Cicer Arietinum* L. Seedlings", *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 101(3), 207-214, (1981).
- [115] Bianco, A. and Uccella, N., "Biophenolic Components of Olives", *Food Research International*, 33(6), 475-485, (2000).
- [116] Saija, A. and Uccella, N., "Olive Biophenols: Functional Effects on Human Wellbeing", *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10), 357-363, (2000).
- [117] Visioli, F., Galli, C., "Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health", *J. Agric. Food Chem.*, 46, 4292-4296, (1998).

- [118] Carmen Romero-Segura, C.S., and Ana G. Perez, "Purification and Characterization of an Olive Fruit B-Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics", *J. Agric. Food Chem.*, 57, 7983-7988, (2009).
- [119] Mateos, R.C., A.; Pe´rez-Camino, M. C.; Garcı´a, J. M., "Evaluation of Virgin Olive Oil Bitterness by Quantification of Secoiridoid Derivatives", *J Am. Oil Chem. Soc.*, 81, 71–75, (2004).
- [120] Obied, H.K.P., P. D.; Ryan, D.; Servilli, M.; Taticchi, A.; and Esposto, S.R., K., "Biosynthesis and Biotransformations of Phenol-Conjugated Oleosidic Secoiridoids from *Olea Europaea* L.", *Nat. Prod. Rep.*, 25, 1167-1179, (2008).
- [121] Savarese, M.D.M., E.; Sacchi, R., "Characterization of Phenolic Extracts from Olives (*Olea Europaea* Cv. Pisciottana) by Electrospray Ionization Mass Spectrometry.", *Food Chem.*, 105, 761-770, (2007).
- [122] Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., and Nakamura, M., "Enzymatic Activation of Oleuropein: A Protein Crosslinker Used as a Chemical Defense in the Privet Tree", *Ecology*, 96, 9159-9164, (1999).
- [123] W. Wang, C.Q.L.a.X.L.H., "Developmental Expression of B-Glucosidase in Olive Leaves", *Biologia Plantarum*, 53 (1), 138-140, (2009).
- [124] Caporale, G., Policastro, S., and Monteleone, E., "Bitterness Enhancement Induced by Cut Grass Odorant (Cis-3-Hexen-1-Ol) in a Model Olive Oil", *Food Quality and Preference*, 15(3), 219-227, (2004).
- [125] Garcı´a, J.M., Yousfi, K., Mateos, R., Olmo, M., and Cert, A., "Reduction of Oil Bitterness by Heating of Olive (*Olea Europaea*) Fruits", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4231-4235, (2001).
- [126] Kara, H.E., Sinan, S., and Turan, Y., "Purification of Beta-Glucosidase from Olive (*Olea Europaea* L.) Fruit Tissue with Specifically Designed Hydrophobic Interaction Chromatography and Characterization of the Purified Enzyme", *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 879(19), 1507-12, (2011).
- [127] Mazzei, R., Giorno, L., Mazzuca, S., Spadafora, A., and Drioli, E., "[Beta]-Glucosidase Separation from *Olea Europaea* Fruit and Its Use in Membrane Bioreactors for Hydrolysis of Oleuropein", *Desalination*, 200(1-3), 483-484, (2006).
- [128] Polydefkis Hatzopoulos, Georgios Banilas, Katerina Giannoulia, Fotis Gazis, Nikos Nikoloudakis, Dimitra Milioni, and Haralampidis, K., "Breeding, Molecular Markers and Molecular Biology of the Olive Tree", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 574-586, (2002).
- [129] Kim, Y.O., Lee, Y.G., Patel, D.H., Kim, H.M., Ahn, S.J., and Bae, H.J., "Zn Tolerance of Novel *Colocasia Esculenta* Metallothionein and Its Domains in *Escherichia Coli* and Tobacco", *J Plant Res.*, 21, 234-278, (2012).

- [130] Zhou, J. and Goldsbrough, P.B., "Functional Homologs of Fungal Metallothionein Genes from *Arabidopsis*", *Plant Cell*, 6(6), 875-84, (1994).
- [131] Cobbett, C.S., "Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification", *Plant Physiol*, 123(3), 825-832, (2000).
- [132] Murphy, A., Zhou, J., Goldsbrough, P.B., and Taiz, L., "Purification and Immunological Identification of Metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis Thaliana*", *Plant Physiol*, 113(4), 1293-301, (1997).
- [133] Zhigang, A., Cuijie, L., Yuangang, Z., Yejie, D., Wachter, A., Gromes, R., and Rausch, T., "Expression of Bjmt2, a Metallothionein 2 from *Brassica Juncea*, Increases Copper and Cadmium Tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but Inhibits Root Elongation in *Arabidopsis thaliana* Seedlings", *Journal of Experimental Botany*, 57(14), 3575-3582, (2006).
- [134] Grennan, A.K., "Metallothioneins, a Diverse Protein Family", *Plant Physiol*, 155(4), 1750-1751, (2011).
- [135] Margoshes, M. and Vallee, B.L., "A Cadmium Protein from *Equine* Kidney Cortex", *Journal of the American Chemical Society*, 79(17), 4813-4814, (1957).
- [136] Lane, B., Kajioka, R., and Kennedy, T., "The Wheat-Germ Ec Protein Is a Zinc-Containing Metallothionein", *Biochemistry and Cell Biology*, 65(11), 1001-1005, (1987).
- [137] Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G., and Zheng, C., "Cotton Metallothionein Ghmt3a, a Reactive Oxygen Species Scavenger, Increased Tolerance against Abiotic Stress in Transgenic Tobacco and Yeast", *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 339-349, (2009).
- [138] Wong, H.L., Sakamoto, T., Kawasaki, T., Umemura, K., and Shimamoto, K., "Down-Regulation of Metallothionein, a Reactive Oxygen Scavenger, by the Small Gtpase Osrac1 in Rice", *Plant Physiol*, 135(3), 1447-56, (2004).
- [139] Sekhar, K., Priyanka, B., Reddy, V.D., and Rao, K.V., "Metallothionein 1 (Ccmt1) of Pigeonpea (*Cajanus Cajan*, L.) Confers Enhanced Tolerance to Copper and Cadmium in *Escherichia Coli* and *Arabidopsis Thaliana*", *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 131-139, (2011).
- [140] Schiller, M., Hegelund, J.N., Pedas, P., Husted, S., and Schjoerring, J.K., "Plant Metallothioneins and Functional Analysis of a Barley Metallothionein Promoter", *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI*, UC Davis, (2009).
- [141] Cobbett, C. and Goldsbrough, P., "Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis", *Annu Rev Plant Biol*, 53, 159-82, (2002).

- [142] Ryvolova, M., Krizkova, S., Adam, V., Beklova, M., Trnkova, L., Hubalek, J., and Kizek, R., "Analytical Methods for Metallothionein Detection", *Curr. Anal. Chem*, 7(3), 243-261, (2011).
- [143] Karin, M., "Metallothioneins: Proteins in Search of Function", *Cell*, 41(1), 9-10, (1985).
- [144] Karin, M., Najarian, R., Haslinger, A., Valenzuela, P., Welch, J., and Fogel, S., "Primary Structure and Transcription of an Amplified Genetic Locus: The Cup1 Locus of Yeast", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(2), 337-41, (1984).
- [145] Thirumoorthy, N., Manisenthil Kumar, K.T., Shyam Sundar, A., Panayappan, L., and Chatterjee, M., "Metallothionein: An Overview", *World J Gastroenterol*, 13(7), 993-6, (2007).
- [146] Beach, L.R. and Palmiter, R.D., "Amplification of the Metallothionein-I Gene in Cadmium-Resistant Mouse Cells", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(4), 2110-4, (1981).
- [147] McCormick, P.M., Cannon, G.C., and Heinhorst, S., "Expression of the Copper Metallothionein Cup1 from *Saccharomyces cerevisiae* in the *Cyanobacterium synechococcus* R2-Pim8", *Current Microbiology*, 38(3), 155-162, (1999).
- [148] Suzuki, K.T., "Metallothionein Iii: Biological Roles and Medical Implications". Springer-Verlag New York, LLC (1994).
- [149] Salusjärvi, L., Pitkänen, J.-P., Aristidou, A., Ruohonen, L., and Penttilä, M., "Transcription Analysis of Recombinant *Saccharomyces Cerevisiae* Reveals Novel Responses to Xylose", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 128(3), 237-273 (2006).
- [150] Hsieh, H.-M., Liu, W.-K., and Huang, P.C., "A Novel Stress-Inducible Metallothionein-Like Gene from Rice", *Plant Molecular Biology*, 28(3), 381-389, (1995).
- [151] Ledger, S.E. and Gardner, R.C., "Cloning and Characterization of Five Cdnas for Genes Differentially Expressed During Fruit Development of Kiwifruit (*Actinidia Deliciosa* Var. *Deliciosa*)", *Plant Molecular Biology*, 25(5), 877-86, (1994).
- [152] Buchanan-Wollaston, V., "Isolation of Cdna Clones for Genes That Are Expressed During Leaf Senescence in Brassica Napus (Identification of a Gene Encoding a Senescence-Specific Metallothionein-Like Protein)", *Plant Physiol.*, 105(3), 839-846, (1994).
- [153] Reid, S.J. and Ross, G.S., "Up-Regulation of Two Cdna Clones Encoding Metallothionein-Like Proteins in Apple Fruit During Cool Storage", *Physiologia Plantarum*, 100(1), 183-189, (1997).

- [154] Coupe, S.A., Taylor, J.E., and Roberts, J.A., "Characterisation of an Mrna Encoding a Metallothionein-Like Protein That Accumulates During Ethylene-Promoted Abscission of *Sambucus Nigra* L. Leaflets", *Planta*, 197(3), 442-447, (1995).
- [155] Evans, I.M., Gatehouse, L.N., Gatehouse, J.A., Robinson, N.J., and Croy, R.R., "A Gene from Pea (*Pisum Sativum* L.) with Homology to Metallothionein Genes", *FEBS Lett*, 262(1), 29-32, (1990).
- [156] Chaturvedi, A.K., Mishra, A., Tiwari, V., and Jha, B., "Cloning and Transcript Analysis of Type 2 Metallothionein Gene (Sbmt-2) from Extreme Halophyte *Salicornia Brachiata* and Its Heterologous Expression in E. Coli", *Gene*, 499(2), 280-287, (2012).
- [157] Salt, D.E., Prince, R.C., Pickering, I.J., and Raskin, I., "Mechanisms of Cadmium Mobility and Accumulation in Indian Mustard", *Plant Physiol.*, 109(4), 1427-1433, (1995).
- [158] Dhankher, O.P., Li, Y., Rosen, B.P., Shi, J., Salt, D., Senecoff, J.F., Sashti, N.A., and Meagher, R.B., "Engineering Tolerance and Hyperaccumulation of Arsenic in Plants by Combining Arsenate Reductase and Gamma-Glutamylcysteine Synthetase Expression", *Nat Biotechnol*, 20(11), 1140-5, (2002).
- [159] Leyval, C., Turnau, K., and Haselwandter, K., "Effect of Heavy Metal Pollution on Mycorrhizal Colonization and Function: Physiological, Ecological and Applied Aspects", *Mycorrhiza*, 7(3), 139-153, (1997).
- [160] Terzi, H. and Yıldız, M., "Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi", *AKU-J. Sci.*, 11, 1-22, (2011).
- [161] Bruins, M.R., Kapil, S., and Oehme, F.W., "Microbial Resistance to Metals in the Environment", *Ecotoxicol Environ Saf*, 45(3), 198-207, (2000).
- [162] Prasad, M., N.V., "Metal- Biomolecule Complexes in Plants: Occurrence, Functions, and Applications", *Analisis*, 26(6), 25-27, (1998).
- [163] Nies, D.H., "Microbial Heavy-Metal Resistance", *Applied microbiology and biotechnology*, 51(6), 730-750, (1999).
- [164] Inouhe, M., Sumiyoshi, M., Tohoyama, H., and Joho, M., "Resistance to Cadmium Ions and Formation of a Cadmium-Binding Complex in Various Wild-Type Yeasts", *Plant Cell Physiol.*, 37(3), 341-6, (1996).
- [165] Principi, P., Villa, F., Bernasconi, M., and Zanardini, E., "Metal Toxicity in Municipal Wastewater Activated Sludge Investigated by Multivariate Analysis and in Situ Hybridization", *Water Research*, 40(1), 99-106, (2006).

- [166] Gosavi, K., Sammut, J., Gifford, S., and Jankowski, J., "Macroalgal Biomonitors of Trace Metal Contamination in Acid Sulfate Soil Aquaculture Ponds", *Sci Total Environ*, 324(1-3), 25-39, (2004).
- [167] Dundar, E., Suakar, O., Unver, T., and Dagdelen, A., "Isolation and Expression Analysis of Cdnas That Are Associated with Alternate Bearing in *Olea Europaea* L. Cv. Ayvalık", *BMC Genomics*, 14(1), 219, (2013).
- [168] Lu, T., Jin-Yuan, L., ZhangG, R.-Q., and Zhao, N.-M., "Modelling Rice Rgmt as a Plant Metallothionein-Like Protein by the Distance Geometry and Homology Methods", *Acta Botanica Sinica*, 45(11), 1297-1306, (2003).
- [169] Veglio, F. and Beolchini, F., "Removal of Metals by Biosorption: A Review", *Hydrometallurgy*, 44(3), 301-316, (1997).
- [170] Ledin, M., "Accumulation of Metals by Microorganisms: Processes and Importance for Soil Systems", *Earth-Science Reviews*, 51(1-4), 1-31, (2000).
- [171] Tien, C.J., "Biosorption of Metal Ions by Freshwater Algae with Different Surface Characteristics", *Process Biochemistry*, 38(4), 605-613, (2002).
- [172] Macaskie, L.E., Wates, J.M., and Dean, A.C., "Cadmium Accumulation by a *Citrobacter* Sp. Immobilized on Gel and Solid Supports: Applicability to the Treatment of Liquid Wastes Containing Heavy Metal Cations", *Biotechnol Bioeng*, 30(1), 66-73, (1987).
- [173] Bitton, G. and Freihofer, V., "Influence of Extracellular Polysaccharides on the Toxicity of Copper and Cadmium toward *Klebsiella Aerogenes*", *Microbial Ecology*, 4(2), 119-125, (1977).
- [174] Clemens, S., Palmgren, M.G., and Kramer, U., "A Long Way Ahead: Understanding and Engineering Plant Metal Accumulation", *Trends Plant Sci*, 7(7), 309-15, (2002).
- [175] Mejare, M. and Bulow, L., "Metal-Binding Proteins and Peptides in Bioremediation and Phytoremediation of Heavy Metals", *Trends Biotechnol*, 19(2), 67-73, (2001).
- [176] Gavrilesco, M., "Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption", *Engineering in Life Sciences*, 4(3), 219-232, (2004).
- [177] Pazirandeh, M., Wells, B.M., and Ryan, R.L., "Development of Bacterium-Based Heavy Metal Biosorbents: Enhanced Uptake of Cadmium and Mercury by *Escherichia Coli* Expressing a Metal Binding Motif", *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4068-4072, (1998).
- [178] Çeribası, I.H. and Yetis, U., "Biosorption of Ni (Ii) and Pb (Ii) by *Phanerochaete Chrysosporium* from a Binary Metal System–Kinetics", *Water SA*, 27(1), 15-20, (2004).

- [179] Chaalal, O., Zekri, A.Y., and Islam, R., "Uptake of Heavy Metals by Microorganisms: an Experimental Approach", *UESO*, 27(1), 87-100, (2005).
- [180] Deng, X., Yi, X.E., and Liu, G., "Cadmium Removal from Aqueous Solution by Gene-Modified *Escherichia Coli* Jm109", *J Hazard Mater*, 139(2), 340-4, (2007).
- [181] Mehta, S.K. and Gaur, J.P., "Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions from Wastewater: Progress and Prospects", *Critical Reviews in Biotechnology*, 25(3), 113-152, (2005).
- [182] Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L., and Munoz, J.A., "Comparative Study of Biosorption of Heavy Metals Using Different Types of Algae", *Bioresour Technol*, 98(17), 3344-53, (2007).
- [183] Rajendran, P., Muthukrishnan, J., and Gunasekaran, P., "Microbes in Heavy Metal Remediation", *Indian J Exp Biol*, 41(9), 935-44, (2003).
- [184] Yoshida, N., Kato, T., Yoshida, T., Ogawa, K., Yamashita, M., and Murooka, Y., "Bacterium-Based Heavy Metal Biosorbents: Enhanced Uptake of Cadmium by *E. Coli* Expressing a Metallothionein Fused to Beta-Galactosidase", *Biotechniques*, 32(3), 551- 556 , (2002).
- [185] Romeyer, F.M., Jacobs, F.A., and Brousseau, R., "Expression of a *Neurospora Crassa* Metallothionein and Its Variants in *Escherichia Coli*", *Appl Environ Microbiol*, 56(9), 2748-54, (1990).
- [186] Hatzopoulos, P., Banilas, G., Giannoulia, K., Gazis, F., Nikoloudakis, N., Milioni, D., and Haralampidis, K., "Breeding, Molecular Markers and Molecular Biology of the Olive Tree", *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 574-586, (2002).
- [187] Sivakumar, G., Briccoli Bati, C., and Uccella, N., "Demethyloleuropein and Beta-Glucosidase Activity in Olive Fruits", *Biotechnol J*, 2(3), 381-5, (2007).
- [188] Romero-Segura, C., Sanz, C., and Perez, A.G., "Purification and Characterization of an Olive Fruit Beta-Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics", *J Agric Food Chem*, 57(17), 7983-8 ,(2009).
- [189] Corrado, G., Alagna, F., Rocco, M., Renzone, G., Varricchio, P., Coppola, V., Coppola, M., Garonna, A., Baldoni, L., Scaloni, A., and Rao, R., "Molecular Interactions between the Olive and the Fruit Fly *Bactrocera Oleae*", *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-17, (2012).
- [190] Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., " A Plant DNA Miniprep: Version II ", *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-21 (1983).
- [191] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1989).

- [192] Laemmli, U., "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227(5259), 680-685, (1970).
- [193] Kara, H., "Á-Glukozidaz Enziminin Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi ile *Olea Europea* L. Meyvesinden Saflaştırılması, Karakterizasyonu ile Bazı Pestisit ve Ağır Metaller Karşı Afinitesinin Araştırılması", Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2010).
- [194] 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, (1999).
- [195] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Meyers, E.W., and , and Lipman, D.J., "Basic Local Alignment Search Tool", *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410, (1990).
- [196] Prestridge, D.S., "Predicting Pol Ii Promoter Sequences Using Transcription Factor Binding Sites", *J. Mol. Biol.*, 249, 923-932, (1995).
- [197] Kyte, J.a. and Doolittle, R.F., "A Simple Method for Displaying the Hydrophobic Character of a Protein", *Journal of Molecular Biology*, 157, 105-132, (1982).
- [198] Claros, M.G. and von Heijne, G., "Toppred Ii: An Improved Software for Membrane Protein Structure Predictions", *Computer Applications in the Biosciences*, 10, 685-686, (1994).
- [199] Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C., "Predotar: A Tool for Rapidly Screening Proteomes for N-Terminal Targeting Sequences", *Proteomics*, 4(6), 1581-1590, (2004).
- [200] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G., "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence", *J. Mol. Biol.*, 300(4), 1005-1016, (2000).
- [201] Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S., "Sosui: Classification and Secondary Structure Prediction System for Membrane Proteins", *Bioinformatics*, 14(4), 378-379, (1998).
- [202] Artimo P, Jonnalagedda M, Arnold K, Baratin D, Csardi G, de Castro E, Duvaud S, Flegel V, Fortier A, Gasteiger E, Grosdidier A, Hernandez C, Ioannidis V, Kuznetsov D, Liechti R, Moretti S, Mostaguir K, Redaschi N, Rossier G, Xenarios I, and H., a.S., "Expasy: Sib Bioinformatics Resource Portal", *Nucleic Acids Res*, 40(1), 597-603, (2012).
- [203] Zhang, Y., " I-Tasser Server for Protein 3d Structure Prediction", *BMC Bioinformatics*, 9(40), (2008).
- [204] Bodin, L., Beaune, P.H., and Loriot, M.-A., "Determination of Cytochrome P450 2d6 (Cyp2d6) Gene Copy Number by Real-Time Quantitative Pcr", *J Biomed Biotechnol*, 2005(3), 248-253, (2005).

- [205] Honda, M., Muramoto, Y., Kuzuguchi, T., Sawano, S., Machida, M., and Koyama, H., "Determination of Gene Copy Number and Genotype of Transgenic *Arabidopsis Thaliana* by Competitive Pcr", *J. Exp. Bot.*, 53(373), 1515-1520, (2002).
- [206] 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).
- [207] Palmieri-Thiers, C., Canaan, S., Brunini, V., Lorenzi, V., Tomi, F., Desseyn, J.-L., Garscha, U., Oliw, E.H., Berti, L., and Maury, J., "A Lipoxygenase with Dual Positional Specificity Is Expressed in Olives (*Olea Europaea* L.) During Ripening.", *Biochim biophysica Acta (Amsterdam)*, 1971(5), 339-346, (2009).
- [208] Banilas, G., Karampelias, M., Makariti, I., Kourti, A., and Hatzopoulos, P., "The Olive Dgat2 Gene Is Developmentally Regulated and Shares Overlapping but Distinct Expression Patterns with Dgat1", *Journal of Experimental Botany*, 62(2), 521-532, (2011).
- [209] Padilla, M.N., Hernandez, M.L., Perez, A.G., Sanz, C., and Martinez-Rivas, J.M., "Isolation, Expression, and Characterization of a 13-Hydroperoxide Lyase Gene from Olive Fruit Related to the Biosynthesis of the Main Virgin Olive Oil Aroma Compounds", *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5649-5657, (2010).
- [210] Padilla, M.N., Hernandez, M.L., Sanz, C., and Martinez-Rivas, J.M., "Functional Characterization of Two 13-Lipoxygenase Genes from Olive Fruit in Relation to the Biosynthesis of Volatile Compounds of Virgin Olive Oil", *J. Agric. Food Chem.*, 57, 9097-9107, (2009).
- [211] Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., and Clark, B.J., "Gapdh as a Housekeeping Gene: Analysis of Gapdh Mrna Expression in a Panel of 72 Human Tissues.", *Physical Genomics*, 21(3), 389-395, (2005).
- [212] Alche, J.D., Butowt, R., Castro, A.J., and Rodriguez-Garcia, M.I., "Ubiquitin and Uniquitin-Conjugated Proteins in the Olive (*Olea Europaea* L.) Pollen.", *Sexual plant reproduction*, 12(5), 285-291, (2000).
- [213] McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., An, Y.-Q., and Meagher, R.B., "Structure and Evolution of the Actin Gene Family in *Arabidopsis Thaliana*", *Genetics*, 142, 587-602, (1996).
- [214] Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G., "Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on Their N-Terminal Amino Acid Sequence", *J. Mol. Biol.*, 300, 1005-1016, (2000).
- [215] Boussadia, O., Mariem, F.B., Mechri, B., Boussetta, W., Braham, M., and Hadj, S.B.E., "Response to Drought of Two Olive Tree Cultivars (Cv Koroneki and Meski)", *Scientia Horticulturae*, 116(4), 388-393, (2008).

- [216] Lipworth, L., Martinez, M.E., Angell, J., Hsieh, C.C., and Trichopoulos, D., "Olive Oil and Human Cancer: An Assessment of the Evidence", *Prev Med.*, 26(2), 181-90, (1997).
- [217] Matern, H., Boermans, H., Lottspeich, F., and Matern, S., "Molecular Cloning and Expression of Human Bile Acid B-Glucosidase", *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37929-37933, (2001).
- [218] Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., and Carlson, J.E., "A Beta-Glucosidase from Lodgepole Pine Xylem Specific for the Lignin Precursor Coniferin", *Plant Physiol.*, 107(2), 331-339, (1995).
- [219] Leah, R., Kigel, J., Svendsen, I., and Mundy, J., "Biochemical and Molecular Characterization of a Barley Seed β -Glucosidase", *Journal of Biological Chemistry*, 270(26), 15789-15797, (1995).
- [220] Gomez-Anduro, G., Ceniceros-Ojeda, E.A., Casados-Vazquez, L.E., Bencivenni, C., Sierra-Beltran, A., Murillo-Amador, B., and Tiessen, A., "Genome-Wide Analysis of the Beta-Glucosidase Gene Family in Maize (*Zea mays* L. Var B73)", *Plant Molecular Biology*, 77(1-2), 159-83, (2011).
- [221] Goujon, T., Minic, Z., El Amrani, A., Lerouxel, O., Aletti, E., Lapierre, C., Joseleau, J.P., and Jouanin, L., "*Atbx11*, a Novel Higher Plant (*Arabidopsis Thaliana*) Putative Beta-Xylosidase Gene, Is Involved in Secondary Cell Wall Metabolism and Plant Development", *Plant J.*, 33(4), 677-90, (2003).
- [222] Gleadow, R.M., Vecchies, A.C., and Woodrow, I.E., "Cyanogenic *Eucalyptus Nobilis* Is Polymorphic for Both Prunasin and Specific Beta-Glucosidases", *Phytochemistry*, 63(6), 699-704, (2003).
- [223] Hughes, M., "The Cyanogenic Polymorphism in *Trifolium repens* L. (White Clover)", *Heredity*, 66(1), 105-115, (1991).
- [224] Hughes, M., Sharif, A., Dunn, M.A., Oxtoby, E., and Pancoro, A., "Restriction Fragment Length Polymorphism Segregation Analysis of the Li Locus in *Trifolium repens* L", *Plant Molecular Biology*, 14(3), 407-414, (1990)
- [225] Geerlings, A., Ibañez, M.M.-L., Memelink, J., van der Heijden, R., and Verpoorte, R., "Molecular Cloning and Analysis of Strictosidine B-D-Glucosidase, an Enzyme in Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthesis in *Catharanthus roseus*", *Journal of Biological Chemistry*, 275(5), 3051-3056, (2000).
- [226] Ma, G.J., Zhang, T.Z., and Guo, W.Z., "Cloning and Characterization of Cotton *Ghbg* Gene Encoding Beta-Glucosidase", *DNA Seq.*, 17(5), 355-62, (2006).
- [227] Khan, F.A., Varma, G.M., and Vijay, I.K., "Genomic Organization and Promoter Activity of Glucosidase I Gene", *Glycobiology*, 9(8), 797-806, (1999).

- [228] Amiot, M.-J., Fleuriot, A., and Macheix, J.-J., "Accumulation of Oleuropein Derivatives During Olive Maturation", *Phytochemistry*, 28(1), 67-69, (1989).
- [229] Gutierrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., and Minguez-Mosquera, M.I., "Metabolites Involved in Oleuropein Accumulation and Degradation in Fruits of *Olea Europaea* L.: *hojiblanca* and *arbequina* Varieties", *J Agric Food Chem*, 58(24), 12924-33, (2010).
- [230] Alagna, F., Mariotti, R., Panara, F., Caporali, S., Urbani, S., Veneziani, G., Esposito, S., Taticchi, A., Rosati, A., Rao, R., Perrotta, G., Servili, M., and Baldoni, L., "Olive Phenolic Compounds: Metabolic and Transcriptional Profiling During Fruit Development", *BMC Plant Biology*, 12, 162 (2012).
- [231] Yorulmaz, A., Erinc, H., and Tekin, A., "Changes in Olive and Olive Oil Characteristics During Maturation", *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(5), 647-658, (2013).
- [232] Chen, D. and Texada, D.E., "Low-Usage Codons and Rare Codons of *Escherichia Coli*", *Gene Therapy and Molecular Biology*, 10, 1-12, (2006).
- [233] Dumon-Seignovert, L., Cariot, G., and Vuillard, L., "The Toxicity of Recombinant Proteins in *Escherichia coli*: A Comparison of Overexpression in B121(De3), C41(De3), and C43(De3)", *Protein Expr Purif*, 37(1), 203-6, (2004).
- [234] Papalazaridou, A., Charitidou, L., and Sivropoulou, A., "Beta-Glucosidase Enzymatic Activity of Crystal Polypeptide of the *Bacillus Thuringiensis* Strain 1.1", *J Endotoxin Res*, 9(4), 215-24, (2003).
- [235] Saida, F., "Overview on the Expression of Toxic Gene Products in *Escherichia Coli*", *Curr Protoc Protein Sci.*, 5(19), (2007).
- [236] Freisinger, E., "Spectroscopic Characterization of a Fruit-Specific Metallothionein: *M. Acuminata* Mt3", *Inorganica Chimica Acta*, 360(1), 369-380, (2007).
- [237] Peroza, E. and Freisinger, E., "Metal Ion Binding Properties of *Tricium Aestivum* Ec-1 Metallothionein: Evidence Supporting Two Separate Metal Thiolate Clusters", *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12(3), 377-391, (2007).
- [238] Yapi Assoi Yapi, D., Gnakri, D., Lamine Niamke, S., and Patrice Kouame, L., "Purification and Biochemical Characterization of a Specific Beta-Glucosidase from the Digestive Fluid of Larvae of the Palm Weevil, *Rhynchophorus Palmarum*", *J Insect Sci*, 9, 4, (2009).
- [239] Chauve, M., Mathis, H., Huc, D., Casanave, D., Monot, F., and Lopes Ferreira, N., "Comparative Kinetic Analysis of Two Fungal Beta-Glucosidases", *Biotechnol Biofuels*, 3(1), 3, (2010).

- [240] Hsieh, M.-C. and Graham, T.L., "Partial Purification and Characterization of a Soybean B-Glucosidase with High Specific Activity Towards Isoflavone Conjugates", *Phytochemistry*, 58(7), 995-1005, (2001).
- [241] Sasanuma, I. and Hirakawa, G., "Purification and Characterization of a Beta-Glucosidase from the Root Parasitic Plant *Orobanche Minor* Sm", *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(3), 646-8, (2010).
- [242] Gerardi, C., Blando, F., Santino, A., and Zacheo, G., "Purification and Characterisation of a B-Glucosidase Abundantly Expressed in Ripe Sweet Cherry (*Prunus Avium* L.) Fruit", *Plant Science*, 160(5), 795-805, (2001).
- [243] Warzecha, H., Gerasimenko, I., Kutchan, T.M., and Stockigt, J., "Molecular Cloning and Functional Bacterial Expression of a Plant Glucosidase Specifically Involved in Alkaloid Biosynthesis", *Phytochemistry*, 54(7), 657-66, (2000).
- [244] Cameron, R.G., Manthey, J.A., Baker, R.A., and Grohmann, K., "Purification and Characterization of a Beta-Glucosidase from *Citrus Sinensis* Var. Valencia Fruit Tissue", *J Agric Food Chem*, 49(9), 4457-62, (2001).
- [245] Kuntothom, T., Luang, S., Harvey, A.J., Fincher, G.B., Opassiri, R., Hrmova, M., and Ketudat Cairns, J.R., "Rice Family Gh1 Glycoside Hydrolases with B-D-Glucosidase and B-D-Mannosidase Activities", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 491(1-2), 85-95, (2009).
- [246] Luijendijk, T.J.C., Stevens, L.H., and Verpoorte, R., "Purification and Characterisation of Strictosidine B-D-Glucosidase from *Catharanthus Roseus* Cell Suspension Cultures", *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(6), 419-425, (1998).
- [247] Turan, Y. and Zheng, M., "Purification and Characterization of an Intracellular Beta-Glucosidase from the Methylophilic Yeast *Pichia Pastoris*", *Biochemistry (Mosc)*, 70(12), 1363-8, (2005).
- [248] Dundar, E., Suakar, O., Unver, T., and Dagdelen, A., "Isolation and Expression Analysis of Cdnas That Are Associated with Alternate Bearing in *Olea Europaea* L. Cv. Ayvalik", *BMC Genomics*, 14(1), 219, (2013).
- [249] Cozza, R., Bruno, L., and Bitonti, M., "Expression Pattern of a Type-2 Metallothionein Gene in a Wild Population of the Psammophyte *Silene Nicaeensis*", *Protoplasma*, 250(1), 381-389, (2013).
- [250] Mir, G., Domenech, J., Huguet, G., Guo, W.J., Goldsbrough, P., Atrian, S., and Molinas, M., "A Plant Type 2 Metallothionein (Mt) from Cork Tissue Responds to Oxidative Stress", *J Exp Bot*, 55(408), 2483-2493, (2004).
- [251] Chen, W.M., Hsieh, H.M., and Huang, P.C., "Type 2 Rice Metallothionein-Like Gene Has Two Introns", *DNA Seq*, 8(4), 223-8, (1998).

- [252] Miyashita, N.T., Yoshida, K., and Ishii, T., "DNA Variation in the Metallothionein Genes in Wild Rice *Oryza Rufipogon*: Relationship between DNA Sequence Polymorphism, Codon Bias and Gene Expression", *Genes Genet Syst*, 80(3), 173-83, (2005).
- [253] Xia, Y., Lv, Y., Yuan, Y., Wang, G., Chen, Y., Zhang, H., and Shen, Z., "Cloning and Characterization of a Type 1 Metallothionein Gene from the Copper-Tolerant Plant *Elsholtzia Haichowensis*", *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5), 1819-1826, (2012).
- [254] Hudspeth, R.L., Hobbs, S.L., Anderson, D.M., Rajasekaran, K., and Gula, J.W., "Characterization and Expression of Metallothionein-Like Genes in Cotton", *Plant Molecular Biology*, 31(3), 701-5, (1996).
- [255] Tanguy, A., Boutet, I., Bonhomme, F., Boudry, P., and Moraga, D., "Polymorphism of Metallothionein Genes in the Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* as a Biomarker of Response to Metal Exposure", *Biomarkers*, 7(6), 439-50, (2002).
- [256] David, E., Tanguy, A., and Moraga, D., "Characterisation and Genetic Polymorphism of Metallothionein Gene Cgmt4 in Experimental Families of Pacific Oyster *Crassostrea Gigas* Displaying Summer Mortality", *Biomarkers*, 17(1), 85-95, (2012).
- [257] Huang, G.-Y., Wang, Y.-S., and Ying, G.-G., "Cadmium-Inducible Bgmt2, a Type 2 Metallothionein Gene from Mangrove Species (*Bruguiera Gymnorrhiza*), Its Encoding Protein Shows Metal-Binding Ability", *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 405, 128-132, (2011).
- [258] Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C., and Jackson, P.J., "Plant Metallothioneins", *Biochem J*, 295 (1), 1-10, (1993).
- [259] Robinson, N.J., Wilson, J.R., and Turner, J.S., "Expression of the Type 2 Metallothionein-Like Gene Mt2 from *Arabidopsis thaliana* in Zn(2+)-Metallothionein-Deficient *Synechococcus* Pcc 7942: Putative Role for Mt2 in Zn²⁺ Metabolism", *Plant Molecular Biology*, 30(6), 1169-79, (1996).
- [260] Jin, S., Cheng, Y., Guan, Q., Liu, D., Takano, T., and Liu, S., "A Metallothionein-Like Protein of Rice (Rgmt) Functions in *E. Coli* and Its Gene Expression Is Induced by Abiotic Stresses.", *Biotechnol Lett.*, 28(21), 1749-1753, (2006).
- [261] Ingham, D.J., Beer, S., Money, S., and Hansen, G., "Quantitative Real-Time Pcr Assay for Determining Transgene Copy Number in Transformed Plants", *Biotechniques*, 31(1), 136-40, (2001).
- [262] Guo, W.-J., Bundithya, W., and Goldsbrough, P.B., "Characterization of the *Arabidopsis* Metallothionein Gene Family: Tissue-Specific Expression and Induction During Senescence and in Response to Copper", *New Phytologist*, 159(2), 369-381, (2003).

- [263] Schor-Fumbarov, T., Goldsbrough, P., Adam, Z., and Tel-Or, E., "Characterization and Expression of a Metallothionein Gene in the Aquatic Fern *Azolla Filiculoides* under Heavy Metal Stress", *Planta*, 223(1), 69-76, (2005).
- [264] van Hoof, N., A. L. M., Hassinen, V.H., Hakvoort, H.W., Ballintijn, K.F., Schat, H., Verkleij, J.A., Ernst, W.H., Karenlampi, S.O., and Tervahauta, A.I., "Enhanced Copper Tolerance in *Silene Vulgaris* (Moench) Garcke Populations from Copper Mines Is Associated with Increased Transcript Levels of a 2b-Type Metallothionein Gene", *Plant Physiol*, 126, 1519-1526, (2001).
- [265] Guo-Yong Huang and Wang, Y.-S., "Expression and Characterization Analysis of Type 2 Metallothionein from Grey Mangrove Species (*Avicennia marina*) in Response to Metal Stress", *Aquatic Toxicology*, 99, 86-92, (2010).

EKLER

6. EKLER

EK A Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Bilimsel Çalışmalar

1. Sönmez GD., Dündar E., *Turan Y.* 2010 Zeytinde Beta-Glukozidaz Geninin Moleküler Ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. Denizli
2. Sönmez GD., Dündar E., Suakar Ö. 2012. Zeytin Beta Glukozidaz Geninin Ekspresyon Profili ve Genomik Kopya Sayısının Belirlenmesi. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi. İZMİR
3. Sönmez GD., Dündar E. 2012. Zeytin beta glukozidaz geninin intron - ekzon analizi ve polimorfizminin tespiti. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. ANTALYA
4. Dündar E., Sönmez GD. 2012. Zeytin Tahmini Metalotiyonein Geninin (*OeMT*) Moleküler ve Biyokimyasal Analizi, 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. ANTALYA