**T.C.**
**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ZEYTİN (*Olea europaea*) EST'LERİ (Expressed Sequence Tags) KOLEKSİYONUNDAN SEÇİLEN LİPİD TRANSFER GENİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

**DİLEK ÇAĞLAR**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**
**MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN**
**DOÇ. DR. NEHİR ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK**

**İSTANBUL, 2015**

**T.C.**

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

# ZEYTİN (*Olea europaea*) EST'LERİ (Expressed Sequence Tags) KOLEKSİYONUNDAN SEÇİLEN LİPİD TRANSFER GENİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Dilek ÇAĞLAR tarafından hazırlanan tez çalışması 27.03.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Doç. Dr. Semiha Erişen

Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Filiz Gürel

İstanbul Üniversitesi _____

Bu çalışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 2011-01-07-YULAP04 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

# ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgisini ve deneyimlerini benden esirgemeyen çok değerli Tez Danışmanı Hocam Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Şenay VURAL KORKUT'a desteği ve yardımları için çok teşekkür ederim.

Bu süreç boyunca desteğini bir an olsun benden esirgemeyen, bana olan inançlarını kaybetmedikleri için ailemin tüm değerli üyelerine sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yardımlarından müteşekkir olduğum Munise Yurtsever'e, yüksek lisans dönem arkadaşlarım ve beni motive eden iş arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Mart, 2015

Dilek ÇAĞLAR

# İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ ..... ix

KISALTMA LİSTESİ ..... x

ŞEKİL LİSTESİ ..... xii

ÇİZELGE LİSTESİ ..... xiii

ÖZET ..... xiv

ABSTRACT ..... xvi

BÖLÜM 1

GİRİŞ ..... 1

1.1 Literatür Özeti ..... 1
1.2 Tezin Amacı ..... 4
1.3 Hipotez ..... 4

BÖLÜM 2

LİPİD TRANSFER PROTEİNLERİ VE İŞLEVLERİ ..... 5

2.1 Lipid Transfer Proteinleri ..... 5
2.2 Lipid Transfer Proteinlerinin Sınıflandırılması ..... 8
2.2.1 LTP 1 Ailesi ..... 11
2.2.2 LTP 2 Ailesi ..... 12
2.2.3 LTP-Benzeri Diziler ..... 13
2.2.4 Geniş Lipid Transfer Proteinleri (LLTP) Ailesi ..... 13
2.3 Üçüncül Yapıları ..... 14
2.4 Lipid Transfer Proteinlerinin Çalışma Yöntemi ..... 15
2.5 Ekspresyon Modelleri ..... 16
2.6 LTP'lerin Yerleşim Yerleri ..... 17
2.7 Biyolojik Rolleri ..... 17
2.7.1 Kütin Oluşumu ve Embriyogenezis ..... 19
2.7.2 Patojenlere Karşı Savunma Reaksiyonları ..... 20

2.7.3 Simbiyozis ..... 22
2.7.4 Çeşitli Çevresel Koşullara Bitkilerin Adaptasyonları ..... 23
2.8 Zeytin ..... 24
2.8.1 Zeytinin Sınıflandırılması ..... 24
2.8.2 *O. Europaea'*nın Dünyadaki Ve Türkiye'deki Yayılışı ..... 24
2.9 Zeytin ve Stres ..... 25
2.10 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) ..... 26

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD ..... 29

3.1 Bitki Materyali ..... 29
3.2 Tamponlar ve Çözeltiler ..... 29
3.3 Moleküler Markerlar ..... 30
3.4 Enzimler ..... 30
3.5 Kitler ..... 31
3.6 Besiyerleri ..... 31
3.6.1 Luria Broth (LB) ..... 31
3.6.2 SOB ..... 32
3.7 Oligonükleotidler ..... 32
3.8 Programlar ..... 33
3.8.1 Chromas ..... 34
3.8.2 Primer3 ..... 34
3.8.3 BLAST ..... 34
3.8.4 EMBOSS Transeq ..... 34
3.9 Bitki Büyütme Koşulları ..... 34
3.10 Bitki Örneklerinin Alınması ..... 35
3.11 RNA İzolasyonu ..... 35
3.11.1 RNA İzolasyonu İçin Hazırlık ..... 35
3.11.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu ..... 35
3.11.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi ..... 36
3.12 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi ..... 36
3.12.1 Formaldehit Jelinin Hazırlanması ..... 36
3.12.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması ..... 36
3.12.3 Primerlerin Tasarlanması ..... 37
3.13 RT PCR ..... 37
3.13.1 cDNA Sentezi ..... 37
3.14 3' RACE ..... 37
3.14.1 PCR Reaksiyonu ..... 37
3.14.2 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi ..... 38
3.14.3 PCR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu ..... 38
3.14.4 Vektör Ligasyonu ..... 38
3.14.5 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması ..... 40
3.14.6 Transformasyon ..... 40
3.14.6.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması ..... 40
3.14.7 Plazmitlerin İzolasyonu ..... 40
3.15 5' RACE ..... 41

3.15.1 cDNA Sentezi ..... 41
3.15.2 cDNA'nın Saflaştırılması ..... 41
3.15.3 TdT Kuyruğu Eklenmesi ..... 42
3.15.4 PCR Reaksiyonu ..... 42
3.15.5 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi ..... 42
3.15.6 Nested PCR Reaksiyonu ..... 42
3.15.7 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi ..... 43
3.15.8 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu ..... 43
3.15.9 Vektör Ligasyonu ..... 43
3.15.10 Transformasyon ..... 43
3.15.11 Plazmit İzolasyonu ..... 43

BÖLÜM 4

SONUÇLAR ..... 44

4.1 Bitki Örneklerinin Alınması ..... 44
4.2 RNA İzolasyonu ..... 44
4.3 PCR ile İlgili Sonuçlar ..... 45
4.3.1 RT-PCR ..... 45
4.3.2 3' RACE İle İlgili Sonuçlar ..... 45
4.3.3 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu ve Transformasyon ..... 46
4.3.4 Plazmit İzolasyonu ..... 47
4.3.5 Dizi Analizi ve Benzerlik Analizleri ..... 47
4.3.6 5' RACE İle İlgili Sonuçlar ..... 51
4.3.7 Nested PCR Reaksiyonu ..... 52
4.3.8 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu ve Transformasyon ..... 53
4.3.9 Plazmit İzolasyonu ..... 53
4.3.10 Dizi Analizi ve Benzerlik Analizleri ..... 54

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE ÖNERİLER ..... 57

KAYNAKLAR ..... 59

EK-A

EK-A: LTPF15(6)_B10 DİZİN ANALİZİ, BLASTN VE BLASTP SONUCU ..... 72
A-1 LTPF15(6)_B10 NÜKLEOTİD DİZİNİ VE AMİNOASİT DİZİNİ ..... 72
A-2 LTPF15(6)_B10 BLASTN DİZİ ANALİZ SONUÇLARI ..... 72
A-3 LTP15(6)_B10 BLASTP ANALİZİ SONUÇLARI ..... 75

EK-B

EK-B: LTPR6_9 DİZİN ANALİZİ, BLASTN VE BLASTP SONUCU ..... 76
B-1 LTPR6_9 NÜKLEOTİD DİZİNİ VE AMİNOASİT DİZİNİ ..... 76
B-2 LTPR6_9 BLASTN DİZİ ANALİZ SONUÇLARI ..... 76
B-3 LTPR6_9 BLASTP DİZİ ANALİZ SONUÇLARI ..... 76

ÖZGEÇMİŞ ..... 79

## SİMGE LİSTESİ

| | |
|---|---|
| bç | Baz çifti |
| kb | Kilobaz |
| L | Litre |
| mg | Miligram |
| ml | Mililitre |
| µl | Mikrolitre |
| mM | Milimolar |
| nM | Nanomolar |
| U | Ünite |
| UV | Ultraviyole |
| v/v | Hacim/Hacim |
| w/v | Ağırlık/Hacim |
| °C | Santigrat Derece |
| pH | Hidrojenin Gücü |

## KISALTMA LİSTESİ

| | |
|---|---|
| AAP | Kısaltılmış Bağlantı Primeri |
| ABA | Absisik Asit |
| AUAP | Kısaltılmış Kapsamlı Çoğaltma Primeri |
| BLAST | Dizi Homolojisi Arama Motoru |
| cDNA | Tamamlayıcı DNA |
| CM | Sistein Motifi |
| DEPC | Di Etil Piro Karbonat |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| dNTP | Deoksiribo Nükleozid Fosfat |
| EDTA | Etilen Di Amin Tetra Asetik Asit |
| EST | Fonksiyonel Gen Dizisi |
| FAO | Gıda Ve Tarım Örgütü |
| GSP1 | Gen Spesifik Primer 1 |
| GSP2 | Gen Spesifik Primer 2 |
| GSP3 | Gen Spesifik Primer 3 |
| DEPC | Di Etil Piro Karbonat |
| IPTG | İzopropil β-D- Tiyogalaktozid |
| KCl | Potasyum Klorür |
| LB | Luria Broth |
| LTP | Lipid Transfer Proteini |
| LLTP | Geniş Lipid Transfer Protein |
| nsLTP | Spesifik Olmayan Lipid Transfer Proteini |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| NCBI | Ulusal Biyoteknoloji Merkezi |
| $MgCl_2$ | Magnezyum Klorür |
| MOPS | 3-(-N-morfolino) Propan Sülfonik Asit |
| mRNA | Mesajcı Ribonükleik Asit |
| MTP | Mikrozomal Trigliserit Transfer Protein |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PDB | Protein Veri Bankası |
| Pmole | Pikamol |
| PR | Patogenez İlişkili |

| | |
|---|---|
| RACE | cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RPM | devir/dakika |
| RT | Ters Transkriptaz |
| SA | Sodyum Salisilat |
| SOB | Süper Optimal Broth |
| TAE | Tris-Asetat-EDTA |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TdT | Terminal Dioksinükleotidil Transferaz |
| X-Gal | 5-Brom-4-Kloro-3-İndol-β-D-Galaktozid |
| Vtg | Vitellogenin |

## ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 5 3’ RACE yönteminin şematik özet ..... 8
Şekil 2. 2 Pirinç, Arabidopsis ve buğday nsLTP tiplerinde bulunan sekiz sistein molekülünün çeşitliliği ..... 10
Şekil 2. 3 Arpa lipid transfer proteininin disülfit bağları ..... 15
Şekil 2. 4 Türkiye’de bölgelere göre zeytin ağaç sayısı oranı ..... 25
Şekil 2. 5 3’ RACE yönteminin şematik özeti ..... 27
Şekil 2. 6 5' RACE yönteminin şematik özeti ..... 28
Şekil 3. 1 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi ..... ..39
Şekil 3. 2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi ..... 39
Şekil 4. 1 RNA’ların %1’lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi ..... 45
Şekil 4. 2 3' RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü ..... 46
Şekil 4. 3 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü ..... 47
Şekil 4. 4 Dizinin özelliği hakkında bilgi verir ve benzerlik skorunu grafiksel olarak gösterir ..... 48
Şekil 4. 5 İncelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir ..... 49
Şekil 4. 6 Benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir ..... 50
Şekil 4. 7 5' RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü ..... 52
Şekil 4. 8 PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü ..... 53
Şekil 4. 9 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1’lik agaroz jel üzerinde görüntüsü ..... 54
Şekil 4. 10 DNA fragmenti dizisinin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü ..... 54-55

## ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa


Çizelge 1. 1 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP genleri ..... 1-2
Çizelge 1. 2 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP kodlayan genlerde belirlenen intron uzunlukları..... 2-3
Çizelge 2. 1 Lipid transfer proteinlerinin tahmini fonksiyonlarına, alternatif splicing ve subsellüler yerleşimlerine göre sınıflandırılması ..... 9
Çizelge 2. 2 nsLTPDB'lerde saptanan nsLTP'lerdeki sekiz sistein motifinin çeşitliliği..... 10
Çizelge 2. 3 LTP 1 ailesinin yapısal özeti ..... 11-12
Çizelge 2. 4 Zeytinin taksonomisi ..... 24
Çizelge 3. 1 Tampon ve çözeltiler ..... 29-30
Çizelge 3. 2 Moleküler markerlar ..... 31
Çizelge 3. 3 Enzimler ..... 31
Çizelge 3. 4 Kitler ..... 31
Çizelge 3. 5 LB ..... 31-32
Çizelge 3. 6 SOB ..... 32
Çizelge 3. 7 Oligonükleotidler ..... 32-33-34
Çizelge 4. 1 LTP15(6)_B10 BLASTN sonuçları ..... 51
Çizelge 4. 2 LTP15(6)_B10 BLASTP sonuçları ..... 51
Çizelge 4. 3 LTP6_9 BLASTN sonuçları ..... 55
Çizelge 4. 4 LTP6_9 BLASTP sonuçları ..... 56

# ÖZET

## ZEYTİN (*Olea europaea*) EST'LERİ (Expressed Sequence Tags) KOLEKSİYONUNDAN SEÇİLEN LİPİD TRANSFER GENİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Dilek ÇAĞLAR

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Nehir ÖZDEMİR ÖZGENTÜRK

Günümüzde kullanılan sınıflandırma sistemlerine göre zeytin, 24 cins 600 türe sahip olan *Oleaceae* familyasına dahildir [1]. Bölümümüz laboratuvarında daha önce yapılan çalışmada, zeytin bitkisinin yaprak ve meyve örnekleri kullanılarak iki cDNA kütüphanesi kurulmuş, kütüphanelerden rastgele seçilen 3840 adet klon örneklerinin dizi analizleri yapılarak zeytin için EST koleksiyonu oluşturulmuştur. Bu çalışma sonucu elde edilen gen dizinlerinden Phred/Phrap, CAP3 programları kullanılarak kontigler oluşturulmuştur. Çalışmamız için, EST koleksiyonunda stresle ilgili genlerin varlığı araştırılmıştır. Önemli bir stres geni olan lipid transfer geninin dizi bilgisine kontigler ve EST'ler içerisinde rastlanmıştır. Lipid transfer geninin klonlanması amacıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tabanlı moleküler bir yöntem olan RACE (cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı) kullanılmıştır. Kütüphaneden elde edilen kontig dizin bilgisinin 3' ve 5' uçlarına RACE kitinin kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi spesifik primerler tasarlanmıştır.

Zeytinden izole edilen total RNA'dan ters transkriptaz ile cDNA elde edilmiştir. Invitrogen RACE kitinin protokolü kullanılarak ilk aşamada lipid transfer proteinini kodlayan gene spesifik primer tasarlanarak cDNA'nın 3' ucu uzatılmıştır. Elde edilen cDNA, pGEM-T vektörüne ligasyon ve *E. coli* kompotent hücrelerine transformasyon aşamalarından sonra plazmid izole edilmiş ve plazmidin istediğimiz geni içerip içermediğini öğrenmek üzere dizin analizine gönderilmiştir. Dizin bilgisi, NCBI veritabanındaki sonuçlarla kıyaslanmış ve kısmi lipid transfer proteini kodlayan gen olduğu belirlenmiştir. Dizin bilgisi kullanılarak, elde edilen cDNA'nın 5' ucuna spesifik primer tasarlanmıştır ve bu primer kullanılarak PCR yöntemi ile cDNA'nın 5' ucu uzatılmıştır. Ligasyon ve kompotent hücrelerine transformasyon aşamalarından sonra plazmid izolasyonu yapılmıştır. Dizin bilgisi elde edilmek üzere dizin analizine gönderilmiştir. Elde edilen dizin bilgisi, NCBI veritabanındaki sonuçlarla kıyaslanmış ve kısmi lipid transfer proteini kodlayan gen olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada, gemlik bitkisinde stresle indüklenen ve bitkide lipid transferi, patojenlere karşı savunma, kütin oluşumu, embriyogenezis, simbiyozis gibi önemli biyolojik görevlere katılan lipid transfer proteini kodlayan genin tamamının klonlanması için ön çalışma yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Zeytin, RACE, Lipid Transfer Proteinleri

## ABSTRACT

---

### MOLECULAR ANALYSIS OF LIPID TRANSFER GENE SELECTED FROM OLIVE (*Olea europaea*) ESTs (Expressed Sequence Tags) COLLECTION

Dilek CAGLAR

Department of Molecular Biology and Genetic

MSc. Thesis

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nehir OZDEMIR OZGENTURK

According to the classification systems; the olive is a species in the *Oleaceae* family comprises 600 species in 24 genus [1]. Previously, in our department two cDNA libraries were constructed from young olive leaves and fruits for generation of ESTs (Expressed Sequence Tags), 3840 colonies which were randomly selected from the libraries were sequenced for obtained olive ESTs collection. The sequences were assembled in to contig with the Phred / Phrap, CAP3 programs. For this study, the presence of genes related to stress in EST collection, which prepared for the fruit and the olive leaves, were investigated. A major stress genes, lipid-transfer gene's sequence informations were found in EST's and contigs. This important stress gene, lipid transfer gene, was intended to clone. The purpose of gene cloning, full-length lipid-transfer gene was tried to obtain by using RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends), is a method of molecular-based PCR (Polymerase Chain Reaction). Specific

primers were designed as described in the user manual of the RACE kit to the 3 'and 5' ends which was obtained from the sequence information of EST and the contig which are related to lipid transfer gene.

Total RNA was extracted from olive and used for obtaining cDNA by reverse transcription. As following Invitrogen RACE kit user manual instructions, specific primer was initially designed and the gene specific primer used for elongation of lipid transfer protein gene's 3' end. After ligation to the pGEM-T vector and transformation to *E. coli* competent cells of the obtained DNA, plasmid was isolated and the plasmid was sent for sequencing which to find out if it was containing our interested gene. The sequence information was compared with the results in NCBI database and determined that it was a partial lipid transfer protein gene. The 5' end gene specific primer was designed using the sequence information and the primer was used for elongation of the cDNA's 5' end. After ligation and transformation steps, plasmid was isolated. The plasmid was sent for sequence analysis. The obtained sequence information was compared with the results in NCBI database and confirmed that it was lipid transfer protein gene.

In this study, the preliminary studies were done to clone full length lipid transfer protein gene which is induced by stress and pariticipating to biological roles such as facilitate transfer of the lipids, defense reactions against pathogens, cutin formation, embryogenesis, symbiosis in Gemlik plant.

**Key words:** Olive, RACE, Lipid Transfer Protein

# BÖLÜM 1

# GİRİŞ

## 1.1 Literatür Özeti

Bitkide LTP (Lipid Transfer Proteini) kodlayan ilk cDNA, mısır filizlerinden ekstrakte edilen mRNA'lar kullanılarak oluşturulan kütüphaneden izole edilmiştir. Oluşturulan cDNA kütüphanesi, mısır LTP'si için hazırlanmış poliklonal antikorlar ile taranmıştır. cDNA klonundan çıkarılan aminoasit dizisinin, 27 aminoasit dışında, saflaştırılan proteinde belirlenen dizilerle uyumlu olduğu görülmüştür [2].

LTP gen ailesi oldukça kompleksdir. LTP kodlayan birden fazla cDNA aynı bitkide karakterize edilmiştir [3]. Mısırda bu durum, bu proteinler için RNA kodlaması sırasında alternatif kırpılma mekanizması ile açıklanmıştır [4]. Birden fazla LTP kodlayan genin varlığı yapılan Southern blot analizi ile doğrulanmıştır [5]. Hemen hemen bütün genler, dur kodonundan 2 kodon önce, proteinin C-terminisuna göre bir bölgeye yerleşmiş tek bir introna sahiptirler. İntronun uzunluğu ise bir genden bir gene değişiklik göstermektedir (Çizelge 1.2). Sadece arpa [6] ve *Sorghum* [7] genlerinden birer tanesinde intron bulunamamıştır.

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP kodlayan genlerde belirlenmiş intron uzunlukları

| Kaynak | İntron Uzunluğu | Referans |
|---|---|---|
| Pirinç | 89 bç | [8] |

Çizelge 1.1 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP kodlayan genlerde belirlenmiş intron uzunlukları (devamı)

| | | |
|---|---|---|
| Sorghum | 114 bç | [7] |
| *Arabidopsis thaliana* | 115 bç | [9] |
| Arpa | 113 bç | [10] |
| Brokoli | 271 bç | [11] |
| Tütün | 980 bç | [12] |

Biyotik/abiyotik streslere maruz bırakılan çeşitli bitkilerde, lipid transfer proteini kodlayan genlerin izolasyonu yapılmıştır. Örneğin; George ve Parida [13], strese maruz bırakılmış iki aylık *P. julifora* bitkisinin yaprak dokularından cDNA kütüphanesi oluşturmuştur. Stres indüklü transkriptlerle zenginleştirilmiş cDNA kütüphanesinde lipid transfer genini kodlayan cDNA klonunun, bol miktarda bulunduğu saptanmıştır.

Lipid transfer protein kodlayan çok sayıda gen çeşitli bitki, hayvan, bakteri ve fungilerden izole edilmiştir.

Çizelge 1.2 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP genleri

| **Kaynak** | **Gen veya cDNA** | **Referans** |
|---|---|---|
| *Arabidopsis thaliana* | 15 LTP geni | [14] |
| *Zea mays* (Mısır) | 2 LTP geni | [15] |
| Biber | 8 LTP geni | [16] |
| *Lycopersicon esculentum* (Domates) | 2 LTP geni | [17]<br>[18] |
| *Euphorbia lagascae* | 2 LTP geni | [19] |
| Lahana | 5 LTP geni | [20] |
| *Hordeum vulgare* (Arpa) | 7 LTP geni | [21], [22] |

Çizelge 1.2 Çeşitli bitkilerden izole edilen LTP genleri (devamı)

| | | |
|---|---|---|
| *Daucus carota* (Havuç) | 1 LTP geni | [23] |
| *Oryza sativa* (Pirinç) | 3 LTP geni | [24] |
| *Gossypium hirsutum* (Pamuk) | 11 LTP geni | [25] |
| *Triticum durum* (Buğday) | 23 LTP geni | [26] |
| *Brassica napus* (Brokoli) | 4 LTP geni | [11] |
| *Sorghum vulgare* | 5 LTP geni | [7] |
| *Spinacia oleracea* (Ispanak) | 1 LTP geni | [27] |
| *Pinus taeda* | 14 LTP geni | [28] |
| *Gerbera hybrida* | 2 LTP geni | [29] |

Biber bitkisi, *Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria*, *Phytophthora capsici* ve *Colletotricum gloeosporioides* patojenlerine, abiyotik ve çevresel streslere maruz bırakılarak patojen indüklü genlerinin izolasyonu yapılmıştır. Patojenik veya non-patojenik bakteriler tarafından infekte edilen sistemik yapraklarda LTP'lerin indüklendiği saptanmıştır [30].

Bir başka çalışmada Yubero-Serrano vd. [31], ABA, yaralama, SA (sodyum salisilat), tuzluluk, sıcak ve soğuk şok stresleri uygulanmış çilek meyvesi ve yaprakları kullanılarak cDNA çıkarım kütüphanesi oluşturulmuştur. ABA, SA ve yaralama stresi uygulanmasından 24 saat sonra çilek yapraklarında lipid transfer protein (Fxaltp) transkriptlerinin arttığı bulunmuştur.

Jang vd. [32], soğuk stresi ve ABA (absisik asit) uygulanmış buğday-çavdar translokasyon hattının 4 haftalık yapraklarından oluşturulan cDNA kütüphanesinden anlatımı artan LTP'lerin izolasyonu yapılmıştır.

Lipid transfer proteinini kodlayan fiber-spesifik cDNA (GH3) kullanılarak, pamuk genomik kütüphanesi taranmıştır. LTP geni içeren bir genomik klonun karakterize olduğu görülmüş ve klonlanlanmıştır [33].

Çalışmamızda kullanıdığımız zeytin bitkisinde LTP geninin klonlanması ile ilgili herhangi bir çalışma sonucu henüz yayınlanmamıştır.

## 1.2 Tezin Amacı

Lipid transfer geni stres karşısında indüklenen, bitkinin strese girdiğini gösteren önemli bir stres genidir. Bu gen farklı organizmalarda klonlanmış olmasına rağmen zeytin bitkisi için lipid transfer geni klonlanmamıştır. Bu amaçla EST koleksiyonu bu gen için taranmış ve bu gen için kısmi gen bölgeleri tespit edilmiştir. Bu dizi bilgilerinden yararlanılarak RACE (cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı) yöntemi kullanılması ile lipid transfer genin tam uzunlukta elde edilmesi amaçlanmıştır.

## 1.3 Hipotez

Zeytin (*Olea europaea*) Akdeniz Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen, ekonomik olarak değerli bir bitkidir. Meyveleri besin olarak tüketilmekte ve yağ üretimi için kullanılmaktadır. Tam uzunlukta elde edilen lipid transfer protein geni, ekspresyon vektörü içerisine klonlandığında zeytin bitkisi için önemli olan gen ürünü elde etmek mümkün olacaktır. Lipid transfer proteini saflaştırılarak aminoasit bilgisi elde edilecektir. Daha sonraki çalışmalar ile bu proteinin bitkinin stres faktörlerine karşı daha dayanıklı olabilmesi için kullanımının amaçlanması çalışmanın önemini arttırmaktadır. Ayrıca bazı işlenmiş meyvelerdeki LTP'ler insanlarda alerjik reaksiyonlar oluşturmaktadır. Bu durum insan sağlığını doğrudan etkilemektedir. LTP kodlayan genlerin bu meyvelerde susturulması ile bu durumun önüne geçilmesi sağlanabilir. Endüstriyel alanda LTP'ler arpa maltında bira kalitesini etkilemekte ve köpük oluşumunu sağlamaktadır. LTP kodlayan genler, endüstriyel uygulamalar, insan sağlığını etkileyen hipoalerjenik meyvelerin üretilmesi ve ayrıca bitkide patojenlere karşı savunma mekanizmalarına katılımı ile bitki verimliliğini arttırmak açısından oldukça önemli genlerdir. Bu çalışma sonucunda elde edilen sonuçlar bölümümüzde yürütülmekte olan Kapsamlı Araştırma Projesi için önemli bir kaynak oluşturacaktır.

# BÖLÜM 2

# LİPİD TRANSFER PROTEİNLERİ VE İŞLEVLERİ

## 2.1 Lipid Transfer Proteinleri

Lipid transfer proteinleri (LTP), yüksek yapılı bitkilerde fazla miktarlarda bulunan, jel izoelektrik noktaları 7-9 civarında olan ve filtrasyon veya SDS-jel elektroforezi ile doğrulanmış moleküler kütleleri 9000 dalton civarında olan temel proteinlerdir [34]. Bitkilerdeki bütün lipid transfer proteinleri, toplam çözünebilir proteinlerin yaklaşık %4'ünü oluşturmaktadır [15].

LTP'ler çok genli aile tarafından kodlanmaktadırlar bu yüzden farklı izoformlarının farklı fonksiyonlara karşılık geldiği görülmüştür [14]. LTP ailesinin farklı üyeleri**,** gen çoğaltımı sırasında bir dizi varyasyonunun bir sonucu olarak oluştuğu belirlenmiştir [35].

Bitki LTP'lerinin triptofanları bulunmamaktadır ve korunmuş bölgelerde 8 sistein motifine (CM) (C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-C-Xn-C) sahiptirler [36]. Sistein motifleri birbirlerine disülfit köprüleri ile bağlanmıştır [37]. Sistein motifleri arasındaki disülfit bağlar, hidrofobik bileşenlerin ve değişik lipidlerin bağlanmasına izin veren hidrofobik oluğu kararlı hale getirmektedir [38] Ayrıca bu bağlar, sıcaklık denaturasyonuna ve proteaz ataklarına yanıtta proteinin kararlılığını arttırmaktadır [39].

cDNA klonlarından ve genlerden elde edilen dizilerden, dizi homolojisi temel alınarak yapılan belirlemede LTP'lerin salgı yolağına girebildiklerini gösteren sinyal peptidlerinin varlığı gösterilmiştir [40]. Bütün bilinen bitki LTP'leri, sinyal peptidlerinin dizi karakteristiklerine sahip 27 veya 25 N-terminal motifleri içeren öncüller olarak

sentezlenmektedirler. Bu sinyal peptidin uzunluğu, LTP genine bağlı olarak 21'den 27'ye kadar değişmektedir [41].

Bitki LTP'leri inanılmaz derecede stabildirler [42] ve 4°C'de saklandıklarında dahi aylar sonra aktivitelerini korudukları saptanmıştır [43]. 90°C'de 5 dakika inkübasyona bırakılan mısır LTP'sinin transfer aktivitesini koruduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni yapısındaki disülfit köprülerinin varlığıdır [3].

Yapısal parametreler göz önüne alınarak molekülün merkezinde pozitif yüklü uzantılar, sistein motiflerinin pozisyonu veya profillerindeki esneklik, hidropati gibi genel karakteristik özellikler saptanmıştır [2]. Birçok substrata olan ilgilerinden dolayı sıklıkla nonspesifik LTP'ler (nsLTP) olarak düzenlenmektedirler [44]. Mısır filizlerindeki, ıspanak yapraklarındaki ve gene otu filizlerindeki temel lipid transfer proteinlerinin nonspesifik oldukları bulunmuştur [3].

*Arabidopsis thaliana*, *Sorghum vulgare,* domates, mısır, şeftali, kayısı, buğday, biber, *Euphorbia lagascae*, lahana, arpa, havuç ve pirinç gibi bitkilerden, mayalardan ve hayvanlardan birçok LTP geni izole edilmiştir.

Ekstrasellüler proteinlerdir. LTP'lerin, hücre duvarında salgılandıkları ve yerleştikleri bulunmuştur ve bu proteinlerin sitosolik oldukları saptanmıştır [9], [22]. Buna rağmen LTP'lerin ayrıca intrasellüler olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Soğuk iklim lahanasından (*Brassica oleracea*) nonspesifik lipid transfer protein sınıfına giren WAX9 proteini izole edilmiştir. Bu protein, donma-çözülme sırasında tilakoidleri hasardan koruyan bir kriyoprotektindir. Altın işaretli anti-WAX9 antikoru kullanılarak yapılan çalışmada bu protein, kloroplastta, sitosolde, mitokondride ve çekirdekte saptanmıştır [45]. İntrasellüler yerleşime yönelik farklı çalışmalarda mevcuttur. Mısır filizlerinde, LTP'ler sitoplazmada [46], mitokondride ve mikrozomlarda [47] saptanmıştır. *Ricinus communis* kotiledonlarında, LTP'ler glikozomlarda saptanmıştır [48].

LTP'lerin intrasellüler olarak saptanmalarına karşın ekstrasellüler matrikse direkt salgılanan [49] sinyal peptidlerine sahip preproteinler olarak sentezlendikleri bilinmektedir [50]. ER retention sinyallerinin (KDEL) bulunmaması sebebiyle spesifik bir organele salgılandıkları veya hedeflendikleri belirlenmiştir [51].

Çoğu nsLTP'ler (Spesifik Olmayan Lipid Transfer Proteini), cDNA klonlarından veya genlerden çıkarılan diziler temel alınarak dizi homolojilerine göre tanımlanmışlardır [2]. Memeli ve bitki LTP'leri arasında dizi homolojisi bulunamamıştır [52]. Çeşitli bitkilerden izole eden bitki LTP'lerinin tam aminoasit dizileri belirlenmiştir [2], [37], [53], [54], [55], [56]. Bitki LTP'leri, 91'den 95'e kadar değişen kalıntı içeren aminoasit sayısına sahiptirler [37].

LTP'ler bitkilerdeki bütün hücre tiplerinde bulunmamaktadırlar [9]. Havuçta yapılan in situ hibridizasyon çalışmasında LTP'lerin, embriyoların protoderm hücrelerinde, yaprak primordialarının epidermal hücrelerinde, yaprak organlarının tümünde ve gelişen tohumların epidermal dokularında ifade edildiği görülmüştür [23]. Ispanak [50], mısır [15], havuç [23] ve tütünde [12] yapılan Nothern blot analizinde bitkinin aerial (yaprak, gövde, sürgün mersitemleri) kısımlarında fazla miktarda ve kök dokularında ise çok az LTP ekspresyonunun gerçekleştiği veya hiç ekspresyonunun gerçekleşmediği saptanmıştır.

Hidrofobik bileşenlerin taşınması ile membranların yenilenmesinde önemli rol oynamaktadırlar [57], β-oksidasyonuna katılmaktadırlar [58].

Membranlar arasında fosfolipidlerin in vitro transferini arttırmaktadırlar ve acyl zincirlerini bağlamaktadırlar. *Ricinus communis*, ıspanak, ayçiçek ve kolzada acyl-CoA bağlayabildikleri saptanmıştır. Bitki LTP'lerinde acyl-CoA veya yağ asitlerini bağlamaları jel filtrasyon veya ısı bağımlı ligand afinitesi veya acyl-LTP kompleksinin ayrıştırılması ile kanıtlanmıştır [3]. Galaktolipidlerin, gangliosidlerin ve kolesterollerin transferinde rol oynamaktadırlar [59], [60]. Bu özellikler temel alınarak, LTP'lerin membran biyogenezine ve intrasellüler yağ asidi havuzlarının düzenlenmesine katıldığı belirlenmiştir.

LTP'lerin, kütin oluşumuna [8], [11], [23], embriyogeneze [61], fitopatojenlere karşı savunma reaksiyonlarına, simbiyozise ve çeşitli çevresel koşullarda bitkilerin adaptasyonuna [62] katıldıkları belirlenmiştir.

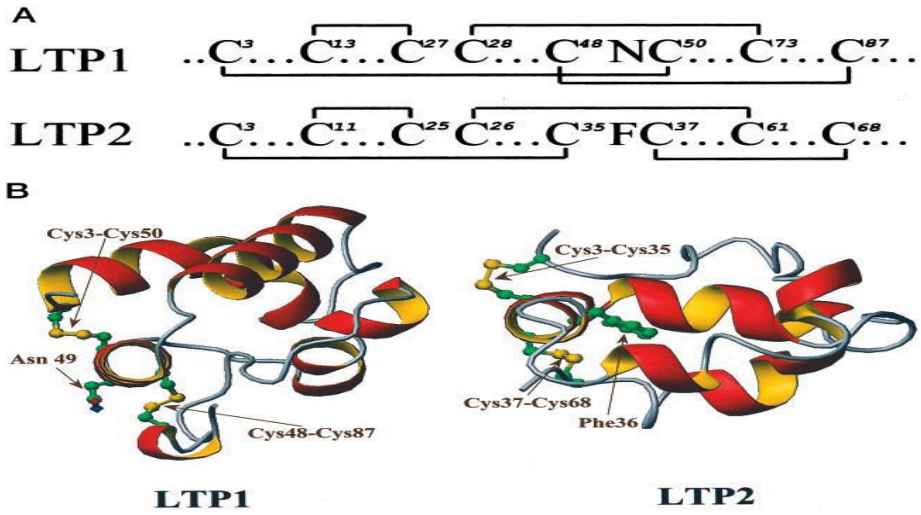
Patojen saldırısı, ağır metal uygulaması, NaCl, su eksikliği, soğuk gibi biyotik ve/veya abiyotik stresler tarafından uyarılabilmektedirler [17], [22], [61], [63], [64].

Hayvanlarda yüzlerce lipid molekülüne bağlanan ve bunların transferinde görev alan geniş lipid transfer protein aileleri bulunmaktadır [65].

## 2.2 Lipid Transfer Proteinlerinin Sınıflandırılması

Bitki lipid transfer proteinleri için günümüze kadar farklı sınıflandırmalar ortaya konulmuştur.

Molekül kütleleri göz önüne alınarak bitki nsLTP'ler başlangıçta 2 gruba ayrılmışlardır: tip I (9 kDa) ve tip II (7 kDa) (Şekil 2.1). Her iki tipin birincil dizi benzerlikleri (%30'dan az) ve lipid transfer etkinliği farklıdır [38]. Tip I nsLTP'ler uzun tünel benzeri bir oluğa sahiptir [66]. Buğday da tip II nsLTP komşu iki hidrofobik oluğa sahip olarak tanımlanmışlardır [67].




Şekil 2.1 Pirinç nsLTP1 ve nsLTP2 üç boyutlu yapısı [67]

Her iki tipin bitkilerdeki ortak karakteristik özelliği ise triptofandan yoksun olmalarıdır [68].

Bitki nsLTP'leri ile benzerlik gösteren birkaç anter spesifik protein, 8 sistein motifi (CM) yapısında aminoasit motiflerinin sayıları nedeniyle üçüncü tip olarak önerilmişlerdir [69].

Fakat şimdiye kadar tip III nsLTP'nin transfer yeteneğine dair bir veri bulunmamaktadır [68]. Yeni tanımlanmış nsLTP'eri karakterize etmek için bu tip sınıflandırma yeterli olmamaktadır [70].

Bir diğer sınıflandırmada LTP'ler 8 farklı tip olarak sınıflandırılmışlardır (Çizelge 2.1). Bu sınıflandırmada *Arabidopsis*'te acyl lipid metobolizmasına dahil olan genlerin dizileri belirlenmiş ve sınıflandırılmıştır. Bunun için 600 kodlanmış proteinin tahmini fonksiyonlarına, alternatif splicing ve subsellüler yerleşimlerine göre tanımlanmışlar, karakterize edilmişlerdir [71].

Çizelge 2.1 Arabidopsis'te lipid transfer proteinlerinin tahmini fonksiyonlarına, alternatif splicing ve subsellüler yerleşimlerine göre sınıflandırılması [71]

| Hücresel Fonksiyonu | Hücresel Aktivitesi | Gen Sayısı | EST Sayısı |
|---|---|---|---|
| Karışık | Z1a.LTP1 | 14 | 362 |
| | Z1b.LTP2 | 8 | 28 |
| | Z1c.LTP3 | 14 | 17 |
| | Z1d.LTP4 | 2 | 9 |
| | Z1e.LTP5 | 29 | 94 |
| | Z1f.LTP6 | 2 | 2 |
| | Z1g.LTP7 | 1 | 3 |
| | Z1h.LTP8 | 1 | 0 |

Diğer bir sınıflandırma ise LTP'leri 9 farklı tip olarak gruplandırmadır. Bu gruplandırmada tip I, tip II ve tip III nsLTP'ler 7 kDa civarında bir moleküler kütleye sahip bulunmuştur. Pirinç, *Arabidopsis* ve buğday nsLTP'lerinde yapılan sistein motiflerinin çoklu benzerlik analizi sonucunda çeşitli sayıda inter-sistein aminoasit kalıntılarının olduğu ortaya çıkmıştır (Şekil 2.2) [68].

9 tip sınıflandırma ile moleküler kütle ve nsLTP'ler arasındaki ilişki kompleks bir hal aldığı ve bu sınıflandırmanın nsLTP'ler için iyi bir kriter olmadığı gözlemlenmiştir.

| nsLTP Tipi | | 8 CM ve Komşu Amino Asit Kalıntılarının Sayısı | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | | 2 | | 3,4 | | 5 | | 6 [a] | | 7 [b] | | 8 [c] | |
| Type I | X2-9 | C | X9 | C | X13-15 | CC | X19 | C | X | C | X19-24 | C | X7,13,14 | C | X0-26 |
| Type II | X0-13 | C | X7 | C | X13,15 | CC | X8-10 | C | X | C | X16,21,23 [d] | C | X5,6 [e] | C | X0-2 |
| Type III | X2-7 | C | X9 | C | X14,16,19 | CC | X9 | C | X | C | X12 | C | X6 | C | X1,2,4 |
| Type IV | X0-7 | C | X9,10 | C | X15-17 [f] | CC | X9 [g] | C | X | C | X21-24,28 | C | X6-8,10 | C | X0,1,5 |
| Type V | X2-5,10 | C | X14 | C | X14 | CC | X11-13 | C | X | C | X24 | C | X10 | C | X6,10,12 |
| Type VI | X2-17 | C | X10 | C | X16,17 | CC | X9 | C | X | C | X22,23 [d] | C | X7,9 | C | X5-12 |
| Type VII | X4,50 | C | X9 | C | X15 | CC | X12 | C | X | C | X27 | C | X9,11 | C | X17,18 [h] |
| Type VIII | X3,12,21 | C | X6 | C | X13,14 | CC | X12 | C | X | C | X25 | C | X8 | C | X2,14,16 |
| Type IX | X2,21 | C | X13 | C | X15 | CC | X9 | C | X | C | X22 | C | X6 | C | X1,4 |

Şekil 2.2 Pirinç, *Arabidopsis* ve buğday nsLTP tiplerinde bulunan sekiz sistein molekülünün çeşitliliği [68]. a. 6 numaralı sistein motifi AtLTPII.10'da kayıp b. 7 numaralı sistein motifi TaLTPVIa.5'de kayıp c. 8 numaralı sistein motifi AtLTPI.I'de kayıp d. Alt aile üyeleri olan AtLTPII.10, OsLTPVI.I, OsLTPVI.2, OsLTPVI.4 ve TaLTPVIa ekstra bir sistein motifine sahiptir e. AtLTPII.6 ekstra bir sistein motifine sahiptir f. Alt aile üyeleri olan TaLTPIVc.I ve TaLTPIVa ekstra birer sistein motifine sahiptir g TaLTPIVd.I için 12 aminoasit motifi sayılmıştır, CXC motifi yoktur h. Alt aile üyeleri olan TaLTPVII.I ve TaLTPVIIa.I ekstra birer sistein motifine sahiptirler.

Boutrot'un karakterize ettiği 9'lu sınıflandırmaya karşı, karakterize edilen 595 adet nsLTP, dizi benzerliklerine göre 5 grupta sınıflandırılmıştır. Boutrot'un sistematiği temel alınmıştır (Çizelge 2.2). Tip I ve tip II karakterize edilen bütün bitkilerde bulunmuştur. Tip III sadece *Oryza sativa* ve *Arabidopsis*'te bulunmuştur. Tip IV ve tip V nsLTP, *Triticum aestivum, Oryza sativa, Sorghum bicolor* ve *Arabidopsis*'te bulunmuştur [72].

Çizelge 2.2 nsLTPDB'lerde saptanan nsLTP'lerdeki sekiz sistein motifinin çeşitliliği [72]

| 8 CM ve komşu aminoasit kalıntıları | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Tip | 1 | 2 | 3, 4 | 5, 6 | 7 | 8 |
| I $X_{0-12,16}$ | C $X_{8-10}$ | C $X_{12-17}$ | CC $X_{19-24}$ | CXC X | C $X_{7,13-15}$ | C $X_{26,37,48}$ |
| II $X_{0-20}$ | C $X_7$ | C $X_{13,15}$ | CC $X_{16,21,24}$ | CXC X | C $X_{4-7}$ | C $X_{0-2}$ |
| III $X_{0-7}$ | C $X_{9,10}$ | C $X_{12,15,17}$ | CC $X_{21-24,2}$ | CXC X | C $X_{6-10,13}$ | C $X_{0-5,10}$ |
| IV $X_{2-5,10}$ | C $X_{14}$ | C $X_{14}$ | CC $X_{24}$ | CXC X | C $X_{10}$ | C $X_{6,10,12}$ |
| V $X_{2-17}$ | C $X_{10}$ | C $X_{16,17}$ | CC $X_{22,23}$ | CXC X | C $X_{7,9}$ | C $X_{5-12}$ |

Bitki genom dizilemeleri sonucu, yüksek yapılı bitkilerde geniş, her yerde birden bulunan gen ailelerini de kapsaması için LTP ve "LTP benzeri" diziler olarak tanımlamıştır. Bu tanımlama, LTP'lerin fonksiyonal çeşitliliğini aydınlatmak için ortaya konmuştur [73].

Halen belirsiz lipid transfer mekanizmaları ve yetersiz veriler nedeniyle nsLTP'lerin tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında altın standart bulunmamaktadır.

### 2.2.1 LTP 1 Ailesi

NMR ve X-Ray kristallografisi ile LTP 1 ailesinin 3 boyutlu yapısını ortaya konmuştur (Çizelge 2.3) [73].

Çizelge 2.3 LTP 1 ailesinin yapısal özeti [73]

| Tür | Ligand | Method | PDB | Referans |
|---|---|---|---|---|
| **Monokotiledonlar** | | | | |
| *Hordeum vulgare* | Palmitik asit | NMR | 1BE2 | [74] |
| | Palmitoil CoA | NMR | 1JTB | [75] |
| | Yok | NMR | 1LIP | [76] |
| *Oryza sativa* | Yok | NMR | 1BV2 | [77] |
| | Yok | Kristal | 1RZL | [78] |
| | Miristik asit | Kristal | 1UVA | [79] |
| | 2X Palmitik asit | Kristal | 1UVB | [79] |
| | Stearik asit | Kristal | 1UVC | [79] |
| *Triticum aestivum* | 2X L-α-miritoil-fosfatidilkolin | Kristal | 1BWO | [80] |
| | Prostaglandin B2 | NMR | 1CZ2 | [81] |
| | Yok | NMR | 1GH1 | [66] |
| *Zea mays* | Yok | NMR | 1AFH | [82] |
| | Kaprik asit | Kristal | 1FK0 | [83] |
| | Laurik asit | Kristal | 1FK1 | [83] |
| | Miristik asit | Kristal | 1FK2 | [83] |
| | Palmitoleik asit | Kristal | 1FK3 | [83] |
| | Stearik asit | Kristal | 1FK4 | [83] |
| | Oleik asit | Kristal | 1FK5 | [83] |
| | α-Linoleik asit | Kristal | 1FK6 | [83] |
| | Risinoleik asit | Kristal | 1FK7 | [83] |
| | Yok | Kristal | 1MZL | [84] |
| | Palmitik asit | Kristal | 1MZM | [84] |

Çizelge 2.3 LTP 1 ailesinin yapısal özeti [73] (devamı)

| **Dikotiledonlar** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| *Nicotiana tabacum* | Yok | NMR | 1T12 | [85] |
| *Prunus persica* | Belirsiz lipid<br>Belirsiz lipid | Kristal<br>Kristal | 2ALG<br>2B5S | [86]<br>[86] |
| *Vigna radiata* | Yok | NMR | 1SIY | [87] |

LTP'nin yapısındaki ilk üç α-heliks amfifiliktir, lipid bağlanma cebinin merkezine paraleldir ve çoğu yapıda korunmuş olan bir proline göre ikinci sistein yakınında bulunan ilk heliks belirgin bir yapıya sahiptir. Lipid bağlanan oluğun geri kalan kısmı dördüncü α-heliks ve C-terminal döngüsünden oluşmaktadır. Korunmuş 8 sistein motifinin yanı sıra başka korunmuş motiflerde içermektedir. Try16 oldukça iyi korunmuştur fakat yan zincirin yerleşiminin bağlanma oluğundan uzak bölgede konumlanması ve mutagenez deneyleri sonucu Try16'nın lipid bağlanmasında rol almadığı belirlenmiştir. Küçük hidrofobik aminoasitler (Ile, Val, Leu, Ala) LTP dizisinde bulunmaktadır ve hidrofobik bağlanma tünelini tanımlamada yardımcı olmaktadırlar [73].

Pirinç (*Oryza sativa)* ve arpadan (*Triticum aestivum*) elde edilen LTP1 ailesinin kristal yapıları temel alınarak ortaya konan çalışmada, 2 kooperatif bağlanma bölgesinin palmitik asit ve L-α-myristoyl-phosphatidylcholine'e bağlandığı görülmüştür. Bu yapıda, 2 ligand "kuyruk kuyruğa" düzenlenmesinde ortak bir bağlanma tünelini paylaşmaktadırlar. Karşılıklı bölgelerden tünele giriş yapmaktadırlar ve polar uçlarını çözücüye bırakmaktadırlar [79], [80].

### 2.2.2 LTP 2 Ailesi

LTP 2 ailesinin yapısının belirlenmesi için yapılan araştırmalar, LTP 1 ailesine kıyasla oldukça azdır. Her iki LTP ailesinde de aminoasit dizilimlerinin zayıf benzerliğine rağmen, karakteristik sekiz sistein kalıntısı oldukça iyi korunmuştur [88].

Pirinçteki ve arpadaki LTP 2'nin yapısı ortaya konmuştur [89]. L-α-palmitoyl-phosphatidyl glycerol ile birlikte oldukça kompleks bir yapı göstermektedirler [67], [90].

LTP 2 ailesi, bir hidrofobik lipid bağlanma oluğu içeren disülfit bağları ile bağlı dört α-heliks içermektedir [90].

Eşleşen sistein 5 ve 6 (CXC) yer değiştirmiştir: LTP 1 ailesinde C5, C8-C6 ve C1 ile disülfit bağ oluşturmaktayken LTP2 ailesinde C5, C1-C6 ve C8 ile bağ oluşturmaktadır [91].

LTP 2 ailesinin hidrofobik oluğu daha esnektir ve steroller hariç çok çeşitli lipidlerin yerleşmesine izin vermektedir [67], [89], [90], [91].

LTP 2 çok iyi korunmuş prolin motifi, heliks 1 ve 2, heliks 3 ve 4 arasında sıkı dönüşler yapmaktadır [90].

### 2.2.3 LTP-Benzeri Diziler

Tamamlanmış bitki genom analizleri sonucunda biyokimyasal olarak karakterize edilmiş 2 aile oldukça geniştir ve "gerçek" LTP'ler ile aynı karakteristik özellikleri gösteren bazı diziler bulunmuştur.

LTP'lerdeki korunmuş 8 sistein motifi aynı zamanda 2S-albuminlerde, bazı proteaz inhibitörlerinde ve prolince zengin hibrid proteinlerinde de bulunmaktadır [36].

*A. thaliana*'da korunmuş 8 sistein motifler temel alınarak tanımlanan 71 LTP-benzeri dizinin acyl lipid metabolizmasında görev aldığı düşünülmektedir [71].

### 2.2.4 Geniş Lipid Transfer Proteinleri (LLTP) Ailesi

Geniş lipid transfer proteinleri ailesi, yüksek fizyolojik ve patolojik önemleri olan vitellogenin (Vtg), apoB, apoLp-II/I ve mikrozomal trigliserit transfer protein (MTP) içeren homolog lipid-bağlayıcı proteinlerden oluşmaktadırlar. LLTP, taksonlar arasında LLTP alt kümeler olarak bulunan sadece metazoan şubelerinde tanımlanmışlardır [65].

Hayvanlarda geniş lipid transfer protein ailesinin üyeleri, yüzlerce lipid moleküllerine bağlanarak lipidleri taşırlar. LLTP birçok lipid türünün alımını ve taşınmasını sağlayan lipoproteinleri oluştururlar [92], [93]. Lipoproteinler, insanda aterosklerozisin en

önemli etkenidir ve diyabet metillus 2 ve obezite gibi diğer metabolik bozukluklara dahil olmaktadırlar [94], [95], [96].

Hayvan gelişimi [97], vitellogenez [98], [99], [100], immünite [101], [102], [103], [104], regülasyon düzenlemesi ve yaşlanmada [105], [106] rol alırlar.

Bütün geniş lipid transfer proteinleri, farklı amaçlar için farklı miktar ve kompozisyonlarda lipidleri bağlamaktadırlar [107].

Yüzlerce lipid molekülü tek bir apoB tarafından gruplanabilmekte ve stabilize edilmektedir [92], [93].

ApoB'den faklı olarak, böcek apoLp-II/I kas aktivitesi sırasında enerji üretimi için depolanmış lipidlerin taşınmasına aracılık etmektedir [108].

Vtg, omurgasızların olduğu kadar memeli olmayan omurgalıların yumurtlayan türlerindeki başlıca yumurta sarısı proteinidir. Lipidleri de içeren besinler ile oositlerin gelişimini sağlamaktadır [99], [100].

MTP, omurgalılarda ve omurgasızlarda bulunmaktadır. Diğer LLTP biyosentezini arttırdığı bulunmuştur [109], [110].

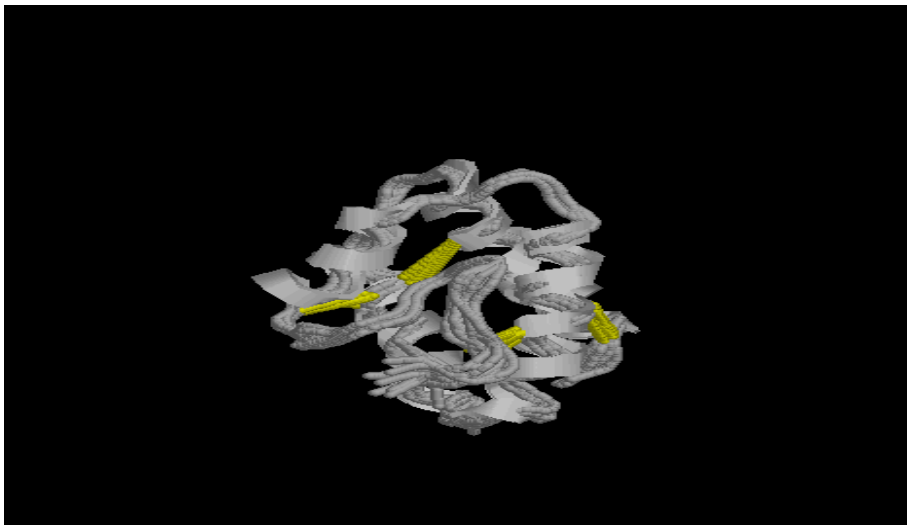
LLTP, dizilimlerinde ve yapılarında korunmuş N-terminalinde yaklaşık 900 aminoasit uzunluğunda kalıntılarına sahip geniş lipid transfer modülüne sahiptirler [111].

## 2.3 Üçüncül Yapıları

Buğday LTP'sinde yapılan NMR, infrared ve Raman spektroskopisi çalışmalarında birbirlerine disülfit köprüleri ile bağlı helikal segmentler şeklinde organize oldukları gösterilmiştir (Şekil 2.3). Bu helikal yapı, transfer aktivitesinde rol oynamaktadır [54], [112].

1H-NMR verileri temel alınarak buğday LTP'sinin üç boyutlu yapısının bir modeli tasarlanmıştır: Polipeptid omurganın esnek döngüler ile bağlanmış dört heliksin bir kompozisyonu olduğu görülmüştür [66]. Öne sürülen modelleri doğrulamak için kristallografik çalışmalar yapılmıştır. Buğday ve pirinçte LTP'ler kristalleştirilerek proteinin yapısı gösterilmiştir: α-tip yapı olduğunu doğrulayan uzun bir C-terminal

domaini ve dört α heliks ile tek bir sıkı domainin bir kompozisyonu olduğu görülmüştür [113], [114].



Şekil 2.3 Arpa lipid transfer proteininin disülfit bağları [54]

## 2.4 Lipid Transfer Proteinlerinin Çalışma Yöntemi

LTP'lerin aktiviteleri belirlendikten sonra çalışma yöntemleri tam olarak saptanamamıştır [3].

Memeli hücrelerinde fosfatidilkolin-spesifik LTP için bir shuttle mekanizma önerilmiştir. Bu mekanizmada, membran ile etkileşen ve membrandan fosfolipid ile fosfolipid etkileşimini değiştiren bir fosfolipid-LTP kompleksinin oluşumu belirtilmiştir [52]. Aynı mekanizma bitki LTP'leri içinde önerilmiştir ancak böyle bir bağlanma stabil bir kompleksin oluşmasına izin vermek için oldukça zayıf kaldığından dolayı bu tarz bir kompleks bitki LTP'lerinde izole edilmemiştir [115].

Güçlü bir acyl zinciri bağlanması veya liso-fosfatidil-kolin bağlanması bazı bitki LTP'leri için belirtilmiştir [58]. LTP'lerin bağlanma özellikleri, bütün bir fosfolipid molekülünü değil, bir tane acyl zinciri kabul eden bir hidrofobik cep içeren LTP modeli ile uyumluluk göstermektedir. Böylece lipidleri sitoplazmanın akışkan ortamında taşıyabilmektedirler [116]. Fosfolipidin iki acyl zinciri, biri diğerine göre daha zayıf bağlıdır ki bu da bir membran yüzeyi ile LTP etkileştiğinde fosfolipidin ekstraksiyonunu kolaylaştır, bu durum membranın proteinle farklı olarak etkileşmekte olduğunu göstermektedir [84].

Proteinin, lipid veya membranla etkileşime girdiğinde konformasyonel bir değişikliğe uğrayıp uğramadığı bilinmemektedir [3]. Lipid transfer proteinleri aracılığıyla iki farklı yapı belirtilmiştir. İlki kapalı yapı, lipid molekülü tünele alındığında, taşıma-yetkin yapıyı yansıtmaktadır [117]. Kapak, sıklıkla hidrojen bağları ve proteinin kalan kısmı ile hidrofobik etkileşimler sayesinde kararlı halde tutulmaktadır. Kapak ve membran fosfolipidleri arasındaki polar etkileşimler tünelin açılmasını kolaylaştırmaktadır ve membran tutunmasını kararlı hale getirmektedir. Lipidlerin LTP'ler ile taşınması, donör membran ve lipid bağlanma tünelinin açılması arasındaki etkileşimler sonucu meydana gelen ardışık olaylar ile açıklanmaktadır [118]. Diğeri ise açık membrana bağlı yapıdır [117].

Lipid transfer aktivitesinin, ortama iyonlar eklendiğinde veya protein fonksiyonuna dahil olan LTP ve membranlar arasındaki elektrostatik etkileşimleri belirten asidik fosfolipidlerde alıcı lipozomların içeriği değiştiğinde bozulduğu belirtilmektedir [119].

## 2.5 Ekspresyon Modelleri

Her LTP geni kendi özgün ekspresyonunu sergilemektedir. Farklı gelişimsel ve doku spesifiteleri gösterirler. Bitki LTP'leri için değişik ekspresyon modelleri belirtilmiştir [3], [26], [35]. Bu ekspresyon modelleri oldukça karmaşıktır.

İn situ hibridizasyon yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada LTP gen ekspresyonunun başlıca hücre tabakasında sınırlandığı, genelde ise periferal olarak yerleşim gösterdiği bulunmuştur. Havuçta, somatik ve zigotik embriyoların protoderm hücrelerinde ve sürgün apikal meristeminde ekspres edilmektedir [23]. LTP genlerinin ekspresyonunun bitkilerin aerial kısımlarında (yaprak, gövde, sürgün mersitemleri) aktif olduğu bulunmuştur [9], [11], [12], [33], [50], [120], [121], [122].

Tütün bitkisinde LTP geninin ekspresyonu, genç dokularda yaşlı dokulara oranla daha fazladır. Tütün bitkisinin yüksek kısımlarında en yüksek seviyede eksprese edilmektedir. Bu da LTP geninin bitkinin gelişimsel evresinde ekspres edildiğini göstermektedir [12]. *A. thaliana*'nın embriyonik kotiledonlarında ve yaprak primordiyalarının gelişiminde ekspres edildiği bulunmuştur [9].

Çiçek gelişiminde ise erken evrelerde ekspres edilmektedir [3].

Bir alleldeki her genin ekspresyon modeli, bitki büyümesinin evreleri, anatomi ve biyotik ve abiyotik stresler tarafından farklı olarak etkilenmektedir [14], [22], [35].

## 2.6 LTP'lerin Yerleşim Yerleri

Havuçta, LTP embriyonik hücre kültüründe proteinler arasında saptanmıştır [23]. Asma bitkisinde de benzer bir gözlem yapılmıştır çünkü LTP'nin birkaç izoformu somatik embriyo kültürünün ekstrasellüler medyumundan saflaştırılmıştır [123]. Mısırdaki bir LTP'nin membran-bağ polizomlarında sentezlenmesi, ekstrasellüler yerleşim ile uyumluluk göstermektedir [124].

Ek olarak, *A. thaliana*'da LTP1 geni için füzyon proteinine karşı bir poliklonal antikor kullanılarak yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda, bu bitkideki LTP'nin hücre duvarında yerleşim gösterdiği bulunmuştur [125]. Bir diğer taraftan LTP'lerin intrasellüler olarak konumlandığına dair bilgiler bulunmaktadır [15]. Mısır tohumlarında mikrozomlarda, mitokondride ve sitoplazmada saptanmışlardır [47]. Gene otu kotiledonlarının glioksizomlarında bulunmuşlardır [48]. Şeker pancarının yapraklarında intra ve ekstrasellüler olarak saptanmışlardır [126].

Fakat intrasellüler yerleşim, LTP'lerin dahil olduğu fonksiyonlar ile zıtlık göstermektedir. LTP'lerin intrasellüler olarak yerleşimi, endoplazmik retikulum ve diğer organeller arasında lipid transferininin gerçekleşmesine izin vermemektedir [52].

Pamuk fiberlerinde gözlenen yüksek seviyedeki LTP ekspresyonu, özellikle birincil hücre duvarı sentezi fazında ekspres edilmektedir [33].

## 2.7 Biyolojik Rolleri

Lipid transfer proteinlerinin, lipidlerin transferi ve acyl zincirlerini bağlaması gibi in vitro özellikleri temel alınarak, membran biyogenezi gibi lipid hareketlerinin önemli olduğu düşünülen yerlerde hücre fonksiyonunun birçok durumuna katıldığı saptanmıştır.

Ispanak [50] ve arpadaki [127] sinyal peptidleri, in vitro olarak endoplazmik retikulumun lümeninde ilave polipeptidin kotranslasyonunu yönetmektedir. LTP'lerin

endoplazmik retikulum lümenini de içeren lipidlerin hareketlerine katılmaktadırlar [128].

LTP aktivitelerinin hepsi in vitro da tanımlanmıştır. İn vivo lipid transferi bilinmemektedir.

Germinasyondaki nsLTP'ler için lipid stoklarının akışkanlığında bir rol oynadıkları saptanmıştır [19].

nsLTP'lerinin erkek üretken dokularda fonksiyona sahip olduğu belirlenmiştir [129]. Bu rol temel olarak başçık-spesifik ekspresyon yapabilen tip III nsLTP [130] ve kolza E2 geni [131], *Arabidopsis* Atltp12 geni (At3g51590) [130] ve pirinç t42 geni (Os01g12020) [132] içeren birkaç tip I nsLTP genleri ile ilişkili olarak belirlenmiştir. Bu LTP'ler başçık gelişiminin erken evrelerinde ekspres edilmektedirler [129].

nsLTP'lerin, polen duvarının gelişiminde materyalin depolanmasına katıldıkları saptanmıştır. Ancak polendeki kesin fonksiyonları bilinmemektedir [133].

nsLTP'ler, arpa maltında bira kalitesine, bira köpüğünün oluşumuna katkıda bulunurlar [134].

İşlenmiş meyvelerde gıda alerjilerine neden olurlar. Özellikle elma, şeftali gibi *Rosaceae* ailesinin meyvelerinde başlıca insan alerjenleri olarak tanımlanmışlardır [135], [136], [137], [138]. Meyvelerin kabuğunda oldukça yüksek miktarlarda bulunmaktadırlar [139].

LTP'ler oldukça stabil alerjenlerdir. Sıcaklık uygulamalarına ve pepsin sindirimine karşı oldukça güçlü dirençlilik göstermektedirler [140].

Bitkide oldukça geniş yayılım gösteren LTP'leri için, alerjenik reaksiyonlarda nadir ve neredeyse ölümcül yanıtlarından dolayı bitki panalerjenleri olarak kabul edilmektedirler [141].

Transgenik meyvede LTP genlerinin ekspresyonunu engelleyerek hipoalerjenik domatesler geliştirmişlerdir [142].

nsLTP'lerin, hücre duvarının genişlemesini kolaylaştırdıkları veya hücre duvarını tahrip ettikleri ve hidrofobik hücre duvarı bileşenleriyle ilişki kurdukları belirlenmiştir. LTP1

ailesinin bitki hücre duvarının yapısının gevşemesini teşvik ettiği ve böylece hücre genişlemesinde ve bitki büyümesinde rol oynadığı belirlenmiştir [143]. Fonksiyonlarının çok çeşitli olduğu ve yağ asidi veya yağ asidi türevleri gibi hidrofobik molekülleri bağlama veya taşıma yeteneklerinden dolayı nsLTP'lerin bu özelliklerinin var olduğu saptanmıştır [144].

Ekstrasellüler matrix boyunca kutikülar bileşenleri taşıyarak kütin depolanmasında ve suberin biyosentezinde rol oynadıkları saptanmıştır [3], [145].

NsLTP'lerin diğer biyolojik aktiviteleri katılmaları yüksek bir olasılıktır fakat halen fizyolojik fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir.

Wu ve Burns [146], spesifik olmayan meyve dökülmesi ajanı olan etefon uygulamasından 6, 24, 48 ve 72 saat sonrasında 'Valencia' portakalının olgun meyve dökülme bölgelerinde artan oranda LTP mRNA ekspresyonu saptamışlardır. CMN-pirazol uygulamasından 24 saat sonra ise LTP transkriptlerinin ekspresyonunda düşüş gözlemlemişlerdir. 24 saat sonra ise LTP'lerin ekspresyonunda göreceli olarak artış meydana gelmiştir. Potansiyel mikrobiyal atağı azaltarak anti-mikrobiyal aktivitesi sırasında veya meyve dökülme bölgesinin kırılma düzlemine kütin monomerlerinin taşınmasını sağlaması ile LTP'nin meyve dökülme işlevinde rol aldığı saptanmıştır. LTP'ler plazmalemma- hücre duvarı arasına hidrofobik monomerleri taşıyarak [146] kırılan organda ve ana bitkinin gövdesinde su kaybını önlemektedirler [147], [148].

### 2.7.1 Kütin Oluşumu ve Embriyogenezis

De Vries vd. [23] hipotezinde kütininin de dahil olduğu, ekstrasellüler olarak, lipofilik materyalin birikmesi veya salgılanmasında LTP'lerin dahil olduğu saptanmıştır. Kütikin öncülleri epidermal hücrelerde sentezlenmektedir ve kütikili oluşturmak üzere hidrofobik hücre duvarını geçmesi gerektiğinden LTP'lerin bu bileşenleri taşıyıcı görevi gördüğü belirtilmiştir. Kütin salgılanması ve depolanması yoluyla hücre duvarının güçlendirilmesi ve kütin biyosentezinde temel yapı taşı olan acyl monomerlerini taşıyıcı bir fonksiyonları olduğu öne sürülmektedir [23]. Fakat LTP1 ailesinin epidermiste ekspres edilmesine ve artmış LTP ekspresyonuna bağlı olarak balmumu birikimine [63], [149] dair bir bağlantı bulunamamıştır [11], [23], [150]. LTP'lerin hücre duvarında

yerleşmeleri ve salgılanmaları, epidermis dahil periferal hücre tabakasında, LTP gen ekspresyonunun ve gen ürünlerinin birikiminin saptanması, LTP'lerin özellikle kütin birikmesinin aktif olduğu genç yapraklarda, mumsu yüzeyde yoğunlaşması ve acyl zincirlerini bağlaması bu çalışmayı desteklemektedir.

Kütin biyosentezi patojen infeksiyonu ile teşvik edilmektedir ve böylece LTP'ler uyarılabilmektedir [3].

Üzüm embriyonik hücre kültürü medyumunda LTP'nin salgılanması ile, somatik embriyogenezinde rol aldığını belirlemişlerdir [23]. LTP'lerin, genç embriyonun çevresinde koruyucu bir tabakanın oluşumuna katılarak embriyogenezin erken evresine dahil olduğu saptanmıştır. Genç embriyolarda LTP geninin yüksek ekspresyonu bu çalışmayı desteklemektedir [9], [23].

### 2.7.2 Patojenlere Karşı Savunma Reaksiyonları

Patojen infeksiyonu sırasında oksidatif patlama, iyon akış değişiklikleri, fitoaleksinlerin sentezi ve bir dizi patogenez ilişkili (PR) proteinlerin sentezi gibi çeşitli fizyolojik, moleküler ve hücresel olaylar meydana gelmektedir. Bu esnada bilinen veya bilinmeyen biyokimyasal fonksiyonlara neden olan birçok gen uyarılmaktadır [151].

Bitki yüksek konsantrasyonlarda patojenlere maruz bırakıldığında, bitki yüzeyinde ve vasküler dokularda yayılmış olan LTP'lerin hassas patojenleri engelleyebildiği gösterilmiştir [144].

Bitkiler kütin oluşturarak ve kalloz depolayarak ekstrasellüler matriksin dayanaklılığını arttırmaktadırlar. Bitkinin bu aktif ve pasif cevapları, patojen saldırılarına karşı lokal ve sistemik savunmaya öncülük etmektedir. Patojen atakları sırasında sentezlenmeleri ve bitki savunma mekanizmasında rol oynamalarından dolayı, nsLTP'ler patogenez ilişkili proteinler olarak tanımlanmaktadırlar ve PR-14 ailesini oluşturmaktadırlar [152].

LTP'lerin birçoğu bazı patojenlere karşı çeşitli spesifite derecelerinde aktiflik göstermektedirler [121].

Yüksek sıcaklık stabiliteleri ve proteazlara dirençliliklerinden dolayı patojenlere ve fungilere karşı savunma aktivitelerinde görev almaktadırlar. Bu fonksiyonları, biyotik

infeksiyonlara ve fungal elisitorlara yanıtta birçok nsLTP geninin ekspresyonunun uyarılması ile araştırılmıştır [153].

Arpa yaprakları bir fungus ile aşılandığında, bütün LTP mRNA seviyelerinin yükseldiği bulunmuştur [154].

LTP'lerin antifungal aktivitelerinin patojenler arasında değişkenlik gösterdiği ve arpa bitkisinde patojenlerin infeksiyonuna verilen cevapta LTP genlerinin ekspresyon modellerinin oldukça kompleks olduğu sonucu çıkarılmaktadır [3].

Bitki savunma sinyal yolağındaki rolleri, sonradan edinilen sistemik dayanıklılık sinyal yolağına zarar veren *Arabidopsis*'te *Arabidopsis* DIR1 geninin bozulmasıyla birlikte LTP'lerin bitki savunma sistemindeki rolleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu gen tip I, II veya III nsLTP kodlamaktadır. Bu genin kaybıyla bitkide patojenlere karşı lokal direnç oluşmaktadır fakat sistemik yapraklarda sonradan edinilen sistemik dayanıklılık (SAR) gelişmemektedir ve PR genleri ekspres edilmemektedir. Bu durumda LTP'lerin, bitkinin vasküler sisteminde mobil sinyalin serbest bırakılması için bir taşıyıcı gibi haraket ettiği veya bir yardımcı sinyal olduğu belirlenmiştir [155].

Arpa yapraklarından saflaştırılan LTP benzeri proteinler ve mısırdan izole edilen LTP'nin, bakteriyal bir patojenin ve bir fungusun büyümesini engellediği görülmüştür [121]. LTP ve fungal kriptogen tütünün plazma membranında aynı bağlanma bölgesine sahiptirler [156]. Bu olay *A. thaliana* ve ıspanak yapraklarında hücre duvarı preparatlarından izole edilen LTP benzeri proteinler ile doğrulanmıştır [157]. LTP'ler thioninler ile birleştiğinde fungusa karşı bir sinerjik etki oluşturmuştur [121] .

Elisitin küçük, sisteince zengin, lipid bağlanma proteinidir. Fitopatojenik oomisetler olan *Phytophthora* ve *Pythium* tarafından salgılanmaktadır. Elisitinin bağlanması bitkide birçok hipersensitif yanıtların başlamasına neden olmaktadır [158]. LTP'lerin plazma zarındaki elisitin reseptörüne bağlandığı saptanmıştır [156]. LTP-lipid kompleksinin oluşması, elisitin reseptörünün agonist gibi hareket etmesine ve bu reaksiyonun bitkide savunma reaksiyonlarının başlatmasına neden olabileceği düşünülmektedir [144].

Arpada ekspres edilen nsLTP, bakteriyal patojenlere karşı toleransı arttırmaktadır. Buna rağmen, nsLTP'lerin antimikrobiyal aktivitesi lipid transfer kapasiteleriyle ilişkili görülmemiştir [159].

Garcia-Olmedo vd. [143] önerdiği bir savunma-protein kalkanı, in vitro doku patojenlerinin engellenmesi için LTP'lerin en azından bazı izoformlarının doku yüzeyinde birikiminin saptanması bu teorilerini desteklemektedirler.

LTP benzeri proteinin pirinç süspansiyon kültür medyumlarında, patojen savunma işlemini uyarmak için, bir elisitor olarak bilinen salisilik asit ile muameleye cevap olarak salgılandığı görülmektedir [24].

Bunlara ek olarak, LTP'lerin patojenlerin büyümesini nasıl engellediği bilinmemektedir. Yüksek izoelektrik noktaları nedeniyle, LTP'lerin membran geçirgen ajan olarak rol oynadığı belirlenmiştir [3].

LTP'lerin bitkilerdeki savunma mekanizmasındaki kesin fonksiyonları halen açıklanamamıştır. Bitkinin savunma cevabındaki önemli bir nokta ise lipid transfer proteinlerinin ekstrasellüler olarak salgılanmaları ve hidrofobik [49] ve amfifilik moleküllere bağlanabilmeleridir [159].

### 2.7.3 Simbiyozis

Bakteri ve bitkiler arasındaki diğer bir ilişki de, *Rhizobium* gibi simbiyotik bakteri ile etkileşimi takip eden legüm köklerinde nodül başlangıcıdır. İnfeksiyonun erken evresinde, *Rhizobium*'un bağlandığı kök tüylerinde uzama ve kıvrılma görülür bu durum ise bakterilerin nüfuz etmesini kolaylaştırır. LTP benzeri protein kodlayan bir cDNA, *Rhizobium* ile aşılanmadan 4 gün sonra, *Vigna unguiculata'*nın köklerindeki RNA'dan oluşturulan bir cDNA kütüphanesinden izole edilmiştir [160].

Kök tüylerinde mRNA seviyesi, *Rhizobium* ile aşılanmasından sonra artmıştır. LTP benzeri transkriptler farklılaşmış nodüllerde bulunmamıştır bu da LTP geninin nodül gelişimi sırasında geçici olarak ekspres edildiğini göstermektedir [3].

### 2.7.4 Çeşitli Çevresel Koşullara Bitkilerin Adaptasyonları

Sıcaklık, kuruluk ve tuz stresi gibi çeşitli çevresel değişikliklere cevap olarak bitkilerde meydana gelen metabolizmal ve gelişimsel değişiklikler birçok araştırmacılar için önemli bir konu olmuştur. Su eksikliğinde, yüksek veya düşük sıcaklık gibi ortamlara alışmada rol oynayan genleri karakterize etmeye çalışmışlardır [3].

Bazı LTP'ler, absisik asit (ABA) veya salisilik asit gibi abiyotik stresler tarafından uyarılmaktadırlar [31].

Arpada yapılan çalışmalarda, LTP-benzeri bir genin kış kültivarlarında düşük sıcaklıkta sentezlendiği, bahar kültivarlarında ise bu genin gözlenmediği görülmektedir. Diğer arpa çeşitlerinde, soğuk veya diğer faktörler nedeniyle üç LTP geninin ekspresyonunda bir uyarılma görülmediği fakat ABA veya sodyum klorür (NaCl) uyarılması ile hafif bir artış olduğu gözlemlenmektedir [6].

Domateste, özellikle gövdede, NaCl, mannitol, ABA veya yüksek sıcaklık uygulandığında LTP benzeri protein kodlayan bir gen ekspres edilmektedir [17].

*Phaseolus vulgaris'*te bulunan LTP, su yoksunluğu veya ABA uygulaması ile uyarılmıştır [61].

Üzüm süspansiyon hücrelerinde nsLTP'nin oksin eksikliğinde ortaya çıkan somatik embriyogenezisle ilişkili sinyal tarafından uyarıldığı gösterilmektedir [123].

LTP genlerinin gelişimsel ve çevresel sinyallere cevabı karmaşıktır ve çeşitli streslere bitkinin adaptasyonunda proteinlerin dahil olma mekanizmaları araştırılmalıdır.

Eğer LTP'ler kütin depolanmasına dahil oluyorlar ise, kurumaya neden olan koşullar tarafından uyarılan LTP genlerinin uyarılmasının bölgesel olduğu görülmektedir. *A. thaliana'*daki LTP1 geninin promoter bölgeleri fenilpropanoid biyosentetik yolağında genlerin putative düzenleyici elementlerine benzer diziler içermektedir ve bu dizi elementleri stresle indüklenen genlerin promoterlarında bulunmuştur [3].

## 2.8 Zeytin

### 2.8.1 Zeytinin Sınıflandırılması

Zeytin (*Olea europaea), g*ünümüzde kullanılan sınıflandırma sistemlerine göre 20-29 cinse sahip olan *Oleaceae* familyasına dahildir. Olea cinsi, nispeten güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir. Bunların çoğu çalılar ve ağaçlardır. Yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytininin de dahil olduğu *Olea europaea* L. sınıflandırması içerisindedir (Çizelge 2.4) [161].

Çizelge 2.4 Zeytinin taksonomisi [161]

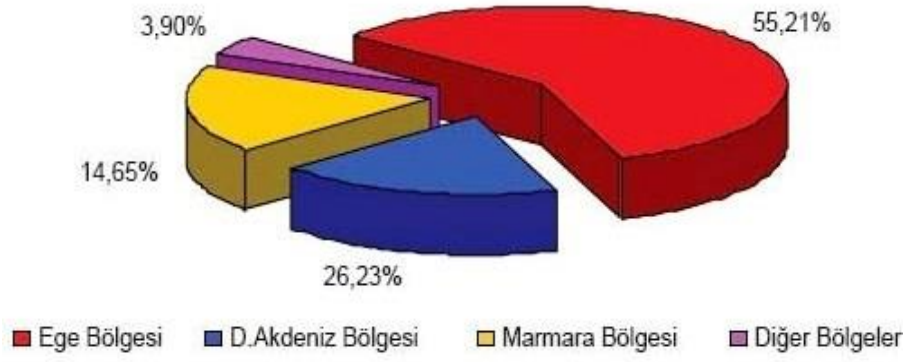
| | |
|---|---|
| **Kingdom** | *Plantae* |
| **Subkingdom** | *Tracheobionta* |
| **Division** | *Magnoliophyta* |
| **Class** | *Magnoliopsida* |
| **Subclass** | *Asteridae* |
| **Ordo** | *Lamiales* |
| **Familya** | *Oleaceae* |
| **Genus** | *Olea* |

### 2.8.2 *O. europaea'*nın Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı

Günümüzde zeytin ağaçlarının %98 gibi önemli bir bölümü Akdeniz ülkelerinde bulunmaktadır. Akdeniz'in belli başlı zeytin üreten ülkeleri İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Portekiz, Suriye, Fas ve Cezayir'dir [162].

Dünyada yaklaşık 10 milyon ha alan üzerinde yaklaşık 900 milyonu aşkın zeytin ağacı olduğu tahmin edilmektedir. 2004 yılı istatistiklerine göre 15.340.488 ton olan dünya zeytin üretiminin %98'i Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerden elde edilmekte olup, %2'si ise diğer ülkelerdedir. 2004 yılı istatistiklerine göre, Dünya'da en fazla zeytin üreten ülkeler arasında İspanya %29.7'lik üretim, İtalya ise %20.5'lik üretimle önemli üretici

ülkeler olup; Yunanistan, Türkiye, Tunus diğer önemli üreticiler arasında yer almaktadır [163].




Şekil 2.4 Türkiye'de bölgelere göre zeytin ağaç sayısı oranı [163]

Türkiye zeytin üretiminde ise, zeytin ağacının periyodisite özelliğinden dolayı dalgalanmalar meydana gelmektedir**.** Periyodisitenin yanı sıra ülkemizde zeytin ağacının bakımı, iklim koşulları, hastalık ve zararlılarla mücadele üretim ve verimdeki dalgalanmada önemli rol oynayan diğer faktörlerdir. Bu yüzden ülkemiz zeytin üretiminde ve veriminde dalgalı bir yapı seyretmektedir.

## 2.9 Zeytin ve Stres

Yaz aylarında yüksek sıcaklıklar, yüksek ışık düzeyleri, düşük yağış ve yüksek buhar basıncı eksikliği Akdeniz ekosistemlerinin karakteristik özellikleridir. Zeytin bitkisi, Akdeniz iklimine uyum sağladığından yüksek sıcaklıklara ve su stresine dayanıklıdır [164]. Suyun kısıtlı olması, bitkide fotosentetik oranların azaltılmasını ve yapraklardaki stomaların kapanmasını uyarmaktadır. Bu koşullar altında zeytin ağaçları, yüksek sıcaklık ve yüksek ışık düzeyinden dolayı çoğunlukla stres ile birlikte kuraklıktan zarar görmektedirler. Kuraklığa karşı stratejileri ise içsel su eksikliğinde hayatta kalabilecek düzeyde metabolik aktivitelerini sürdürmektir [165].

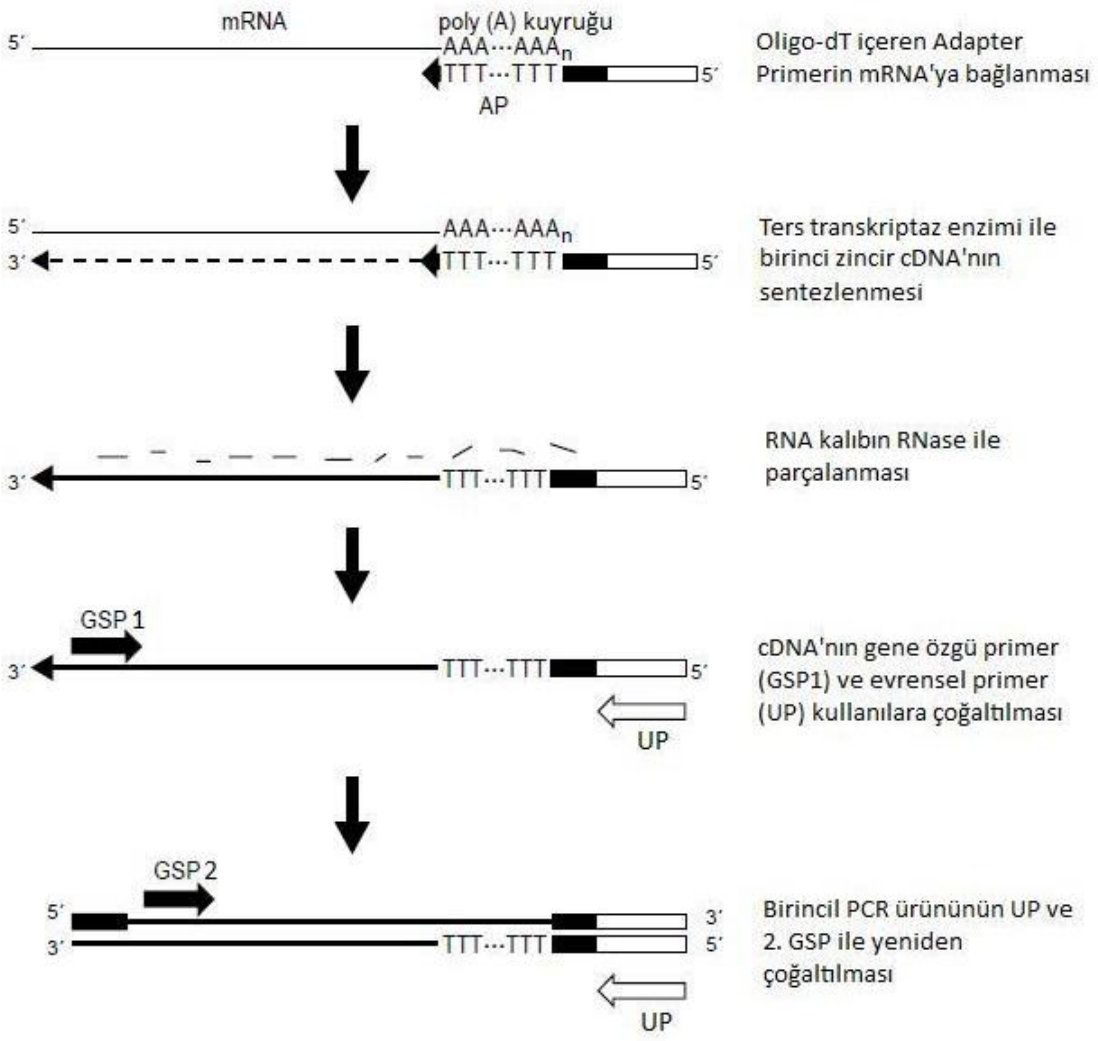
Yapılan çalışmalarda da genellikle zeytin için uygun sıcaklık aralığı 20-30°C olarak belirtilmiştir. Zeytin ağacı, terleme kontrolü ve kök sisteminden su alınımı ile stres başlangıcını yavaşlatabilmektedirler. Zeytin yaprakları, su kaybını kontrol etmek için oldukça iyi tasarlanmışlardır. Morfolojik karakteristikleri minimum radyasyon yükü ve

maksimum ısı değişimine izin verir. Stomalar küçük ve yoğundur, sadece yüzeyin daha altında bulunmaktadırlar [166]. Morfolojik özelliklerin bu kombinasyonu, stomaların kapanması ile terleme sınırlandığında belirti göstermeyen ısı değişimleri ile yapraklarda sıcaklığın artmasını kısıtlamaktadır. Yaprak iletkenliğinin maksimum değeri, yaprak döken diğer meyve ağaçlarıyla kıyaslandığında daha düşüktür. Bu özellikler etkili bir şekilde terlemenin kontrolünü sağlar [167].

Zeytin ağacının uzun büyüme periyodunda meyveler ani ve keskin ısı düşmeleriyle karşılaşabilmektedirler. Bu soğuk stresi tehlikeli değildir, kış soğuğunda meyvenin olgunlaşma sonrası işleminin yavaşlamasının yağın kalitesini arttırdığı saptanmıştır. Zeytin ağacındaki soğuk stresi, farklı hücre ve doku düzeylerinde değişikliklere neden olur. Hücre membranları soğukla indüklenen hasarın gözlemlendiği birincil bölgelerdir ve soğuk ortama alışmada ilişkili enzimlerin optimal aktivitelerini sağlayan membran akışkanlığını koruyan mekanizmalar harekete geçer. Soğuğa duyarlı ve adaptasyon ilişkili genlerin harekete geçmesini yöneten sinyal iletimine dahil olan lipid kompozisyonu, kriyoprotektanların depolanması ve ikinci habercilerde geçici artışlar (sitosolik kalsiyum iyonları gibi) gibi mekanizmalarda değişiklikler meydana gelmektedir [168].

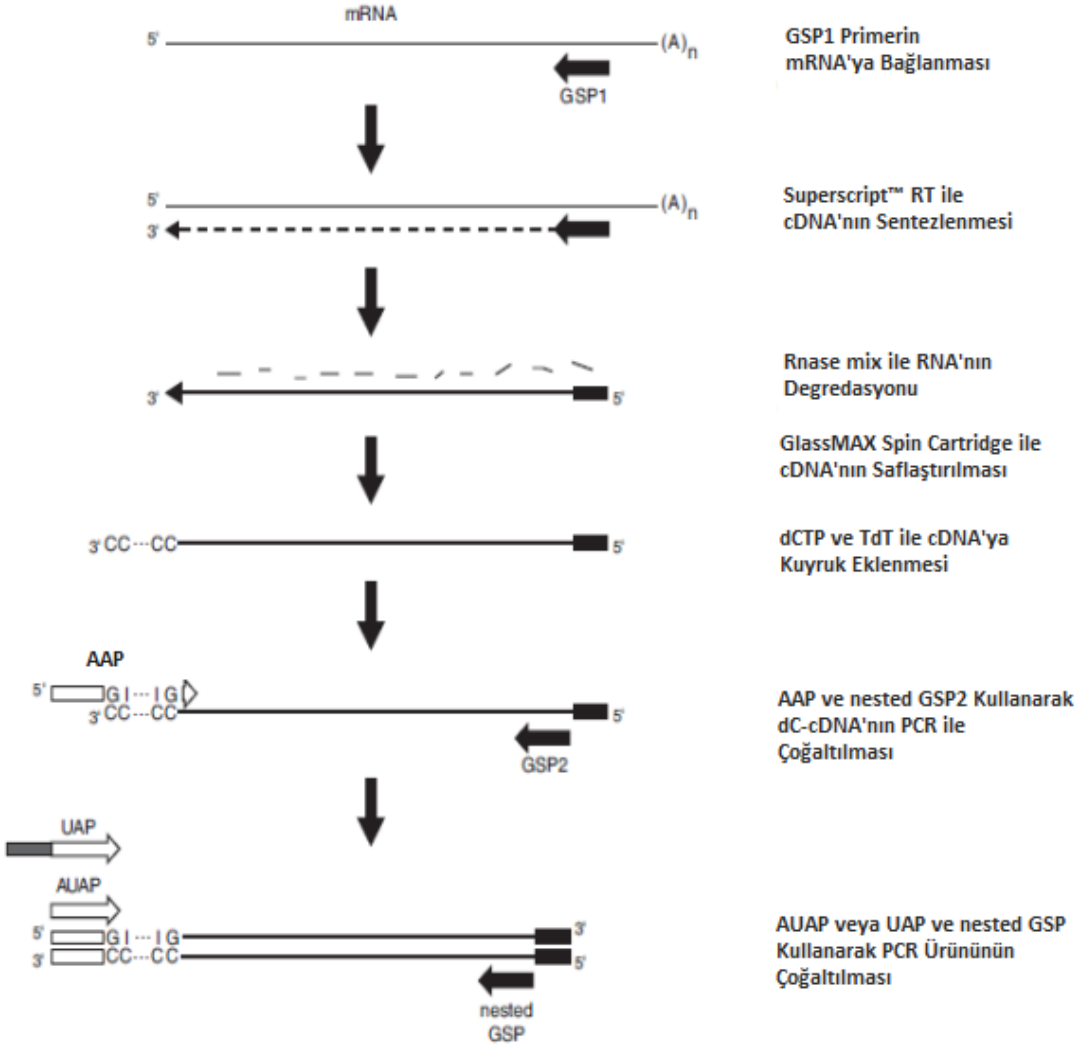
## 2.10 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

RACE, kelime anlamı olarak cDNA uçlarının hızlı çoğaltımıdır. Dizinleri tam olarak bilinmeyen cDNA'ların uzatılarak tam uzunlukta cDNA'lar elde edilmesine yarayan PCR temelli bir yöntemdir [144]. Mesajcı RNA veya total RNA birinci zincir cDNA'nın çoğaltılması için kalıp olarak kullanılır. cDNA'dan PCR'ın gerçekleştirilebilmesi için genin bilinen bir bölgesinden tasarlanmış bir primer ve evrensel bir primer gereklidir. Kullanılan primerler ve reaksiyonun işleyişi açısından 3' RACE ve 5' RACE olarak 2'ye ayırmak mümkündür. 3' RACE'te, mRNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanan oligo–dT (kısa bir deoksi-timin nükleotidleri içerir) primeri ters transkriptaz ile cDNA oluşumunu sağlar. Oligo-dT, cDNA'nın 5' ucuna adaptör dizisi eklemektedir. Sonraki aşamada, gen spesifik primer ve adaptör dizisine eşleşen anti-sense primer kullanılarak cDNA'nın 3' ucu PCR ile çoğaltılır. Yöntemin özeti şekil 2.5'de verilmiştir (Invitrogen 3' RACE Kiti Kullanım Kılavuzu).




Şekil 2.5 3’ RACE yönteminin şematik görünümü

5’ RACE’te, mRNA’ya bağlanan gen spesifik primer kullanılarak sentezlenen cDNA’nın 3’ ucuna homopolimerik kuyruk eklenmesi için TdT (terminal deoksinükleotidil transferaz) kullanılır. Kuyruk eklenen cDNA gen spesifik ve anchored primer ile çoğaltılır. Genellikle elde edilen PCR ürününün konsantrasyonu etidyum bromidli jelde saptanması için yeterli değildir. Bu ndenle PCR örneği seyreltilerek gen spesifik primer ile üçüncü PCR reaksiyonu gerçekleştirilir. 5’ te 3 farklı gen spesifik primer kullanılır. Bu primerler mRNA’nın 5’ ucu ve gen spesifik pimer 2 arasında bilinmeyen dizilerin çoğaltılmasını sağlar. Yöntemin özeti şekil 2.6’da verilmiştir (Invitrogen 3’ RACE Kiti Kullanım Kılavuzu).




Şekil 2.6 5'RACE yönteminin şematik görünümü

RACE yönteminin çalışma prensibi, zeytin bitkisinde tam uzunluğu bilinmeyen LTP kodlayan genin gen spesifik primerler ile elde edilmesi ve klonlanabilmesi açısından uygun bir yöntemdir.

# BÖLÜM 3

# MATERYAL VE METOD

## 3.1 Bitki Materyali

1 yaşındaki *Olea europaea* Gemlik kültivarı Türkiye Cumhuriyeti Tarım Bakanlığı Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi.

## 3.2 Tamponlar ve Çözeltiler

Tampon ve çözeltiler hazırlanırken kullanım kılavuzlarında belirlenen protokole uyulmuştur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Tampon ve çözeltiler

| **Tampon veya çözelti** | **Yapısı veya hazırlanma şekli** |
|---|---|
| DEPC (Di Etil Piro Karbonat)'li su | %0,1'lik solusyonları hazırlandı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı. |
| TE çözeltisi (1X), pH 8.0 | 10 mM Tris- HCl pH 8.0, 1 mM EDTA |
| Etanol | %75-80 stok solüsyonu hazırlandı. |
| Etidyum bromür stok solüsyonu (EtBr) | 5 mg/ml EtBr'e steril deiyonize su ilave edildi. |
| MOPS (5X) | 0,2 MOPS pH 7, 50 mM NaOAc, 50 mM EDTA ve DEPC' li su bir gece inkübe edildikten sonra otoklavlandı. |
| RNA yükleme çözeltisi | 1 mM EDTA, pH 8.0, %0.4 bromfenol mavisi ve %50 gliserol karışımı, DEPC'li su ilave edildi. |
| dNTP karışımı | 10 mM dATP, dTTP, dGTP ve dCTP karışımı hazırlandı. |

Çizelge 3.1 Tampon ve çözeltiler (devamı)

| | |
|---|---|
| EDTA solüsyonu | 250 mM EDTA, 250 mM Tris-HCl karışımı hazırlandı. pH 8.0'e ayarlandı. |
| TAE çözeltisi (10X) | 242 g Tris, 57,1 ml Glasial Asetik Asit, 100 ml 0,5 M EDTA, 1L saf suya tamamlandı. |
| TBE çözeltisi (10X) | 54 g Tris, 27,5 g Borik Asit, 20 ml 0,5 M EDTA, 1L saf suya tamamlandı. |
| DNA yükleme çözeltisi | 250 mM Tris-HCl pH 7.5, %0.2 bromfenol mavisi, %0,2 ksilen siyanol ve %40 gliserol karışımı |
| Ampisillin stok solüsyonu | 100 mg/ ml konsantrasyonda hazırlandı. Filtreden geçirildi. -20°C'de bekletildi. |
| X- Gal stok solüsyonu | 50 mg 5-bromo-4- kloro-3-indol β - D- galaktozidaz 1ml DMF (di metil formamid) de çözüldü. Alümiyum folyo ile sarılarak -20 °C' ye kaldırıldı. |
| IPTG stok solüsyonu | 1 M ( 240 mg/ml) izopropanol β-D- tiogalaktopiranosit (IPTG) steril deiyonize suda çözüldü. Filtreden geçirildi. -20°C'de saklandı. |

## 3.3 Moleküler Markerlar

Moleküler markerların seçiminde hedef dizimizin büyüklüğü göz önünde bulundurulmuştur (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 Moleküler markerlar

| | |
|---|---|
| RiboRuler High Range RNA Ladder ( n/2µl) | 6000 bç, 4000 bç, 3000 bç, 2000 bç, 1500 bç, 1000 bç, 500 bç ve 200 bç bantları gözlenir. |
| MassRuler DNA Ladder Low Range | 1X'lik TBE'de 1031 bç ile 80 bç arasında toplam 11 bant gözlenir. |
| Pst1 İle kesilmiş Lambda | %1'lik agarozda 11501 bç ile 247 bç arasında toplam 17 bant gözlenir. |

## 3.4 Enzimler

Laboratuvarımızda optimizasyonu önceden yapılmış enzimler kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3 Enzimler

| | |
|---|---|
| Taq polimeraz | Qiagen Taq DNA Polymerase |
| Ters transkriptaz | Super Script II RT Enzyme |
| T4 DNA Ligaz | Thermo Scientific T4 DNA Ligase<br>Promega T4 DNA Ligase |

## 3.5 Kitler

Kitler kullanım kılavuzlarındaki protokoller takip edilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Kitler

| | |
|---|---|
| mRNA izolasyon kiti | Qiagen Oligotex mRNA Spin-Column |
| 3’ RACE kiti | Invitrogen 3´ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends |
| 5’ RACE kiti | Invitrogen 5’ RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends |
| Jel pürifikasyon kiti | QIAquick Gel Extraction Kit |
| Ligasyon kiti | Promega pGEM-T Easy Vector Systems II |
| Plazmit izolasyon kiti | Roche High Pure Plasmid Isolation Kit |

## 3.6 Besiyerleri

### 3.6.1 Luria Broth (LB)

Çizelgede 3.5’deki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 1L’ye tamamlandı. pH 7’ye ayarlandıktan sonra 121°C’de 30 dakika otoklavlandı. Katı LB için sıvı 1L LB’ye 15 g Agar ilave edildikten sonra 121°C’de 20 dakika otoklavlandı.

Çizelge 3.5 LB

| **Besin çeşidi** | **Miktarı** |
|---|---|
| Tripton | 10 g |
| Yeast extract | 5 g |

Çizelge 3.5 LB (devamı)

| | |
|---|---|
| NaCl | 10 g |

### 3.6.2 SOB

Çizelge 3.6'daki miktarların üzerine saf su ilave edilerek 500 ml'ye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı.

SOC için 49 mL SOB'ye 1 ml glikoz ilave edildi.

Çizelge 3.6 SOB

| **Besin çeşidi** | **Miktarı** |
|---|---|
| Tripton | 10 g |
| Yeast extract | 2,5 g |
| NaCl | 0,292 g |
| MgCl2 | 1,015 g |
| KCl | 0,093 g |

## 3.7 Oligonükleotidler

Invitrogen RACE kitindeki Oligo d(T) ve PCR Anchor primerleri dışında Çizelge 3.7'de bulunan tüm primerlerin tasarlanmasında Primer3 programından yararlanılmıştır.

Çizelge 3.7 Oligonükleotidler

| **Primerin Adı** | **Primer Dizini** |
|---|---|
| Oligo d(T)-anchor | 5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA CTTTTTTTTTTTTTTTV – 3' |
| PCR Anchor | 5'- GAC CAC GCG TAT CGA TGT CGA C -3' |
| LTPF15 | 5'- CTG ATG CAG CAA TCT C TG T-3' |
| LTPF25 | 5'- TTC TTC TGC AAT GGC TTC TG -3' |

Çizelge 3.7 Oligonükleotidler (devamı)

| | |
|---|---|
| LTPR1 | 5’- CAA GCT GCT GTA GCG AAC TC -3’ |
| LTPR2 | 5’- GAG CGA TTT CAG GCA GTA GC -3’ |
| LTPR3 | 5’- TTC AGG CAG TAG CAG ATG GA -3’ |
| LTPR4 | 5’- GAG CGA TTT CAG GCA GTA GC -3’ |
| LTPR5 | 5’- TTC AGG CAG TAG CAG ATG GA -3’ |
| LTPR6 | 5’- GCT GTG GTT TTG GCA GAT GT -3’ |
| CF1 | 5’- CCC TTG GAA AAC ACT TAA TTT ATA CT -3’ |
| CR1 | 5’- TGT GTC TGA TCG TTT TTC TAT TTT G -3’ |
| CF2 | 5’- TTC TTC TGC AAT GGC TTC TG -3’ |
| SF1 | 5’- TTT ATG GCT AGC TCC GCT GT -3’ |
| SR1 | 5’- TAT TAG GAT ATT TGT AAC CCG AAA A -3’ |
| SAF1 | 5’- GGC TCA ATC TCA AAC TCG AA -3’ |
| SAR1 | 5’- GCA TTA GGA AAG TAA TTA ACG GAT ACA -3’ |
| NIF | 5’- AAC ACT TCC ATT GCA ACA CG -3’ |
| NIR | 5’- AAG GGT ACA ATC TTT TGA AGA GCA -3’ |
| DAFF | 5’- TGT TCA CCA TGG GGA GAA GT -3’ |
| DAFR | 5’- GTA GTT GCT ACA TAT ACA ACC ATC AAG -3’ |
| SESF | 5’- GAG CAC GGC GCT AGA ACT T -3’ |
| SESR | 5’- GAG TAC ATG AAA GTA GGT ACC GTT G -3’ |

Çizelge 3.7 Oligonükleotidler (devamı)

| | |
|---|---|
| CR1 | 5’- TCT CTG CTC CAC TGA TGA AAT TAT -3’ |
| CR2 | 5’- CAC TGA TGA AAT TAT GGA ACC TTT -3’ |
| CR3 | 5’- TGG AAG GGT CAA TCT TGT ATG -3’ |
| AP | 5’- GGC CAC GCG TCG ACT AGT TTTTTTTTTTTTTT -3’ |
| AUAP | 5’- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC -3’ |

## 3.8 Programlar

### 3.8.1 Chromas

İnternetten indirilebilen bir programdır. Vektör dizilerinin çıkartılması için kullanılmıştır. Dizinler hem FASTA formatında görülebilir hem de kromatogram dosyalarını açar.

### 3.8.2 Primer3

İnternet üzerinden kullanılan bir programdır. Primer tasarlamak amacıyla kullanılmıştır [169].

### 3.8.3 BLAST

NCBI internet sayfası üzerinden kullanılan bir dizin bilgisine benzerlik gösteren dizinleri tespit etmeye yarayan bir programdır [170].

### 3.8.4 EMBOSS Transeq

Nükleotid dizinlerini karşılıkları olan peptid dizinlerine çeviren internet üzerinden kullanılan bir programdır [171].

## 3.9 Bitki Büyütme Koşulları

Zeytin fidanlarının yaprakları yıkanarak olası zirai ilaç kalıntıları uzaklaştırıldı ve fidanlar temiz saksılara dikildi. Ortam koşullarına uyum sağlamaları için bitkiler bir hafta süreyle

22°C'de 14 saat gündüz/15°C'de 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 µmol $m^2s^{-1}$ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde tutuldu.

Bir haftanın sonunda, 4°C'de 14 saat gündüz/2°C'de 10 saat gece periyodunda, gündüz 150 µmol $m^2s^{-1}$ ışık, gece ise karanlık olacak şekilde 10 gün süreyle soğuk stresi verildi.

### 3.10 Bitki Örneklerinin Alınması

Bir haftalık büyüme sonunda, stres verilmeden hemen önce bitkiden yaprak örneği alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak , -80°C'de saklandı. Daha sonra sırası ile 15 ve 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, bir gün, bir hafta ve on gün sonunda yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak, -80°C'de saklandı.

### 3.11 RNA İzolasyonu

#### 3.11.1 RNA İzolasyonu İçin Hazırlık

RNA molekülleri nükleotitlerindeki riboz molekülünün OH grubu nedeniyle biyolojik ortamlarda fazlaca bulunan ribonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır. Bu nedenle RNA izolasyonundan önce ortamdaki RNaz kontaminasyonunun oluşmaması için Applichem DEPC solüsyonu kullanıldı.

RNA izolasyonundan önce kullanılacak havan ve havaneller, tüm cam ve plastik malzemeler %0,1'lik DEPC'li su içerisinde bir gece bekletildi, daha sonra 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Yine benzer şekilde, izolasyonda kullanılacak Tris dışındaki tüm solüsyonlara ve saf suya %0,1 oranında DEPC ilave edildi. Bir gece boyunca bekletilip 121°C'de 20 dakika otoklavlandı. Tris, önceden DEPC ile muamele edilip otoklavlanmış çift distile suda hazırlandı.

#### 3.11.2 Bitki Örneklerinden RNA İzolasyonu

Yaklaşık 100 mg dondurulmuş bitki örnekleri, sıvı azot yardımı ile daha önceden soğutulmuş havan içerisinde toz haline getirilerek, 2 ml'lik tüpe alındı. Her 100 mg örnek için 1 ml Trizol Reagent (bitki ağırlığının %10'u olacak şekilde) ilave edildi. Nükleoprotein komplekslerinin ayrışması için 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

Tüpler vortekslendi. 1 ml Trizol Reagent için 0,2 ml olacak şekilde kloroform eklendi. 15 saniye kuvvetlice elle çalkalandıktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edildi. Daha sonra 12000 xg hızda 4°C'de 15 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda tüpün içindeki karışım, alt kırmızı faz, interfaz ve renksiz üst faz olmak üzere üçe ayrıldı. RNA üst fazdaydı. Üstteki faz ayrı bir tüpe alınarak 1 ml Trizol Reagent için 0,5 ml olacak şekilde izopropanol eklendi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra üst faz alınarak, 12000 xg hızda 4°C'de 20 dakika santrifüjlendi.

RNA, tüpün dibine çöktü, süpernatant atıldı. RNA pelletinin üzerine 1 ml Trizol Reagent için 1 ml %75'lik etanol eklenip, 7500 xg hızda 4°C'de 15 dakika santrifüjlendi. Süpernatant dökülüp pellet şeffaf görününceye kadar kurutuldu. Kuruyan pellet 100 µl DEPC'li su içerisinde çözülmesi için 65°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübe edilen örnekler -80°C'de saklandı.

### 3.11.3 Total RNA Miktarının Belirlenmesi

Trizol kullanılarak izole edilmiş RNA'ların konsantrasyonları UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. RNA'ların konsantrasyonları $OD_{260}$ x 40 µg/ml sulandırma faktörü formülüyle hesaplandı.

## 3.12 RNA'ların Formaldehit Jeli Üzerinde Analizi

### 3.12.1 Formaldehit Jelinin Hazırlanması

Tüm elektroforez aparatları DEPC'li su ile yıkanarak temizlendi. %1'lik jel hazırlamak için 0,8 g agaroz (Applichem), 16 ml 5X MOPS, 50 ml su ile çözüldü, 60°C'ye soğutuldu. İçerisine 60°C'ye ısıtılmış 14 ml formaldehit ilave edilip, jel tepsisine döküldü.

### 3.12.2 Formaldehit Jeli İçin RNA Örneklerinin Hazırlanması

4,5 µl RNA'ya, 2 µl 5X MOPS, 3,5 µl formaldehit, 10 µl formamid ve 0,5 µl Etidyum bromid ilave edilerek, 55°C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu karışıma 2 µl yükleme tamponu ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Total RNA'lar MOPS tamponuyla hazırlanmış %1'lik agaroz jelde 60V'da 90 dakika yürütüldü.

### 3.12.3 Primerlerin Tasarlanması

Tam uzunluktaki cDNA'yı elde edebilmek için, ileri ve geri primerler Primer3 programı kullanılarak NCBI web sayfasında bulunan Özdemir Özgentürk vd. çalışmasındaki zeytin lipid transfer protein kontig dizin bilgisinden ve referans olarak alınan *Spinacia oleracea, Sesamum indicum, Davidia involucrata, Nicotiana attenuata, Salvia miltiorrhiza* bitkilerinden yararlanılarak tasarlandı.

## 3.13 RT PCR

### 3.13.1 cDNA Sentezi

Stres verilmemiş ve 6 saat soğuk stresi verilmiş RNA'lardan Invitrogen Super Script III Ters Transkriptaz Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde 5 µg total RNA kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Total RNA'ya adaptör primer (AP) (10 µM), dNTP karışımı (10 mM) ve su eklenip, 70°C'de 10 dakika ve 4°C'de 1 dakika inkübe edildi. Reaksiyonun üzerine, 10X PCR Buffer, DTT (0,1 M), $MgCl_2$ (25 mM) katılarak reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı. 42°C'de 5 dakika inkübe edildikten sonra ters transkriptaz enzimi (200U/µl) ilave edilerek 42°C'de 1,5 saat ve 70°C'de 15 dakika inkübe edildi. Üzerine RNase H ilave edildi ve 37°C'de 20 dakika inkübe edildi.

## 3.14 3' RACE

### 3.14.1 PCR Reaksiyonu

200 µl'lik PCR tüpü içerisinde, kalıp cDNA, 10X PCR Buffer, dNTP karışımı (10 mM), ileri primer (10 µM) ve ters primer (10µM), abriged universal amplifikasyon primeri (AUAP) (10 µM), $MgCl_2$ (25 mM), 2,5U Taq Polimeraz enzimi (5U/µl) koyulup, 50 µl'ye tamamlandı.

Primer bağlanma sıcaklıklarında PCR gerçekleştirildi.

İlk PCR döngüsü, 94°C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra, 94°C'de 15 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 40 saniye uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72°C'de 10 dakika son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20°C'de saklandı.

Reaksiyonun çalışıp çalışmadığı jel üzerinde kontrol edildi.

### 3.14.2 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik jel hazırlamak için 0,8 g agaroz (Applichem), 80 ml 1X TAE eklenip ısıtılarak çözüldü. 60°C'ye soğutulup içersine 3 µl etidyum bromür eklenerek jel tepsisine döküldü.

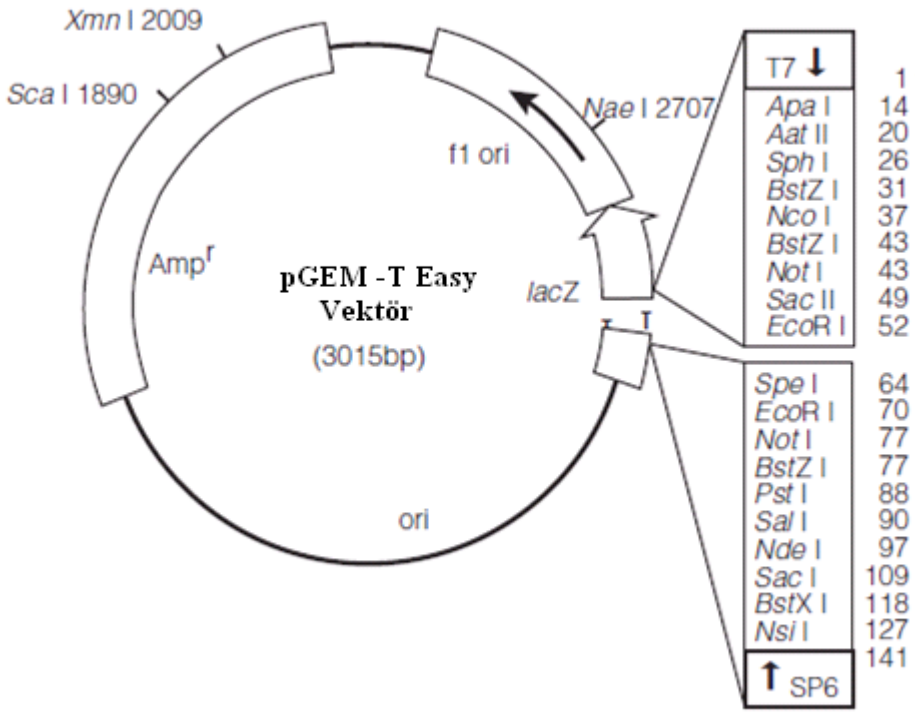
Örnekler yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. 70V'ta 1 saat 20 dakika yürütüldü.

### 3.14.3 PCR Ürününün Agaroz Jelden Pürifikasyonu

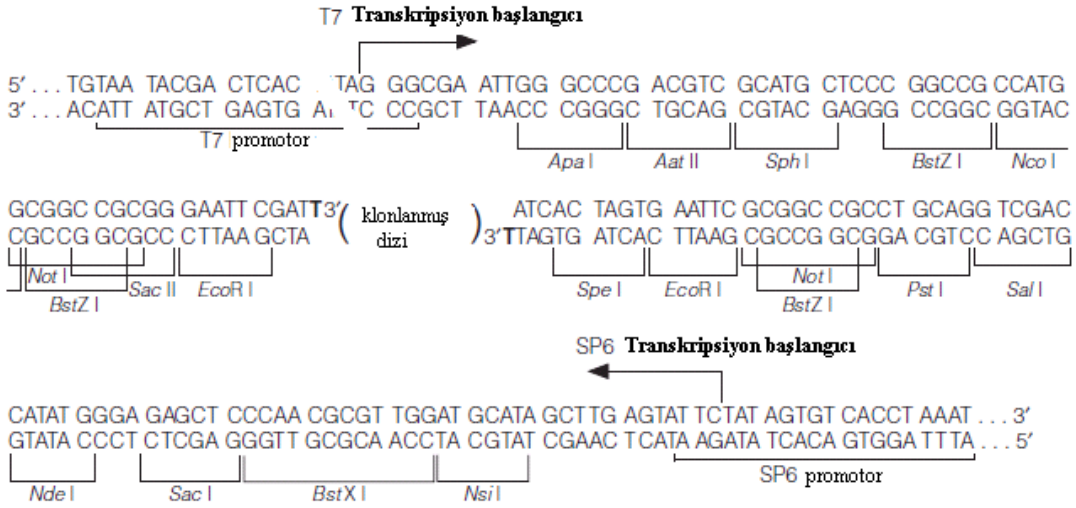
PCR ürünlerinin pürifikasyonu Qiaquick Jel Ekstraksiyon Kiti ile kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde yapıldı. Fragman agaroz jelden bistüri yardımı ile kesilip 2 ml'lik tüplere alındı. Jel hacminin 3 katı kadar QG tamponu eklenip 50 °C'de 10 dakika inkübe edildi. Jel hacmi kadar izopopanol eklendi ve karıştırıldı. QIAquick kolonlarına aktarılarak 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. Üzerine 0,5 ml QG tamponu eklenip 17900 xg hızda santrifüj edildi. 0,75 ml PE tamponu eklenip 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi. QIAquick kolonları 1,5 ml'lik temiz tüplere alınarak 15 µl steril su eklenerek 1 dakika 17900 xg hızda santrifüj edildi.

### 3.14.4 Vektör Ligasyonu

Klonlama vektörü olarak Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Vektörün şematik gösterimi Şekil 3.1'de ve çoklu klonlama bölgesi Şekil 3.2'de verilmiştir (Promega Vektör Kullanım Kılavuzu).




Şekil 3.1 pGEM-T Easy vektörünün şematik gösterimi




Şekil 3.2 pGEM-T Easy vektörünün çoklu klonlama bölgesi

Ligasyon reaksiyonu Promega Vektör Kullanım Kılavuzunda önerildiği gibi vektör DNA'sı ile cDNA oranları 1/3 ve 1/2 arasında olacak şekilde hazırlandı. Ligasyonlar, 4°C'de 24 saat inkübe edildi.

### 3.14.5 Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Ultra kompetan hücreler Inoue vd. [173]'nin optimize ettiği protokoldeki gibi hazırlandı. 250 ml SOB içersine 5–10 *E.coli* DH5α kolonisi ekilerek 22°C'de 20–24 saat kadar $OD_{600}$ 6,6'ya ulaşana kadar büyütüldü. 10 dakika buzda bekletildikten sonra 3000xg hızda 4°C'de 10 dakika santrifüjlendi. 80 ml soğuk TB içersinde çözülüp, 10 dakika buzda bekletildi. 3000 xg hızda 4°C'de 10 dakika santrifüjlendikten sonra 20 ml soğuk TB içersinde çözülüp %7'si kadar DMSO ilave edildi. 10 dakika buzda bekletilip sıvı azot ile dondurularak -80°C'de saklandı.

### 3.14.6 Transformasyon

#### 3.14.6.1 Transformasyon Reaksiyonunun Kurulması

3.14.5'de anlatıldığı şekilde hazırlanan ultra kompetan hücrelerden 200 µl'si ile vektöre bağlanmış DNA dan 5 µl'si karıştırıldı ve 30 dakika buz üzerinde bekletildi. 42°C'de 1 dk tutulduktan sonra buzun üzerine alınarak 800 µl SOC ilave edilerek, 37°C'de 220 rpm hızda 45 dakika büyütüldü.

Transformasyon karışımı katı Luria-Bertani ortamına ekilerek, 37°C'de 16 saat büyütüldü. pGEM-T Easy vektörüne aktarımında, katı besi yerleri içine plazmid almış kolonilerin seçimi için 100 µg/ml Ampisillinle ve rekombinant plazmidlerin seçimi için 0,5 mM IPTG ve 30 µg/ml X- gal içermekteydi.

pGEM-T Easy vektörüne klonlanmış cDNA'ların seçiminde izlenen protokolde, mavi renkte gözlemlenen koloniler klonlanması istenen cDNA'yı alamadan kapanmış hücrelerden, beyaz renkte gözlemlenen koloniler ise cDNA'ları alarak kapanmış plazmidleri içeren hücrelerden oluşmaktaydı.

### 3.14.7 Plazmitlerin İzolasyonu

İstenilen DNA'yı taşıdığı belirlenen her bir koloni, antibiyotik ilave edilmiş (100 µg/ml) katı Luria-Bertani ortamına tek tek ekilerek, 37°C'de 16 saat büyütüldüler. Plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti Kullanım Kılavuzunda önerilen biçimde yapıldı.

2 ml kültür santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü, üzerine RNaz içeren Süspansiyon çözeltisinden 250 µl ilave edilerek hücreler yeniden çözüldü. 250 µl Lizis çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 350 µl Binding çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılıp, 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi, 13000 xg hızda 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant filtrelere pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı. Yüksek nükleaz aktivitesini engellemek için, filtrelere 500 µl Yıkama Çözeltisi I pipetlenip, 1 dakika 3000 xg hızda santrifüjlendi. Hücreleri yıkamak için filtrelere 700 µl Yıkama Çözeltisi II pipetlenip, 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpte biriken sıvı atıldı ve filtre kurutulmak için 13000 xg hızda 1 dakika santrifüjlendi. DNA'yı filtreden ayırmak için filtre temiz tüpe alınıp, üzerine 100 µl Elution çözeltisi eklenip 1 dakika 13000 xg hızda santrifüjlendi. Tüpe geçen DNA -20°C'de saklandı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

## 3.15 5' RACE

### 3.15.1 cDNA Sentezi

Kontrol, 1 haftalık ve 10 günlük soğuk stresi verilmiş RNA'lardan Invitrogen 5' RACE Kiti kullanım kılavuzunda anlatıldığı şekilde cDNA sentezi yapıldı. 4 µg total RNA DEPC'li su ile 14,5 µl'ye tamamlandı ve GSP1 primeri (2,5 pmole) eklendi. 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. 10X PCR Buffer, $MgCl_2$ (25 mM), dNTP (10 mM), DTT (1,0 M) eklenip 42°C'de 1 dakika inkübe edildi. Reaksiyona Ters Transkriptaz enzimi katılarak, reaksiyon hacmi 25 µl'ye tamamlandı. 42°C'de 92 dakika ve 70°C'de 15 dakika inkübe edildi. RNase karışımı eklenerek 30 dakika 37°C'de inkübe edildi.

### 3.15.2 cDNA'nın Saflaştırılması

Reaksiyon sonrası tüpe 120 µl bağlanma solüsyonu eklendi. Reaksiyon filtreli tüplere alındı ve 13000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre üzerine 400 µl 1X Yıkama Solusyonu ilave edildi ve 13000 xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşama 3 defa tekrar

edildi. Filtre 400 µl %70'lik etanolle yıkandı ve 13000 xg'de santrifüj edildi. Bu aşama 1 defa daha tekrar edildi. Filtre temiz 1,5 ml tüpe aktarıldı ve üzerine 50 µl PCR su eklendi. 13000 xg'de 20 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elimizde saf cDNA kaldı.

### 3.15.3 TdT Kuyruğu Eklenmesi

200 µl PCR tüpü içerisine DEPC'li su, 5X Tailing Solusyonu, dCTP (2 mM) ve cDNA koyuldu ve bu karışım 94°C'de 3 dakika ve 4°C'de 1 dakika inkübe edildi. Üzerine 1 µl TdT eklenip 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Ek olarak TdT'nin inaktif olabilmesi için 65°C'de 10 dakika inkübe edildi.

### 3.15.4 PCR Reaksiyonu

200 µl'lik PCR tüpü içerisinde kalıp cDNA, 10X PCR Buffer, Taq Buffer, dNTP karışımı (10 mM), GSP2 primer (10 µM) ve AAP primer (10 nM), Taq Polimeraz enzimi koyulup, 50 µl'ye tamamlandı.

PCR döngüsü 94°C'de 2,5 dakika denatüre edildikten sonra, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72°C'de 7 dakika son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20°C'de saklandı.

### 3.15.5 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik jel 3.14.2'te anlatıldığı gibi hazırlandı.

### 3.15.6 Nested PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonu sonrası örnekler 1:10 oranında seyreltildi. 200 µl PCR tüpü içerisinde 10X PCR Buffer, $MgCl_2$ (25 mM), dNTP karışımı (10 mM), GSP3 primeri, AUAP primeri (10 µl), Taq Buffer, seyreltilmiş PCR örneği ve 2,5 U Taq DNA polimeraz enzimi koyulup 50 µl'ye tamamlandı.

94°C'de 2,5 dakika denatüre edildikten sonra, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72°C'de 1 dakika uzatma aşamaları 35 kez tekrarlandı. 72°C'de 7 dakika son uzatma yapılarak, örnekler buz üzerine alınıp -20°C'de saklandı.

### 3.15.7 DNA'nın Agaroz Jel Üzerinde Analizi

%1'lik jel 3.14.2'te anlatıldığı gibi hazırlandı.

### 3.15.8 PCR Ürünlerinin Agaroz Jelden Pürifikasyonu

PCR ürünlerinin pürifikasyonu 3.14.3'te anlatıldığı şekilde yapıldı.

### 3.15.9 Vektör Ligasyonu

PCR ürünlerinin ligasyonu için Promega pGEM-T Easy vektörü kullanıldı. Ligasyon reaksiyonu 3.14.4'te anlatıldığı şekilde yapıldı.

### 3.15.10 Transformasyon

Transformasyon 3.14.5'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

### 3.15.11 Plazmit İzolasyonu

Plazmit izolasyonu 3.14.6'de anlatıldığı biçimde yapıldı.

Dizin analizine gönderilmeden önce, çoklu klonlama bölgesinde bulunan kesim bölgelerine uygun bir enzimle kesilerek lineerize edildi ve miktarı belirlenerek dizin analizine gönderildi.

# BÖLÜM 4

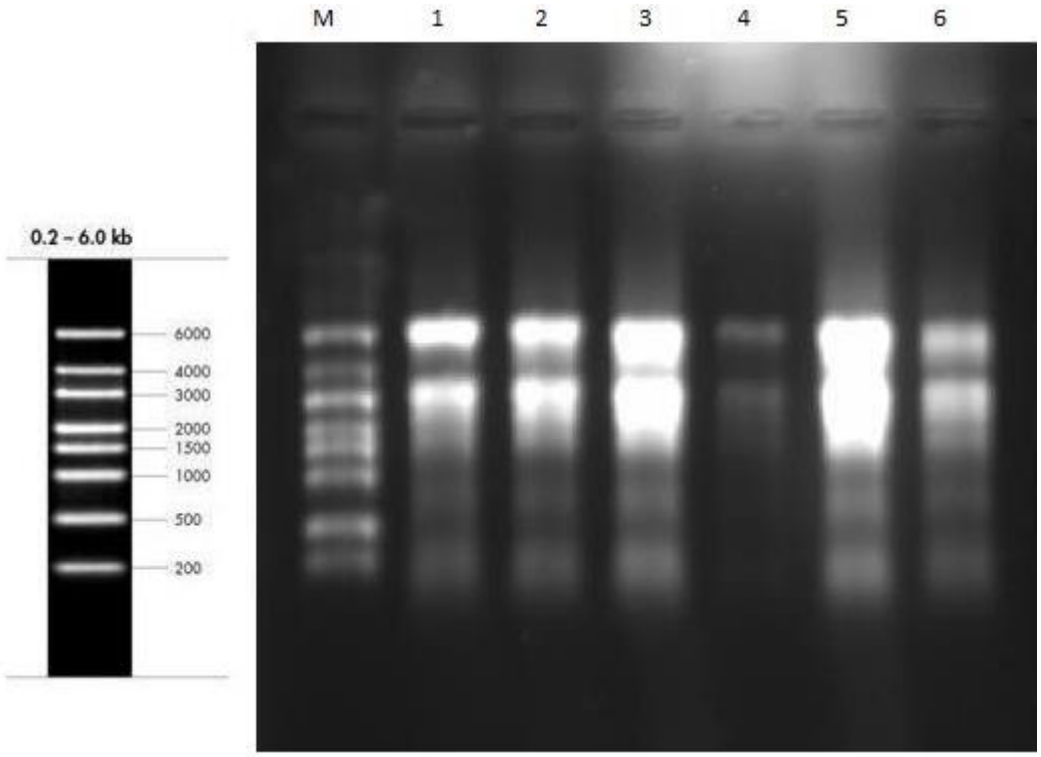
# SONUÇLAR

## 4.1 Bitki Örneklerinin Alınması

Bitkiye stres verilmeden önce yaprak örnekleri alınarak sıvı azot içersinde donduruldu ve -80°C'de saklandı. 30 dakika, 1 saat, 2 saat, 4 saat, 6 saat, bir gün, bir hafta ve on gün sonunda stres verilen bitkiden yaprak örnekleri alınıp, sıvı azot içerisinde dondurularak, -80°C'de saklandı.

## 4.2 RNA İzolasyonu

Yapraklardan izole edilen RNA %1'lik RNA jeline yüklenerek (Şekil 4.1) RNA miktar ve kalitesi belirlendi.




Şekil 4.1 RNA'ların %1'lik formaldehit jeli üzerinde görüntülenmesi. M. High Range RNA Ladder, 1. Kontrol RNA örneği, 2. 15 dakika soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 3. 1 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 4. 4 saat soğuk stresi verilmiş örnek RNA'sı, 5. 6 saat soğuk stres verilmiş örnek, 6. 1 gün soğuk stres verilmiş örnek.

## 4.3 PCR ile İlgili Sonuçlar

### 4.3.1 RT-PCR

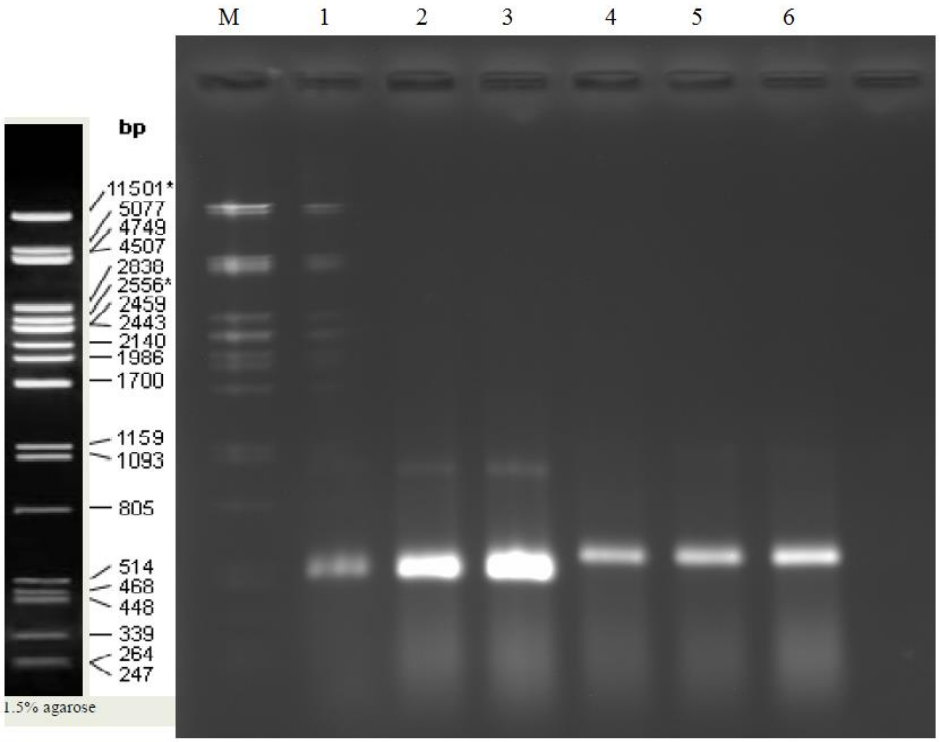
RNA'ların formaldehit jeli üzerindeki görüntülerine bağlı olarak yoğun görünen sekilde yer alan 3 ve 5 nolu örneklerin izolasyondan elde edilen total RNA'lar kullanılarak PCR reaksiyonu kurulmuştur.

### 4.3.2 3' RACE İle İlgili Sonuçlar

3' RACE'te, mRNA'nın poli(A) kuyruğuna bağlanan bir oligo–dT ve gen spesifik primer kullanılarak cDNA'nın 3' ucu PCR ile çoğaltıldı.

Sentezlenen kontrol, 1 saat, 6 saat stres verilmiş cDNA'lar kullanılarak yapılan PCR'ın ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek, kalite ve büyüklüğü kontrol edildi. PCR reaksiyonunda *Olea europaea* kontig dizisinden yararlanılarak tasarlanan LTPF15, LTPF25, CF1, CF2, *Spinacia oleracea* referans alınarak tasarlanan SF1, *Salvia miltiorrhiza*

SAF1, SAR, *Nicotiana attenuata* referans alınarak tasarlanan NIF, NIFR, *Davidia involucrata* referans alınarak tasarlanan DAFF, DAFR ve *Sesamum indicum* referans alınarak tasarlanan SESF, SESR primerleri ile 3' RACE için PCR reaksiyonu kurulmuştur. Bunlardan LTPF15, LTPF25 ve AUAP primerleriyle 55°C primer bağlanma sıcaklığında 1 saat ve 6 saat stres verilmiş RNA kullanılarak kurulan reaksiyonlar en iyi sonucu vermiştir ve yaklaşık 514 bç boyunda bir DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.2).




Şekil 4.2 3'RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. M. PSTλ Marker 1. LTPF15 primeri(0 saat) 2. LTPF15 primeri(1 saat) 3. LTPF15 primeri(6 saat) 4. LTPF25 primeri(0 saat) 5. LTPF25 primeri(1 saat) 6. LTPF25 primeri(6 saat)

### 4.3.3 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu ve Transformasyon

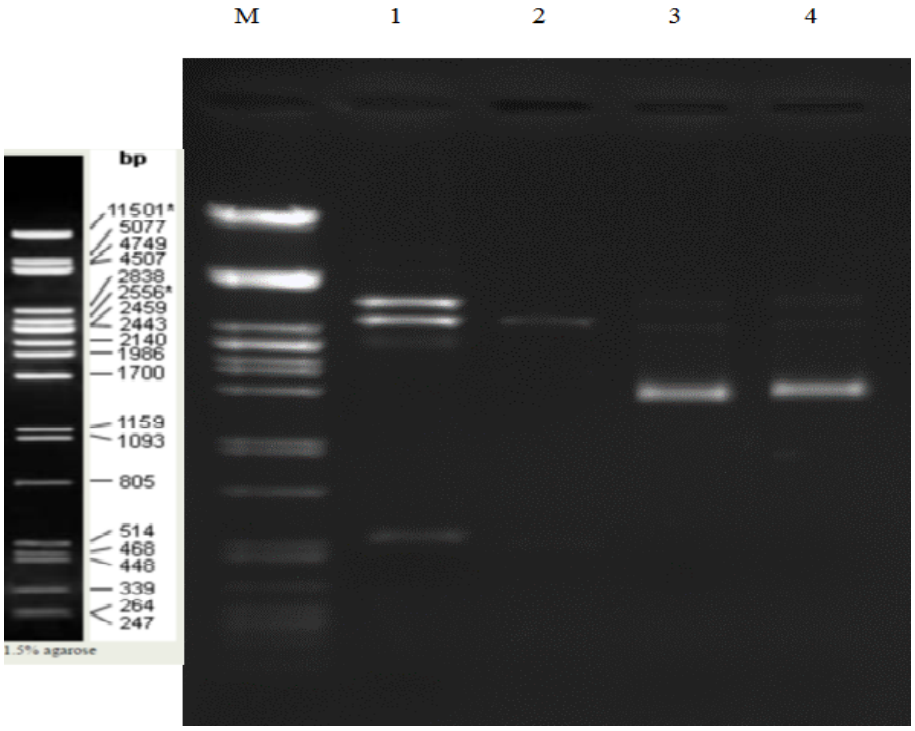
PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren stres verilmemiş örnekler, 1 saat ve 6 saat stres verilmiş örnekler LTPF15 ve LTPF25 primerleri ile elde edilen örnekler Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı. Vektöre bağlanan DNA'nın 5 µl'si 200 µl kompetan hücre ile karıştırılıp transformasyon yapıldı. Mavi beyaz seçilimi için antibiyotik (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM) ve X- gal (30 µg/ml) ilave edilmiş katı Luria-Bertani ortamına ekilerek 37°C'de 16 saat büyütüldü.

16 saat sonunda 6 saat stres verilmiş örneğin transformasyonundan 57 beyaz koloni elde edildi.

### 4.3.4 Plazmit İzolasyonu

İstenilen uzunlukta DNA'yı taşıdığı belirlenen kolonilerden 4 tanesinden plazmit izolasyonu Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak yapıldı.

İzole edilen plazmit EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirildiler. 6 saat stres verilmiş örneklerin kesiminde yaklaşık 500 bç büyüklüğünde bir fragment gözlendi (Şekil 4.3).




Şekil 4.3 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. M. PstΛ Marker 1. LTPF15(6)_B10 2. LTPF15(6)_7 2. LTPF25(1)_5 2. LTPF25(1)_B_2

### 4.3.5 Dizi Analizi ve Benzerlik Analizleri

DNA içerdiği tespit edilen plazmit LTP15(6)_B10 için dizin analizi yapıldı ve 337 bç uzunluğunda bir dizin elde edildi.

Elde edilen DNA dizininin GenBank veritabanında kaydedilmiş dizilere benzerliklerinin ve olası fonksiyonlarının belirlenmesinde BLAST programı NCBI web sitesinden

kullanıldı. BLAST programı yaygın olarak kullanılan dizi benzerlik sorgulaması programıdır. CHROMAS programı ile vektör dizileri çıkarılan dizinin BLASTN (nükleotit benzerlik araştırması) ve BLASTP (aminoasit benzerlik araştırılması) analizi yapıldı.

BLASTN analizlerinin sonuçları üç bölüm halindedir (Şekil 4.4), (Şekil 4.5). (Şekil 4.6).



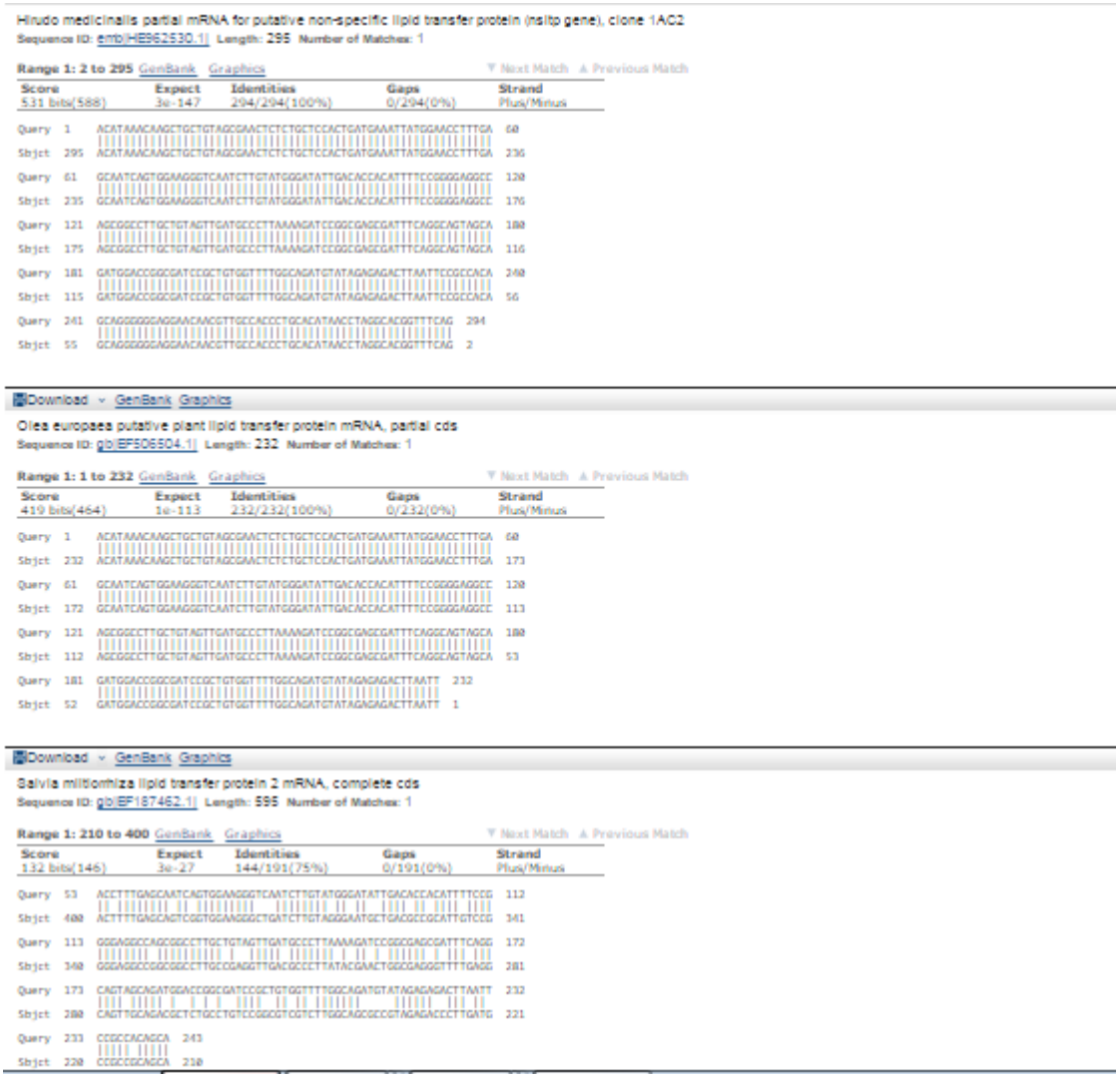

Şekil 4.4 Dizinin özelliği hakkında bilgi verir ve benzerlik skorunu grafiksel olarak gösterir.



| Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Hirudo medicinalis partial mRNA for putative non-specific lipid transfer protein (nsltp gene), clone 1AC2 | 531 | 531 | 87% | 3e-147 | 100% | HE962530.1 |
| Olea europaea putative plant lipid transfer protein mRNA, partial cds | 419 | 419 | 68% | 1e-113 | 100% | EF506504.1 |
| Salvia miltiorrhiza lipid transfer protein 2 mRNA, complete cds | 132 | 132 | 56% | 3e-27 | 75% | EF187462.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171986), mRNA | 111 | 111 | 56% | 8e-21 | 73% | XM_011093289.1 |
| Sesamum indicum lipid transfer protein (LTP4) mRNA, complete cds | 111 | 111 | 56% | 8e-21 | 73% | EF581317.1 |
| Sesamum indicum lipid transfer protein (LTP3) mRNA, complete cds | 102 | 102 | 56% | 4e-18 | 72% | EF581316.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171991), mRNA | 100 | 100 | 36% | 1e-17 | 78% | XM_011093295.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171989), mRNA | 100 | 100 | 36% | 1e-17 | 78% | XM_011093293.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171988), mRNA | 100 | 100 | 36% | 1e-17 | 78% | XM_011093292.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171987), mRNA | 100 | 100 | 23% | 1e-17 | 88% | XM_011093290.1 |
| Leonurus japonicus non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein (Afp) mRNA, complete cds | 98.7 | 98.7 | 45% | 5e-17 | 74% | AY971513.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 1-like (LOC105172107), mRNA | 96.9 | 96.9 | 34% | 2e-16 | 78% | XM_011093444.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171990), mRNA | 96.9 | 96.9 | 56% | 2e-16 | 71% | XM_011093294.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105174660), mRNA | 91.5 | 91.5 | 50% | 8e-15 | 72% | XM_011096833.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171985), mRNA | 91.5 | 91.5 | 23% | 8e-15 | 85% | XM_011093288.1 |
| Sesamum indicum lipid transfer protein (LTP5) mRNA, complete cds | 91.5 | 91.5 | 50% | 8e-15 | 72% | EF581318.1 |
| PREDICTED: Sesamum indicum non-specific lipid-transfer protein 2-like (LOC105171994), mRNA | 89.7 | 89.7 | 56% | 3e-14 | 70% | XM_011093299.1 |
| Solanum pennellii chromosome ch10, complete genome | 89.7 | 195 | 56% | 3e-14 | 78% | HG975449.1 |
| Solanum lycopersicum cDNA, clone: FC15DD02, HTC in fruit | 89.7 | 89.7 | 36% | 3e-14 | 77% | AK246907.1 |
| Solanum lycopersicum non-specific lipid transfer protein (LE16), mRNA | 89.7 | 89.7 | 36% | 3e-14 | 77% | NM_001247024.1 |
| Lycopersicon esculentum non specific lipid transfer protein (le16) mRNA, complete cds | 89.7 | 89.7 | 36% | 3e-14 | 77% | U81996.1 |

Şekil 4.5 İncelenen dizi ile benzerlik gösteren sekansları ve bu sekansların analiz sonuçlarını verir.

Analiz sonuçlarında; veritabanındaki dizilerin tanınmasını sağlayan numaralar (Accession number), benzerlik gösteren dizinin fonksiyonuna ve ait olduğu organizmaya ait bilgi (Description), karşılaştırılan dizilerin uzunluk anlamında ne derece birbirlerini kapsadıkları (Ouery Coverage), karşılaştırılan dizilerin bir pozisyonda aynı nükleotide sahip olmasının rastlantısal olabilme durumu (E-value terimi), birbirleri arasında benzerlik tespit edilen diziler arasındaki homolojinin derecesi (Maximum Identy) belirtilir.




Şekil 4.6 Benzerlikleri verilen dizilerin karşılaştırmalı olarak nükleotit düzeyinde benzerliklerini verir.

LTPF15(6) fragmenti BLASTN analizi sonucu ilk sırada *Olea europaea* lipid transfer proteinin dizinine benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.1). Tüm benzerlik listesi Ek A'da verilmiştir.

Çizelge 4.1 LTP15(6)_B10 BLASTN sonuçları

| İsim | Primerler | Dizi Uzuluğu | RNA | BLASTN | Skor |
|---|---|---|---|---|---|
| LTP15(6) | LTPF15-AUAP | 337 | 6 saat stres verilmiş | *Hirudo medicinalis* partial mRNA for putative non-specific lipid transfer protein (nsltp gene) | 531 |

LTPF15(6) fragmenti BLASTP analizi sonucunda lipid transfer proteininin korunmuş bölgeleri saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 LTPF15(6)_B10 BLASTP sonuçları

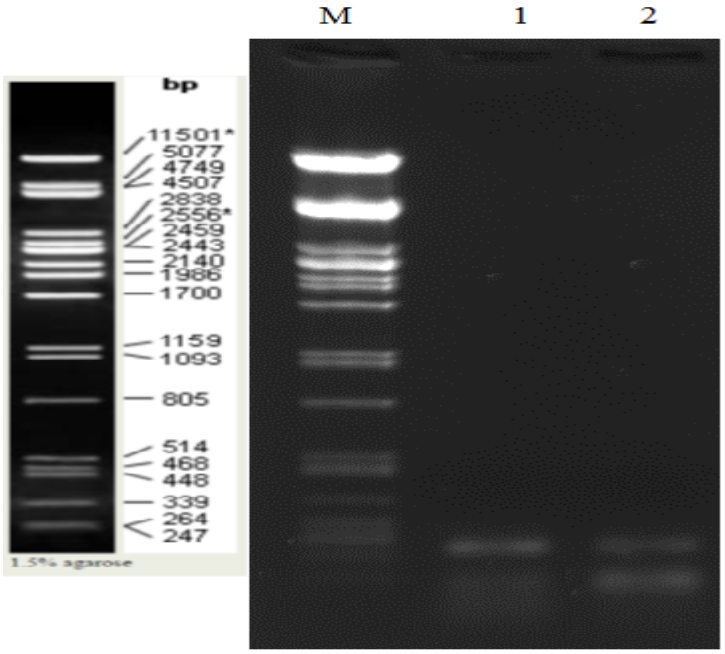
| İsim | Dizi uzunluğu | Korunmuş Domain | Tanım | Skor |
|---|---|---|---|---|
| LTPF15(6)_B10 Frame1 | 89 | nsLTP1 | Non-specific lipid-transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily | 124.38 |
| LTPF15(6)_B10 Frame1 | 75 | Tryp_alpha_amylase inhibitor | Protease inhibitor/seed storage/LTP family | 55.66 |
| LTPF15(6)_B10 Frame1 | 79 | AAI | Plant lipid transfer protein / seed storage protein / trypsin-alpha amylase inhibitor domain family | 42.36 |

BLASTP analizleri için dizinlerin protein bilgisi kullanıldı. Klonlama yönlü olmadığından doğru protein kodlayan dizinin vektöre yerleşme şansı 1/6'dır. Ayrıca dizin okumalarındaki olası yanlışlıklar frame kaymalarına neden olabilir. Bu nedenlerle EMBOSS Transeq internet programında kontig ve singletlere ait proteinlerin 1., 2. ve 3. framelerde aminoasit dizin bilgisi oluşturuldu [134]. Her üç frame için BLASTP analizleri yapıldı.

### 4.3.6 5' RACE İle İlgili Sonuçlar

Sentezlenen 6 saat stres verilmiş örneklerin cDNA'ları kullanılarak PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek, büyüklüğü kontrol edildi

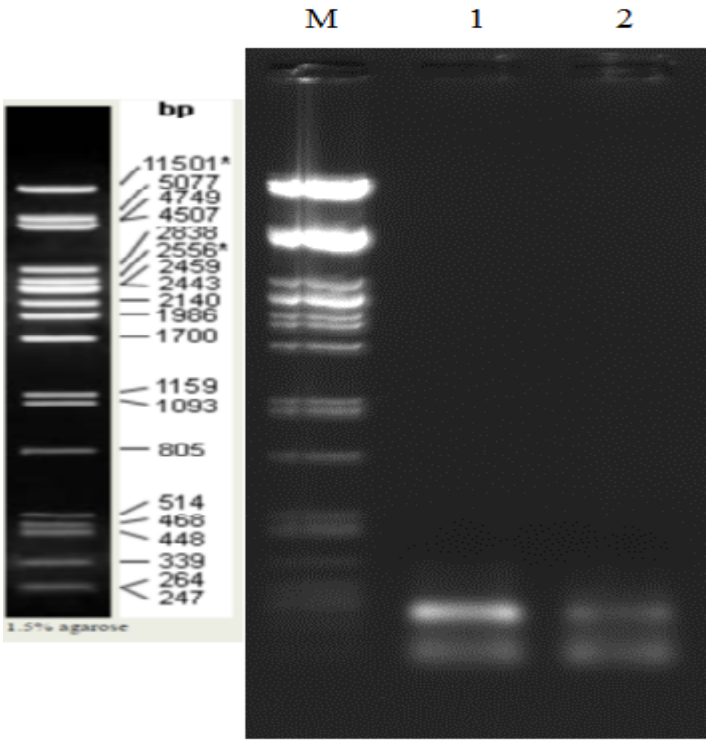
(Şekil 4.5). PCR reaksiyonunda *Olea europaea* kontig dizisinden yararlanılarak tasarlanan LTPR1, LTPR2, LTPR3, LTPR4, LTPR5, CR1, CR2, CR3 primerleri ile 5' RACE için PCR reaksiyonu kurulmuştur. Bunlardan LTPFR1, LTPR2 ve LTPR3 primerleriyle 55°C primer bağlanma sıcaklığında 1 saat ve 6 saat stres verilmiş RNA kullanılarak kurulan reaksiyonlar en iyi sonucu vermiştir ve yaklaşık 264 bç boyunda bir DNA bandı elde edilmiştir (Şekil 4.2).




Şekil 4.7 5' RACE PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. M. PSTλ Marker 1. LTPR1(0saat) 2. LTPR1primeri(6 saat)

### 4.3.7 Nested PCR Reaksiyonu

İlk PCR reaksiyonu sonucunda yaklaşık 264 bç büyüklüğünde elde edilen sonuç doğrultusunda 6 saat stres verilmiş örneklerin 3.15.4'da belirtilen koşullarda gen spesifik LTR2 primeri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirildi. Nested PCR, nonspesifik çoğalmayı önlemek amacıyla, dilüsyon yapılmış PCR ürünü ile gerçekleştirilir. PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek büyüklüğü kontrol edildi (Şekil 4.6).




Şekil 4.8 PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. M. PSTλ Marker 1. LTPR2 primeri (0 saat) 2. LTPR2 primeri (6 saat)

### 4.3.8 PCR Ürünlerinin Vektöre Ligasyonu ve Transformasyon

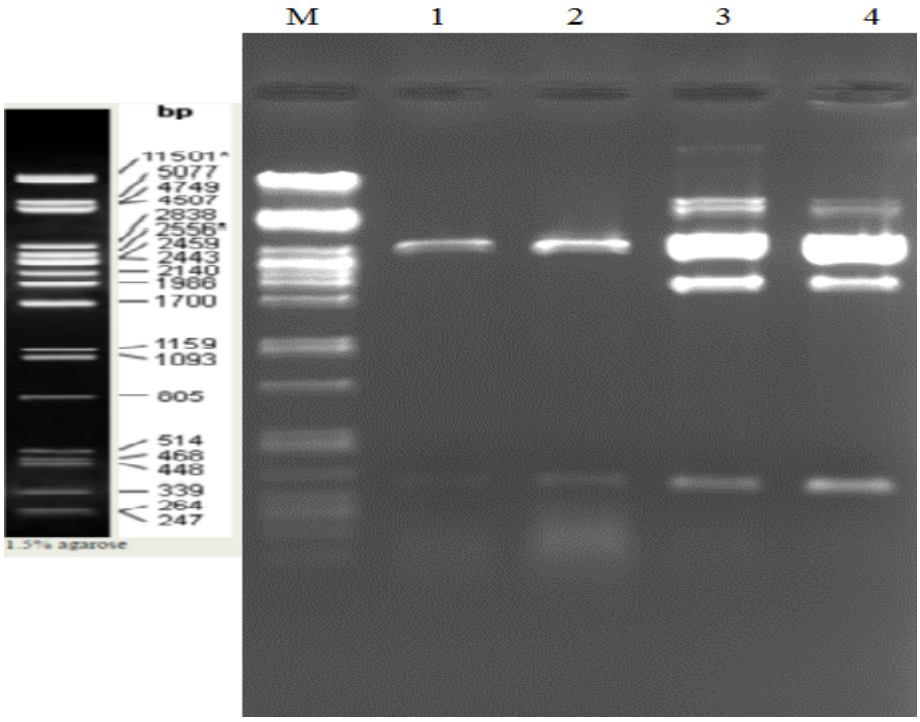
PCR reaksiyonunda pozitif sonuç veren 6 saat stres verilmiş örneklerden elde edilen cDNA'lar Promega pGEM-T Easy vektörüne klonlandı.

16 saat sonunda, 6 saat stres verilmiş LTPR2(0) örneğinin 55°C'deki transformasyonunda 14 beyaz koloni, 6 saat stres verilmiş LTPR2(6) örneğinin 55°C'deki transformasyonundan 23 beyaz koloni elde edildi.

### 4.3.9 Plazmit İzolasyonu

LTP cDNA'sını taşıdığı belirlenen koloniden Roche High Pure Plasmid İzolasyon Kiti kullanılarak plazmit izolasyonu yapıldı.

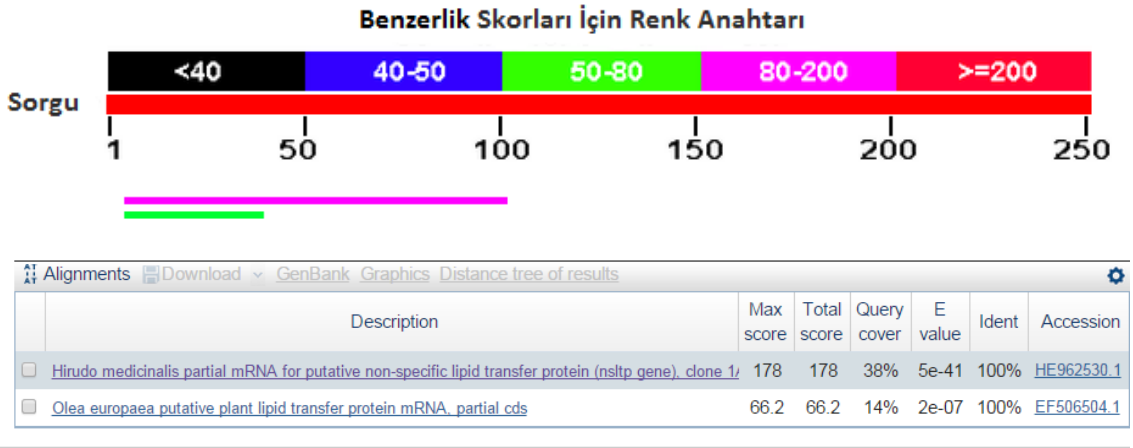
İzole edilen plazmitler EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirildiler. 6 saat stres verilmiş örneklerin kesiminde istenilen uzunlukta cDNA taşıdıkları görüldü. Restriksiyon enzimi ile kesim reaksiyonu sonucunda yaklaşık 339 bç büyüklüğünde bir fragment görülmektedir.



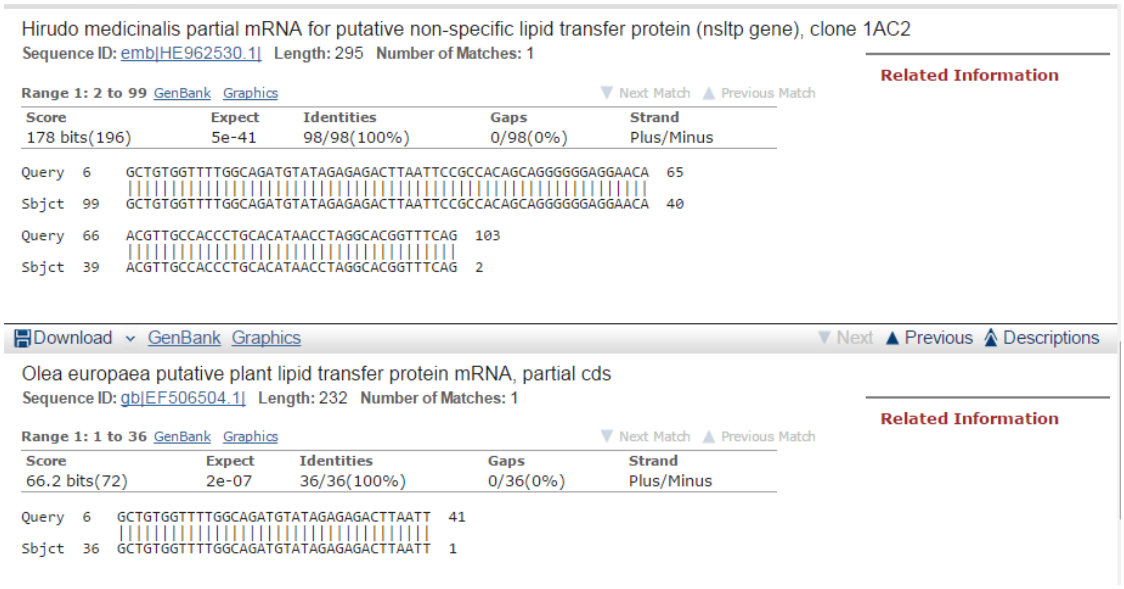

Şekil 4.9 EcoRI enzimi ile kesilerek lineer hale getirilen plazmitlerin %1'lik agaroz jel üzerinde görüntüsü. M. PSTλ Marker 1. LTPR(6)_8 2. LTPR(6)_10 3. LTPR(6)_7 4. LTPR(6)_9

### 4.3.10 Dizi Analizi ve Benzerlik Analizleri

İstenilen uzunlukta cDNA'yı içerdiği tespit edilen plazmit LTPR6_9 olarak adlandırıldı ve dizin analizi yapılarak 253 bç uzunluğunda bir fragment elde edilmiştir. BLASTN analizleri 3'RACE gibi yapıldı (Şekil 4.10).




Şekil 4.10 DNA fragmenti dizininin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü




Şekil 4.10 DNA fragmenti dizininin BLAST analizi sonuçlarının NCBI web sayfasındaki görüntüsü (devamı)

LTPR(6)_9 fragmenti BLASTN analizi sonucu ilk sırada *Hirudo medicinalis* lipid transfer proteinin dizinine benzerlik göstermiştir (Çizelge 4.3). Tüm benzerlik listesi Ek B'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 LTPR6_9 BLASTN Sonuçları

| İsim | Primerler | Dizi Uzuluğu | RNA | BLASTN | Skor |
|---|---|---|---|---|---|
| LTPR6_9 | LTPR-AUAP | 295 | 6 saat stres verilmiş | *Hirudo medicinalis* partial mRNA for putative non-specific lipid transfer protein (nsltp gene) | 178 |
| LTPR6_9 | LTPR-AUAP | 232 | 6 saat stres verilmiş | *Olea europaea* putative plant lipid transfer protein mRNA, partial cds | 66.2 |

LTPF15(6) fragmenti BLASTP analizi sonucunda lipid transfer proteininin korunmuş bölgeleri saptanmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 LTPR6_9 BLASTP Sonuçları

| **İsim** | **Dizi uzunluğu** | **Korunmuş Domain** | **Tanım** | **Skor** |
|---|---|---|---|---|
| LTPR6_9 Frame2 | 89 | nsLTP1 | Non-specific lipid-transfer protein type 1 (nsLTP1) subfamily | 56.97 |
| LTPR6_9 Frame2 | 75 | Tryp_alpha_ amylase inhibitor | Protease inhibitor/seed storage/LTP family | 35.63 |
| LTPR6_9 Frame2 | 79 | AAI | Plant lipid transfer protein / seed storage protein / trypsin-alpha amylase inhibitor domain family | 31.58 |

# BÖLÜM 5

## TARTIŞMA VE ÖNERİLER

Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmada kontigler ve EST'ler içerisinde saptanan LTP genini kodlayan kontig dizilerinden biri seçildi ve kontig dizin bilgisinden yararlanılarak Primer3 programı ile tam uzunlukta lipid transfer proteini kodlayan gen bölgesinin elde edilmesi için RACE yöntemi kullanılmıştır. Kontig dizisinden yaralanarak tasarlanan primerler olan LTPF15, LTPF25, CF1 ve CF2 adlarını verdiğimiz primerler arasında LTPF15 primeri gen bölgesinin 3' ucunun uzatılması için istenilen uzunlukta cDNA'nın elde edilmesini sağlamıştır. NCBI veritabanında bulunan *Spinacia oleracea* referans alınarak tasarlanan SF1, *Salvia miltiorrhiza* referans alınarak tasarlanan SAF1, SAR, *Nicotiana attenuata* referans alınarak tasarlanan NIF, NIFR, *Davidia involucrata* referans alınarak tasarlanan DAFF, DAFR ve *Sesamum indicum* referans alınarak tasarlanan SESF, SESR primerler ile lipid transfer proteini kodlayan gen bölgesinin 3' ucunun uzaltılması için PCR reaksiyonunda kullanılmıştır ve bu primerler ile zeytin LTP gen bölgesinin uzatılması ve çoğaltılması sağlanamamıştır. LTPF15 primeri ile elde edilen cDNA'nın *E. coli* hücresine transformasyonu sağlanmış ve plazmid izolasyonu sonucunda örnek, dizin bilgisinin öğrenilmesi için dizin analizine gönderilmiştir.

Zeytin LTP gen bölgesinin 5' ucunun uzatılması için, 3' RACE sonucunda elde edilen dizin bilgisinden yararlanılarak LTPR1, LTPR2, LTPR3, LTPR4, LTPR5, CR1, CR2 ve CR3 primerleri tasarlanmıştır ve PCR ile cDNA'ların çoğaltımı yapılmış ve LTPR1, LTPR2 ve LTPR3 primerleri kullanılarak oluşturulan PCR reaksiyonu ile elde edilen plazmid örnekleri dizin analizine gönderilmiştir.

3’ ve 5’ RACE sonucunda elde edilen dizin bilgileri sonucunda 590 baz çifti uzunluğunda LTP kodlayan gen bölgesi elde edilmiştir. Dizin analizi sonuçları, Chromas ve BioEdit gibi biyoinformatik programları aracılığı ile değerlendirildi. Bu cDNA fragmanının nükleotid dizini Blastn analizi sonucu NCBI veri tabanlarında bulunan *Hirudo medicinalis* partial mRNA for putative nsLTP, *Olea europaea* putative plant lipid transfer protein mRNA partial cds, ile %100 benzerlik göstermiştir. %100 benzerlik saptanan Olea europaea daha önce laboratuvarımızda yapılan çalışmada elde edilen kontig dizin bilgisidir. *Salvia miltiorrhiza* LTP, complete cds ile %75, *Sesamum indicum* LTP3 mRNA, complete cds ile %73 ve *Sesamum indicum* LTP4 mRNA, complete cds ile %72 benzerlik göstermiştir.

Yapılan Blastp analizinde, analiz ettiğimiz her iki dizinde de nsLTP1’e ait korunmuş domainler saptanmıştır.

nsLTP’ler bitkilerde oldukça yaygın olarak bulunurlar ve ilişkili proteinlerin multigenik aileleri tarafından oluşturulmaktadırlar. Ancak in vitro lipid transfer ve bağlanma sınırlı sayıda protein için araştırılmıştır [35].

Bitkilerdeki lipid çalışmaları, enerji kaynağı, biyotik ve abiyotik streslere karşı bitkinin korunmasında, hücre sinyali gibi önemli fizyolojik yolaklar ile ilişkili olduğundan son zamanlarda daha fazla yapılmaktadır.

Bitki LTP’leri, in vitro işlevsel özellikleri ile intrasellüler lipid dinamiklerinde temel rol almaktadırlar. *Arabidopsis* gibi model bir bitkide bütün LTP izoformlarının araştırılması, bir LTP gen ailesinin ayrıntılı tanımlanması açısından önemlidir.

Bu çalışma sonucunda elimizde bulunan kontig bilgisi ele alınarak RACE yönteminden faydalanılarak zeytin LTP genin klonlanması amaçlanmıştı. Ancak yapılan çalışmalar sonucunda başarılı bir RACE uygulaması yapılsa da tam uzunlukta LTP genine bu çalışma süresince ulaşılamadı. İleriki çalışmalara bu sonuçlar kaynak oluşturacak niteliktedir. Daha sonraki çalışmalarda tam uzunlukta cDNA nın uygun primerler kullanılarak sentezlenmesi ve protein ekspresyon vektörlerine klonlanması ve rekombinant enzim elde edilerek biyoteknolojik anlamda kullanım olanaklarına ulaşılması mümkün olacaktır.

## KAYNAKLAR


[1] Johnson L.A.S., (1957). "A review of the family Oleaceae", Contributions from the New South Wales National Herbarium, 2: 397–418.

[2] Tchang, F., This, P., Stiefel, V., Arondel, V., Morch, M.D., Pages, M., Puigdoménech, P., Grellet, F., Delseny, M., Bouillon, P., Huet, J.C., Guerbette, F., Beauvais-Cante, F., Duranton, H., Permollet, J.C. ve Kader, J.C., (1988). "Phospholipid transfer protein: full length cDNA and amino acid sequence in maize. Amino-acid sequence homologies between plant phospholipid transfer proteins", Journal of Biological Chemistry, 263:16849-16855.

[3] Kader, J.C., (1996). "Lipid transfer proteins in plants", Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 47:627-653.

[4] Kazan, K., (2003). "Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged", Trends Plant Science, 8:468-471.

[5] Arondel, V., Tchang, F., Baillet, B., Vignols, F., Grellet, F., Delseny, M., Kader, J.C. ve Puigdoménech, P., (1991). "Multiple mRNA coding for the phospholipid-transfer protein fom *Zea mays* arise from alternative splicing", Gene, 99:133-6.

[6] White, A., Dunn, M.A., Brown, K. ve Hughes, M.A., (1994). "Comparative analysis of genomic sequence and expression of a lipid transfer protein gene family in winter barley", Journal of Experimental Botany, 45:1885-92.

[7] Pelése-Siebenbourg, F., Caelles, C., Kader, J.C., Delseny, M. ve Puigdoménech, P., (1994). "A pair of genes coding for lipid-transfer proteins in *Sorghum vulgare*", Gene, 148:305-308.

[8] Pyee, J., Yu, H. ve Kolattukudy, P.E., (1994). "Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves", Archives of Biochemistry Biophysics, 311:460-468.

[9] Thoma, S., Hecht, U., Kippers, A., Botella, J., De Vries, S. ve Somerville, C.R., (1994). "Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from *Arabidopsis*", Plant Physiology, 105:35-45.

[10] Linnestad, C., Lönneborg, A., Kalla, E. ve Alsen, O.A., (1991). "Promoter of a lipid transfer protein gene expressed in barley aleurone cells contains similar myb and myc recognition sites as the maize Bz-Mcc allele", Plant Physiology, 97:841-43.

[11] Pyee, J. ve Kolattukudy, P.E., (1995). "The gene of the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns", Plant Journal, 7:49-59.

[12] Fleming, A.J., Mandel, T., Hofmann, S., Sterk, P., De Vries, S.C. ve Kuhlemeier, C., (1992). "Expression pattern of a tobacco lipid transfer protein gene within the shoot apex", Plant Journal, 2:855–62.

[13] George, S. ve Parida, A., (2010). "Characterization of an oxidative stress inducible non specific lipid transfer protein coding cDNA and its promoter from drought tolerant plant *Prosopis julifora*", Plant Molecular Biology Reporter, 28:32-40.

[14] Arondel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C. ve Kader, J.C., (2000). "Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*", Plant Science, 157:1-12.

[15] Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., Grosbois, M., Guerbette, F., Miginiac, F., Delseny, M., Puigdoménech, P. ve Kader, J.C., (1991). "Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene", Plant Cell, 9:923-933.

[16] Liu, K., Jiang, H., Moore, S.L., Watkins, C.B. ve Jahn, M.M., (2006). "Isolation and characterization of a lipid transfer protein expressed in ripening fruit of *Capsicum chinense*", Planta, 223:672-683.

[17] Terres-Schumann, S., Godoy, J.A. ve Pintor-Toro, J.A., (1992). "A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants", Plant Molecular Biology, 18:749-757.

[18] Treviño, M.B. ve O'Connell, M.A., (1998). "Three drought-response members of the non-specific lipid transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different development patterns of expression", Plant Physiology, 116:1461-1468.

[19] Edqvist, J. ve Farbos, I., (2002). "Characterization of germination-specific lipid transfer proteins from *Euphorbia lagascae*", Planta, 215(1):41-50.

[20] Hincha, D.K., Neukamm, B., Sror, H.A.M., Sieg, F., Weckwarth, W., Ruckels, M., Lullien-Pellerin, V., Schroder, W. ve Schmitt, J.M., (2001). "Cabbage cryprotein is a member of the nonspecific lipid transfer protein gene family", Plant Physiology, 125:835-846.

[21] Molina, A. ve Garcia-Olmedo, F., (1993). "Developmental and pathogen induced expression of three barley genes encoding lipid transfer proteins", Plant Journal, 4:983-91.

[22] Molina, A., Diaz, I., Vasil, I.K., Carbonero, P. ve Garcia-Olmedo, F., (1996). "Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens", Molecular and General Genetics, 252:163-168.

[23] Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., Van Kammen, A. ve De Vries, S.C., (1991). "Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene", Plant Cell, 3:907-921.

[24] Vignols, F., Wigger, M., García-Garrido, J.M., Grellet, F., Kader, J.C. ve Delseny, M., (1997). "Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated", Gene, 177-186.

[25] Feng, J.X., Ji, S.J., Shi, Y.H., Xu, Y., Wei, G. ve Zhu, Y.X., (2004). "Analysis five differentially expressed gene families in fast elongated cotton fiber", Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 36(1):51-56

[26] Boutrot, F., Meynard, D., Guiderdoni, E., Joudrier, P. ve Gautier, M.F., (2007). "The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six TaLtp genes in transgenic rice", Planta, 225(4):843-62.

[27] Bernhard, W.R. ve Somerville, C.R., (1989). "Coidentity of putative amylase inhibitors from barley and finger millet with phospholipid transfer proteins inferred from amino acid sequence homology", Archives of Biochemistry Biophysics, 269:695-97.

[28] Kinlaw, C.S., Gerttulla, S.M. ve Carter, M.C., (1994). "Lipid transfer protein genes of loblolly pine are members of a complex gene family", Plant Molecular Biology, 26:1213–16.

[29] Kotilainen, M., Helariutta, Y., Elomaa, P., Paulin, L. ve Teeri, T.H., (1994). "A corolla and carpel-abundant, nonspecific lipid transfer protein gene is expressed in the epidermis and parenchyma of *Gerbear hybrida var Regina* (Compositae)", Plant Molecular Biology, 26:971–78.

[30] Jung, H.W., Kim, W. ve Hwang, B.K., (2003). "Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic and environmental stresses", Plant Cell and Environment, 26(6):915-928.

[31] Yubero-Serrano, E.M., Moyano, E., Medina-Escobar, N., Muñoz-Blanco, J. ve Caballero, J.L., (2003). "Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress", Journal of Experimental Botany, 54(389):1865-1877.

[32] Jang, C.S., Kim, D.S., Bu, S.Y., Kim, J.B., Lee, S.S., Kim, J., Johnson, J. ve Seo, Y., (2002). "Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat-rye translocation line", Plant Cell Reports, 20(10):961-966.

[33] Ma, D.P., Tan, H., Si, Y., Creech, R.G. ve Jenkins, J.N., (1995). "Differential expression of a lipid transfer protein gene in cotton fiber", Biochimica et Biophysica Acta, 1257:81-84.

[34] Arondel, V., Tchang, F., Vergnolle, C.H., Jolliot, A., Grosbois, M., Guerbette, F., Morch, M.D., Pernollet, J.C., Delseny, M., Puigdoménech, P. ve Kader, J.C., (1989). "Plant transfer proteins: structure, function and molecular biology", In Biological Role of Plant Lipids, 341-350.

[35] Vignols, F., Wigger, M., Garcia-Garrido, J.M., Grellet, F., Kader, J.C. ve Delseny, M., (1997). "Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated", Gene, 195:177-186.

[36] José-Estanyol, M., Gomis-Rüth, F.X. ve Puigdoménech, P., (2004). "The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins", Plant Physiology and Biochemistry, 42:355-365.

[37] Takishima, K., Watanabe, S., Yamada, M. ve Mamiya, G., (1986). "The amino-acid sequence of the nonspecific lipid transfer protein from germinated castor bean endosperms", Biochimica et Biophysica Acta, 870:248-55.

[38] Douliez, J.P., Michon, T., Elmorjani, K. ve Marion, D., (2000). "Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from Cereal Kernels", Journal of Cereal Science, 32:1-20.

[39] Wu, G., Robertson, J.A., Liu, X., Zheng, P., Wilen, R.W., Nesbitt, N.T. ve Gusta, L.V., (2004). "A lipid transfer protein gene BG-14 differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*)", Journal of Plant Physiology, 161(4):449-458.

[40] Arondel, V. ve Kader, J.C., (1990). "Lipid transfer in plants" Experientia, 46(6):579–585.

[41] Kalla, R., Shimamoto, K., Potter, R., Nielsen, P.S., Linnestad, C. ve Olsen, O.A., (1994). "The promoter of the barley aleuronespecific gene encoding a putative 7-kDa lipid transfer protein confers aleurone cell-specific expression in transgenic rice", Plant Journal, 6:849–60.

[42] Lindorff-Larsen, K. ve Winther, J.R., (2001). "Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases", FEBS Letters, 488:145-148.

[43] Kader, J.C., (1985). "Lipid binding proteins in plants", Chemistry and. Physics of Lipids, 38:51-62.

[44] Rueckert, D.G. ve Schmidt, K., (1990). "Lipid transfer proteins", Chemistry and. Physics of Lipids, 56:1-20.

[45] Schilling, S.M., Hincha, D.K., Schmitt, J.M., Köhn, C.A. ve Tischendorf, G., (2003). "Intracellular localization of lipid transfer proteins in *Brassica oleracea*", Medimond S.r.I., 19(24):141-146

[46] Sossountzov, L., Ruiz-Avila, L., Vignols, F., Jolliot, A., Arondel, V., Tchang, F., Grosbois, M., Guerbette, F., Miginiac, E. ve Delseny, M., (1991). "Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene", Plant Cell, 3(9):923-933.

[47] Douady, D., Grosbois, M., Guerbette, F. ve Kader J.C., (1986). "Phospholipid transfer protein from maize seedlings is partly membrane-bound", Plant Science, 45:151-156.

[48] Tsuboi, S., Osafune, T., Tsugeki, R., Nishimura, M. ve Yamada, M., (1992). "Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism", Journal of Biochemistry, 111:500-508.

[49] Meijer, E.A., De Vries, S.C., Sterk, P., Gadella, D.W.J., Wirtz, K.W. ve Hendriks, T., (1993). "Characterization of the nonspecific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.)", Molecular and Cellular Biochemistry, 123:159-166.

[50] Bernhard, W.R., Thoma, S., Botella, J. ve Somerville, C.R., (1991) "Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway", Plant Physiology, 95(1):164-170.

[51] Munro, S. ve Pelham, H.R.B., (1987). "A C terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins", Cell, 48:899-907.

[52] Wirtz, K.W.A., (1991). "Phospholipid transfer proteins", Annual Review of Biochemistry, 60:73-99.

[53] Bouillon, P., Drischel, C., Vergnolle, C., Duranton, H. ve Kader J.C., (1987). "The primary structure of spinach leaf phospholipid-transfer protein", European Journal of Biochemistry, 166:387–91.

[54] Désormeaux, A., Blochet, J.E., Pézolet, M. ve Marion, D., (1992). "Amino acid sequence of a non-specific wheat phospholipid transfer protein and its

conformation as revealed by infrared and Raman spectroscopy: role of disulfide bridges and phospholipids in the stabilization of the a-helix structure", Biochimica et Biophysica Acta, 1121:137–52.

[55] Mundy, J. ve Chua, N.H., (1988). "Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene", EMBO Journal, 7:2279-2286.

[56] Yu, Y.G., Chung, C.H., Fowler, A. ve Suh, S.W., (1988). "Amino acid sequence of a propable amylase/protease inhibitör from rice seeds", Archives of Biochemistry and Biophysics, 265:466-75.

[57] Wirtz, K.W.A., (1982). "Phospholipid transfer proteins", Lipid-Protein Interactions, 1:151-231.

[58] Vance, J.E., (1991). "Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane", Journal of Biological Chemistry, 258:9050-9058.

[59] Seedorf, U., Scheek, S., Engel, T., Steif, C., Hinz, H.J. ve Assmann, G., (1994). "Structure-activity studies of human sterol carrier protein-2", Journal of Biological Chemistry, 269(4):2613-2618.

[60] Wilmanns, M., Stanley, W.A., Filipp, F.V., Kursula, P., Schuller, N., Erdmann, R., Schliebs, W. ve Sattler, M., (2006). "Recognition of a functional peroxisome type 1 target by the dynamic import receptor Pex5p", Molecular Cell, 24(5):653-663.

[61] Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garciarrubio, A. ve Covarrubias, A.A., (1997). "Characterizaton of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein", Plant Molecular Biology, 35:393-405.

[62] Dunn, M.A., White, A.J., Vural, S. ve Hughes, M.A., (1998). "Identification of promoter elements in a low-temperature-responsive gene (blt4.9) from barley (*Hordeum vulgare L.*)", Plant Molecular Biology, 38:551-564.

[63] Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W. ve Dietz, K.J., (1997). "Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley; Implications for involvement of lipid transfer proteins in wax assembly", Planta, 203:9-19.

[64] Pearce, R.S., Houlston, C.E., Atherton, K.M., Rixon, J.E., Harrison, P., Hughes, M.A. ve Dunn, M.A., (1998). "Localization of expression of three cold-induced genes, blt101, blt4.9, blt14, in different tissues of the crown and developing leaves of cold-acclimated cultivated barley", Plant Physiology, 117:787-795.

[65] Smolenaars, M.M.W., Madsen, O., Rodenburg, K.W. ve Van Der Horst, D.J., (2007). "Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily", The Journal of Lipid Research, 48:489-502.

[66] Gincel, E., Simorre, J.P., Caille, A., Marion, D., Ptak, M. ve Vovelle, F., (1994). "Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1 H-NMR data. A new folding for lipid carriers", European Journal of Biochemistry, 226:413-422.

[67] Hoh, F., Pons, J.L., Gautier, M.F., De Lamotte, F. ve Dumas, C., (2005). "Structure of a liganted type 2 non-specific lipid transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding", Acta Chrystallography, 61:397-406.

[68] Boutrot, F., Chantret, N. ve Gautier, M.F., (2008). “Genome-wide analysis of the rice and arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLTP) gene families and identification of wheat nsLTP genes by EST data mining”, BMC Genomics, 9:86.

[69] Boutrot, F., Guirao, A., Alary, R., Joudrier, P. ve Gautier, M.F., (2005). “Wheat non-specific lipid transfer protein genes display, a complex pattern of expression in developing seeds”, Biochim Biophys Acta, 1730:114-125.

[70] Kader, J.C., (1975). “Proteins and intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato-tuber”, Biochim. Biophys Acta, 380(1):31-44.

[71] Beisson, F., Koo, A.J., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J.J., Paddock, T., Salas, J.J., Savage, L., Milcamps, A., Mhaske, V.B., Cho, Y. ve Ohlrogge, J.B., (2003). “Arabidopsis genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a webased database”, Plant Physiology, 132:681-697.

[72] Wang, N.J., Lee, C.C., Cheng, C.S., Lo, W.C., Yang, Y.F., Chen, M.N. ve Lyu, P.C., (2012). “Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB)”, BMC Genomics, 13(1):9.

[73] Yeasts, T.H. ve Rose, J.K.C., (2008). “The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs)”, Protein Science, 17:191-198.

[74] Lerche, M.H. ve Poulsen, F.M., (1998). “Solution structure of barley lipid transfer protein complex with palmitate. Two different binding modes of palmitate in the homologous maize and barley nonspecific lipid transfer proteins”, Protein Science, 7:2490-2498.

[75] Lerche, M.H., Kragelund, B.B., Bechi L.M. ve Poulseni F.M., (1997). “Barley lipid-transfer protein complexed with palmitoyl CoA: The structure reveals a hydrophobic binding site that can expand to fit both large and small lipid-like ligand”, Structure, 5:291-306.

[76] Heinemann, B., Andersen, K.V., Nielsen, P.R., Bech, L.M. ve Poulsen, F.M., (1996). “Structure in solution of a four-helix lipid binding protein”, Protein Science, 5:13-23.

[77] Poznanski, J., Sodano, P., Suh, S.W., Lee, J.Y., Ptak, M. ve Vovelle, F., (1999). “Solution structure of a lipid transfer protein extracted from rice seeds. Comparison with homologous proteins”, European Journal of Biochemistry, 259:692-708.

[78] Lee, J.,Y., Min, K., Cha, H., Shin, D.H., Hwang, K.Y. ve Suh, S.W., (1998). “Rice nonspecific lipid transfer protein: The 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity”, Journal of Molecular Biology, 276:437-448.

[79] Cheng, H.C., Cheng, P.T., Peng, P., Lyu, P.C. ve Sun, Y.J., (2004b). “Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*”, Protein Science, 13:2304-2315.

[80] Charvolin, D., Douliez, J.P., Marion, D., Cohen-Addad, C. ve Pebay-Peyroula, E., (1999). “The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-

LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution", European Journal of Biochemitry, 264:562-568.

[81] Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Douliez, J.P., Marion, D. ve Vovelle, F., (2000). "The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2", European Journal of Biochemitry, 267:1117-1124.

[82] Gomar, J., Petit, M.C., Sodano, P., Sy, D., Marion, D., Kader, J.C., Vovelle, F. ve Ptak, M., (1996). "Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds", Protein Science, 5:565-577.

[83] Han, G.W., Lee, J.Y., Song, H.K., Chang, C., Min, K., Moon, J., Shin, D.H., Kopka, M.L., Sawaya, M.R., Yuan, H.S., Kim, T.D., Choe, J., Lim, D., Moon, H.J. ve Suh, S.W., (2001). "Structural basis of nonspecific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography", Journal of Molecular Biology, 308:263-278.

[84] Shin, D.H., Lee, J.Y., Hwang, K.Y., Kim, K.K. ve Suh, S.W., (1995). "High resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings", Structure, 3:189-199.

[85] Da Silva, P., Landon, C., Industri, B., Marais, A., Marion, D., Ponchet, M. ve Vovelle, F., (2005). "Solution structure of a tobacco lipid transfer protein exhibiting new biophysical and biological features", Proteins, 59:356-367.

[86] Pasquato, N., Berni, R., Folli, C., Folloni, S., Cianci, M., Pantano, S., Helliwell, J.R. ve Zanotti, G., (2006). "Crystal structure of peach Prup 3, the prototypic member of the family of plant nonspecific lipid transfer protein pan-allergens", Journal of Molecular Biology, 356:684-694.

[87] Lin, K.F., Liu, Y.N., Hsu, S.T., Samuel, D., Cheng, C.S., Bonvin, A.M. ve Lyu, P.C., (2005). "Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean", Biochemistry, 44:5703-5712.

[88] Garcia-Garrido, J.M., Menossi, M., Puigdoménech, P., Martinez-Izquierdo, J.A. ve Delseny, M., (1998). "Characterization of a gene encoding an abscisic acid-inducible type-2 lipid transfer protein from rice", FEBS Letters, 428:193-199.

[89] Samuel, D., Liu, Y.J., Cheng, C.S. ve Lyu, P.C., (2002). "Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*)", Journal of Biological Chemistry, 277:35267-35273.

[90] Pons, J.L., De Lamotte, F., Gautier, M.F. ve Delsuc, M.A., (2003). "Refined solution structure of a liganded type 2 wheat nonspecific lipid transfer protein", Journal of Biological Chemistry, 278:14249-14256.

[91] Cheng, C.S., Samuel, D., Liu, Y.J., Shyu, J.C., Lai, S.M., Lin, K.F. ve Lyu, P.C., (2004a). "Binding mechanism of nonspecific lipid transfer proteins and their role in plant defence", Biochemistry, 43:13628-13636.

[92] Hevonoja, T., Pentikainen, M.O., Hyvonen, M.T., Kavonen, P.T. ve Ala-Korpela, M., (2000). "Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL", Biochimica et Biophysica Acta, 1488:189-210.

[93] Segrest, J.P., Jones, M.K., De Loof, H. ve Dashti, N., (2001) "Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins", Journal of Lipid Research, 42:1346-1367.

[94] Olofsson, S.O. ve Borèn, J., (2005). “Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis”, Journal of Internal Medicine, 258(5):395-410.

[95] Shoulders, C.C. ve Shelness, G.S., (2005). “Current biology of MTP: implications for selective inhibition”, Current Topics in Medicinal Chemistry, 5:283-300.

[96] Taskinen, M.R., (2005). “Type 2 diabetes as a lipid disorder”, Current Molecular Medicine, 5:297-308.

[97] Panáková, D., Sprong, H., Marois, E., Thiele, C. ve Eaton, S., (2005). “Lipoprotein particles are required for Hedgehog and Wingless signalling”, Nature, 435:58-65.

[98] Sappington, T.W. ve Raikhel, A.S., (1998a). “Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors”, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 28:277-300.

[99] Walzem, R.L., Davis, P.A. ve Hansen, R.J., (1994). “Overfeeding increases very low density lipoprotein diameter and causes the appearance of a unique lipoprotein particle in association with failed yolk deposition”, Journal of Lipid Research, 35(8):1354-1366.

[100] Romano, I., Nicolaus, B., Lama, L., Trabasso, D., Caracciolo, G. ve Gambacorta, A., (2001). “Accumulation of osmoprotectants and lipid pattern modulation in response to growth conditions by *Halomonas pantelleriense*”, Systematic and Applied Microbiology, 24:342-352.

[101] Hall, M., Wang, R., Van Antwerpen, R., Sottrup-Jensen, L. ve Söderhäll, K., (1999). “The crayfish plasma clotting protein: a vitellogenin-related protein responsible for clot formation in crustacean blood”, Proceedings of the National Academynof Sciences, 96**:**1965-1970.

[102] Yeh, M. S., Huang, C.J., Leu, J.H., Lee, Y.C. ve Tsai, I.H., (1999). “Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*)”, European Journal of Biochemistry, 266**:**624-633.

[103] Brozovic, S., Nagaishi, T., Yoshida, M., Betz, S., Salas, A., Chen, D., Kaser, A., Glickman, J., Kuo, T. ve Little, A., (2004). “CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein”, Nature Medicine, 10**:**535-539.

[104] Dougan, S.K., Salas, A., Rava, P., Agyemang, A., Kaser, A., Morrison, J., Khurana, A., Kronenberg, M., Johnson, C. ve Exley, M., (2005). “Microsomal triglyceride transfer protein lipidation and control of CD1d on antigen-presenting cells”, Journal of Experimental Medicine, 202:529-539.

[105] Brandt, B.W., Zwaan, B.J., Beekman, M., Westendorp, R.G. ve Slagboom, P.E., (2005). “Shuttling between species for pathways of lifespan regulation: a central role for the vitellogenin gene family?”, Bioessays, 27**:**339–346.

[106] Amdam, G.V., Aase, A.L., Seehuus, S.C., Kim Fondrk, M., Norberg, K. ve Hartfelder, K., (2005). “Social reversal of immunosenescence in honey bee workers”, Experimental Gerontology, 40**:**939-947.

[107] Babin, P.J., Bogerd, J., Kooiman, F.P., Van Marrewijk, W.J.A. ve Van Der Horst, D.J., (1999). “Apolipophorin II/I, apolipoprotein B, vitellogenin, and

microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor", Journal of Molecular Evolution, 49**:**150-160.

[108] Ryan, R.O. ve Van Der Horst, D.J., (2000). "Lipid transport biochemistry and its role in energy", Annual Review of Entomology, 45**:**233-260.

[109] Shibata, Y., Branicky, R., Landaverde, I.O. ve Hekimi, S., (2003). "Redox regulation of germline and vulval development in *Caenorhabditis elegans*", Science, 302**:**1779-1782.

[110] Shelness, G.S. ve Ledford, A.S., (2005). "Evolution and mechanism of apolipoprotein B-containing lipoprotein assembly", Current Opinion in Lipidology, 16**:**325-332.

[111] Raag, R., Appelt, K., Xuong, N.H. ve Banaszak, L., (1988). "Structure of the lamprey yolk lipid-protein complex lipovitellin-phosvitin at 2.8 Å resolution", Journal of Molecular Biology, 200:553–569.

[112] Simorre, J.P., Caille, A., Marion, D., Marion, D. ve Ptak, M., (1991). "Two- and three-dimensional 1H NMR studies of a wheat phospholipid transfer protein: sequential resonance assignments and secondary structure", Biochemistry, 30:11600-8.

[113] Hwang, K.Y., Kim, K.K., Min, K., Eom, S.H., Yu, Y.G., Kim, S., Sweet, R.M. ve Suh, S.W., (1993). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of probable amylase/protease inhibitor-B from rice seeds", Journal of Molecular Biology, 229:255–57.

[114] Pebay-Peyroula, E., Cohen-Addad, C., Lehmann, M.S. ve Marion, D., (1992). "Chrystallographic data for the 9000 dalton wheat non-specific phospholipid transfer protein", Journal of Molecular Biology, 226:563-64.

[115] Kader, J.C., Douady, D. ve Mazliak, P., (1982). In Phospholipids, A Comprehensive Treatise, Elsevier Press, Amsterdam.

[116] Hanada, K., Kumagai, K., Tomishige, N. ve Kawano, M., (2007). "CERT and intracellular trafficking of ceramide", Biochimica et Biophysica Acta, 1771:644-653.

[117] Lebiedzinska, M., Szabadkai, G., Jones, A.W., Duszynski, J. ve Wieckowski, M.R., (2009). "Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles", International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 41:1805-1816.

[118] Feng, L., Chan, W.W., Roderick, S.L. ve Cohen, D.E., (2000). "High-level expression and mutagenesis of recombinant human phosphatidylcholine transfer protein using a synthetic gene: evidence for a C terminal membrane binding domain", Biochemistry, 39:15399-15409.

[119] Kader, J.C., (1993). Plant Lipid Metabolism, CRC Press, Florida.

[120] Fleming, A.J., Mandel, T., Roth, I. ve Kuhlemeier, C., (1993). "The patterns of gene expression in the tomato shoot apical meristem", Plant Cell, 5:297–309.

[121] Molina, A., Segura A. ve Garcia-Olmedo, F., (1993). "Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens", FEBS Letters, 316:119-122.

[122] Vignols, F., Lund, G., Pammi, S., Trémousaygue, D., Grellet, F., Kader, J.C., Puigdoménech, P. ve Delseny, M., (1994). "Characterization of a rice gene coding for a lipid transfer protein", Gene, 142:265-70.

[123] Coutos-Thévenot, P., Jouenne, T., Maes, O., Guerbette, F., Grosbois, M., Le Caer, J.P., Boulay, M., Deloire, A., Kader, J.C. ve Guern, J., (1993). "Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins", European Journal of Biochemistry, 217:885–889.

[124] Vergnolle, C., Arondel, V., Grosbois, M., Guerbette, F., Jolliot, A. ve Kader, J.C., (1988). "Synthesis of phospholipid transfer proteins from maize seedlings", Biochemical and Biophysical Research Communications, 157:37-41.

[125] Thoma, S., Kaneto, Y. ve Somerville, C.R., (1993). "A nonspecific lipid transfer protein from Arabidopsis is a cell wall protein", Plant Journal, 3:427-36.

[126] Nielsen, K., Nielsen, J., Madrid, S. ve Mikkelsen, J., (1996). "New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris L*.) showing homology to nonspecific lipid transfer proteins", Plant Molecular Biology, 31:539-552.

[127] Madrid, S.M., (1991). "The barley lipid transfer protein is targeted into the lumen of the endoplasmic reticulum", Plant Physiology and Biochemistry, 29:695-703.

[128] Madrid, S.M. ve Von Wettstein, D., (1990). "Reconciling contradictory notions on lipid transfer proteins in higher plants", Plant Physiology and Biochemistry, 29:705-11.

[129] Foster, G.D., Robinson, S.W., Blundell, R.P., Roberts, M.R., Hodge, R., Draper, J. ve Scott, R.J., (1992). "A *Brassica napus* mRNA encoding a protein homologous to phospholipid transfer proteins, is expressed specifically in the tapetum and developing microspores", Plant Science, 84(2):187-192.

[130] Lauga, B., Charbonnel-Campaa, L. ve Combes, D., (2000). "Charaterization of MZm3-3, a *Zea mays* tapetum-specific transcript", Plant Science, 157(1):65-75.

[131] Ariizumi, T., Amagai, M., Shibata, D., Hatakeyama, K., Watanabe, M. ve Toriyama, K., (2002). "Comparative study of promoter activity of three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosilase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana*", Plant Cell Reportes, 21(1):90-96.

[132] Imin, N., Kerim, T., Weinman, J.J. ve Rolfe, B.G., (2006). "Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers", Molecular Cell Proteomics, 5(2):274-292.

[133] Park, S.Y., Jauh, G.Y., Mollet, J.C., Eckard, K.J., Nothnagel, E.A., Walling, L.L. ve Lord, E.M., (2000). "A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix", Plant Cell, 12:151-164.

[134] Sorensen, S.B., Bech, L.M., Muldbjerg, M., Beenfeldt, T. ve Breddam, K., (1993). "Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation", MBAA Technical, 30:136-145.

[135] Pastorello, E.A., Pravettoni, V., Farioli, L., Ispano, M., Fortunato, D., Monza, M., Giuffrida, M.G., Rivolta, F., Scibola, E., Ansaloni, R., Incorvaia, C., Conti, A. ve Ortolani, C., (1999). "Clinical role of lipid transfer protein that acts as a new apple-specific allergen", Journal of Allergy and Clinical Immunology, 104:1099-1106.

[136] Pastorello, E.A., D'Ambrosio, F.P., Pravettoni, V., Farioli, L., Giuffrida, Monza, M.G., Ansaloni, R., Fortunato, D., Scibola, E., Rivolta, F., Incorvaia, C.,

Bengtsson, A., Conti, A. ve Ortolani, C., (2000). “Evidence for a lipid transfer protein as the major allergen of apricot”, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 105:371-377.

[137] Salcedo, G., Sanchez-Monge, R., Barber, D. ve Diaz-Perales, A., (2007). “Plant nonspecific lipid transfer proteins: An interface between plant defence and human allergy”, Biochimica et Biophysica Acta, 1771:781-791.

[138] Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F.J., Barber, D. ve Salcedo, G., (1999). “Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy”, Journal of Allergy and Clinical Immunology, 103:3-1.

[139] Fernandez-Rivas. ve Cuevas, M., (1999). “Peels of *Rosaceae* fruits have a higher allergenicity than pulps”, Clinical and Experimental Allergy, 29:1239-1247.

[140] Asero, R., Mistrello, G., Roncarolo, D., De Vries, S.C., Gautier, M.F., Ciurana, C.L., Verbeek, E., Mohammadi, T., Knul-Brettlova, V., Akkerdaas, J.H., Bulder, I., Aalberse, R.C. ve Van Ree, R., (2000). “Lipid-transfer protein: a pan-allergen in plant derived food that is highly resistant to pepsin digestion”, International Archives of Allergy and Immunology, 122:20-32.

[141] Balmerr-Weber, B.K., (2002). “Lipid transfer protein as a potential panallergen”, Allergy, 57:873-875.

[142] Le, L.Q., Lorenz, Y., Scheurer, S., Fötisch, K., Enrique, E., Bartra, J., Biemelt, S., Vieths, S. Ve Sonnewald, U., (2006). “Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression” Plant Biotechnology Journal, 4:231-242.

[143] Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B.A., Fasolino, A., Hilbers, C.W., Derksen, J. ve Mariani, C., (2005). “Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco”, Plant Cell, 17:2009-2019.

[144] Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A. ve Moreno, M., (1995). “The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants”, Trends Microbiology, 3:72–74.

[145] Blein, J.P., Coutos-Thévenot, P., Marion, D. ve Ponchet, M., (2002). “From elicitins to lipid transfer proteins: a new insight in cell signaling involved in plant defence mechanism”, Trends Plant Science, 7:293-296.

[146] Wu, Z. ve Burns, J.K., (2003). “Isolation and characterization of a cDNA encoding a lipid transfer protein expressed in ‘Valencia’ orange during abscission”, Journal of Experimantal Botany, 54(385):1183-1191.

[147] Bleecker, A.B. ve Patterson, S.E., (1997). “Last exit: senescence, abscission and meristem arrest in Arabidopsis”, Plant Cell, 9:1169-1179.

[148] Roberts, J.A., Elliot, K.A. ve Gonzalez-Carranza, Z.H., (2002). “Abscission, dehiscence, and other cell seperation processes”, Annual Review of Plant Biology, 53:131-158.

[149] Cameron, K.D., Teece, M.A. ve Smart, L.B., (2006). “Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco”, Plant Physiology, 140:176-183.

[150] Suh, M.C., Samuels, A.L., Jetter, R., Kunst, L., Pollard, M., Ohlrogge, J. ve Beisson, F., (2005). “Cuticular lipid composition, surface structure, and gene expression in Arabidopsis stem epidermis”, Plant Physiology, 139:1649-1665.

[151] Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, K.D., Hwang, B.K., Ok, S.H. ve Shin, J.S., (2008). "Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco", Plant Cell Reporters, 28:419-427.

[152] Van Loon, L.C. ve Van Strien, E.A., (1999). "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins", Physiol. Mol. Plant Pathol., 55:85-97.

[153] Gomès, E., Sagot, E., Gaillard, C., Laquitaine, L., Poinssot, B., Sanejouand, Y.H., Delrot, S. ve Coutos-Thévenot, P., (2003). "Nonspecific lipid-transfer protein genes expression in grape (*Vitis sp.*) cells in response to fungal elicitor treatments", Molecular Plant-Microbe Interactions, 16:456-464.

[154] Molina, A. ve García-Olmedo, F., (1997). "Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2", Plant Journal, 12(3):669-675.

[155] Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J. ve Cameron, R.K., (2002). "A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis", Nature, 419:399-403.

[156] Buhot, N., Douliez, J.P., Jacquemard, A., Marion, D., Tran, V., Maume, B., Milat, M.L., Ponchet, M., Mikes, V., Kader, J.C. ve Blein, P., (2001). "A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses", FEBSS Letters, 509:27-30.

[157] Segura, A., Moreno, M. ve Garcia-Olmedo, F., (1993). "Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins from the leaves of Arabidopsis and spinach", FEBS Letters, 3:243-46.

[158] Ponchet, M., Panabieres, F., Milat, M.L., Mikes, V., Montillet, J.L., Suty, L., Triantaphylides, C., Tirilly, Y. ve Blein, J.P., (1999). "Are elicitins cryptograms in plant-oomycete communications?", Cellular and Molecular Life Sciences, 56:1020-1047.

[159] Commue, B.P.A., Thevissen, K., Hendricks, M., Eggermont, K., Goderis, I.J., Proost, P., Van Damme, J., Osborn, R.W., Guerbette, F., Kader, J.C. ve Broekaert, W.F., (1995). "A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins", Plant Physiology, 109:445-455.

[160] Pato, C., Le Borgne, M., Le Baut, G., Le Pape, P., Marion, D. ve Douliez, J.P., (2001). "Potential application of lipid transfer protein for drug delivery", Biochemical Pharmacology, 62:555-560.

[161] Krause, A., Sigrist, C.J.A., Dehning, I., Sommer, H. ve Broughton, W.J., (1994). "Accumulation of transcripts encoding a lipid transfer-like protein during deformation of nodulation-competent *Vigna unguiculata* root hairs", Molecular Plant-Microbe, Interactions, 7:411–18.

[162] Green, P.S., (2002). "A revision of *Olea L.* (*Oleaceae*)", Kew Bulletin, 57:91-140.

[163] Altıntaş, G., (2008). Zeytinyağının Ülkemiz Ekonomisine Katkıları, Sorunları ve Beklentileri, Ar-Ge Bülten, İzmir Ticaret Odası.

[164] FAO, (2009). Food and Agriculture organizations of the United Nations.

[165] Secchi F., Lovisolo C. ve Schubert A., (2007). "Expression of OePIP2.1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stress and recovery", Annals of Applied Biology, Volume 150, Issue 2: 163-167.
[166] Dichio M., Xiloyannis, Sofo A. ve Montanaro G., (2005). "Osmotic regulation in leaves and roots of olive trees during a water deficit and rewatering", Tree Physiology 26, 179-185.
[167] Fernández, J.E., Moreno, F., Girón, I.F. ve Blázquez, O.M., (1997). "Stomatal control of water use in olive tree leaves", Plant and Soil, 190:179-192.
[168] Bongi, G., Soldatini, G.F. ve Hubick, K.T., (1987). "Mechanism of photosynthesis in olive tree (*Olea europaea L.*)", Photosynthetica, 21: 572-57
[169] Vitagliano, C. ve Sebastiani, L., (2002). "Physiological and biochemical remarks on environmental stress in olive (*Olea europaea L.*)", IV International Symposium on Olive Growing, Italy.
[170] http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
[171] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
[172] http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/
[173] Inoue, H., Nojima, H. ve Okayama, H., (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids", Gene, 96(1):23-8.

## EK-A: LTPF15(6)_B10 DİZİN ANALİZİ, BLASTN VE BLASTP SONUCU

### A-1 LTPF15(6)_B10 NÜKLEOTİD DİZİNİ VE AMİNOASİT DİZİNİ

```
ACA TAA ACA AGC TGC TGT AGC GAA CTC TCT GCT CCA CTG ATG AAA TTA TGG AAC
  D   S   D   A   A   I   S   C   G   T   V   V   G   Q   L   K   P   C
CTT TGA GCA ATC AGT GGA AGG GTC AAT CTT GTA TGG GAT ATT GAC ACC ACA TTT
  L   G   Y   V   Q   G   G   N   V   V   P   P   P   C   C   G   G   I
TCC GGG GAG GCC AGC GGC CTT GCT GTA GTT GAT GCC CTT AAA AGA TCC GGC GAG
  K   S   L   Y   T   S   A   K   T   T   A   D   R   R   S   I   C   Y
CGA TTT CAG GCA GTA GCA GAT GGA CCG GCG ATC CGC TGT GGT TTT GGC AGA TGT
  C   L   K   S   L   A   G   S   F   K   G   I   N   Y   S   K   A   A
ATA GAG AAC TTA ATT CCG CCA CAG CAG GGG GGA GGA ACA ACG TTG CCA CCC TGC
  G   L   P   G   K   C   G   V   N   I   P   Y   K   I   D   P   S   T
ACA TAA CCT AGG CAC GGT TTC AGC TGA CCC ACC ACC GTG CCA CAC GAG ATT GCT
  D   C   S   K   V   P   *   F   H   Q   W   S   R   E   F   A   T   A
GCA TCA GAA TCG
  A   C   L   C
```

### A-2 LTPF15(6)_B10 BLASTN DİZİ ANALİZ SONUÇLARI

Veritabanı: Nükleotid koleksiyonu
Sorgu= lcl|47571
Uzunluk=337

| Anlamlı Benzerliklerin Sekansları: | Skor (Bits) | E Değeri |
|---|---|---|
| gi\|404503307\|emb\|HE962530.1\|*Hirudo medicinalis* partial mRNA ... | 511 | 2e-141 |
| gi\|154257298\|gb\|EF506504.1\|*Olea europaea* putative plant lipi... | 399 | 1e-107 |
| gi\|144601656\|gb\|EF187462.1\|*Salvia miltiorrhiza* lipid transfe... | 132 | 2e-27 |

gi|747088047|ref|XM_011093289.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 111 8e-21
gi|148278100|gb|EF581317.1|*Sesamum indicum* lipid transfer pr... 111 8e-21
gi|148278098|gb|EF581316.1|*Sesamum indicum* lipid transfer pr... 102 4e-18
gi|747088057|ref|XM_011093295.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 100 1e-17
gi|747088053|ref|XM_011093293.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 100 1e-17
gi|747088051|ref|XM_011093292.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 100 1e-17
gi|747088049|ref|XM_011093290.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 100 1e-17
gi|62529289|gb|AY971513.1|*Leonurus japonicus* non-specific li... 98.7 5e-17
gi|747088323|ref|XM_011093444.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 96.9 2e-16
gi|747088055|ref|XM_011093294.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 96.9 2e-16
gi|747094582|ref|XM_011096833.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 91.5 7e-15
gi|747088045|ref|XM_011093288.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 91.5 7e-15
gi|148278102|gb|EF581318.1|*Sesamum indicum* lipid transfer pr... 91.5 7e-15
gi|747088063|ref|XM_011093299.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 89.7 3e-14
gi|663673455|emb|HG975449.1| *Solanum pennellii* chromosome ch1... 89.7 3e-14
gi|148538141|dbj|AK246907.1|*Solanum lycopersicum* cDNA, clone... 89.7 3e-14
gi|350535716|ref|NM_001247024.1|*Solanum lycopersicum* non-spe... 89.7 3e-14
gi|1816534|gb|U81996.1|LEU81996 *Lycopersicon esculentum* non s... 89.7 3e-14
gi|747088067|ref|XM_011093301.1|PREDICTED: *Sesamum indicum* n... 87.8 9e-14
gi|16903205|gb|AY059472.1|*Davidia involucrata* lipid transfer... 87.8 9e-14
gi|663681403|emb|HG975522.1|*Solanum lycopersicum* chromosome ... 86.0 3e-13
gi|697155302|ref|XM_009633593.1|PREDICTED: *Nicotiana tomento*... 84.2 1e-12
gi|663673453|emb|HG975447.1|*Solanum pennellii* chromosome ch0... 84.2 1e-12
gi|225319085|dbj|AK329663.1|*Solanum lycopersicum* cDNA, clone... 84.2 1e-12
gi|568214628|ref|NM_001288098.1|*Solanum tuberosum* non-specif... 84.2 1e-12
gi|156118337|gb|EU057712.1|*Solanum tuberosum* non-specific li... 84.2 1e-12
gi|118490067|gb|EF101532.1|*Lactuca sativa* lipid transfer pro... 82.4 4e-12
gi|49659942|gb|AY621631.1|*Nicotiana glauca* lipid transfer pr... 82.4 4e-12
gi|403391450|gb|JN975917.1|*Gossypium hirsutum* lipid transfer... 80.6 1e-11
gi|403391448|gb|JN975916.1|*Gossypium raimondii* lipid transfe... 80.6 1e-11
gi|440494826|gb|KC342639.1|*Gossypium hirsutum* lipid transfer... 80.6 1e-11
gi|156118343|gb|EU057715.1|*Solanum tuberosum* putative non-sp... 80.6 1e-11
gi|1679608|emb|X62395.1|*N. tabacum* ltp1 gene for lipid transf... 80.6 1e-11
gi|7012721|gb|AF195864.1|AF195864 *Gossypium hirsutum* lipid tr... 80.6 1e-11
gi|723722968|ref|XM_004245172.2|PREDICTED: *Solanum lycopersi*... 78.8 5e-11
gi|663681259|emb|HG975520.1|*Solanum lycopersicum* chromosome ... 78.8 5e-11
gi|565377646|ref|XM_006355221.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 78.8 5e-11
gi|165263513|dbj|AP009598.1|*Solanum lycopersicum* DNA, chromo... 78.8 5e-11
gi|49659946|gb|AY621633.1|*Nicotiana glauca* lipid transfer pr... 77.0 2e-10
gi|698529845|ref|XM_009763442.1|PREDICTED: *Nicotiana sylvest*... 75.2 6e-10
gi|12659321|gb|AF331710.1|AF331710 *Avicennia marina* lipid tra... 75.2 6e-10
gi|698522196|ref|XM_009759610.1|PREDICTED: *Nicotiana sylvest*... 73.4 2e-09
gi|298155395|gb|HM068895.1|*Nicotiana attenuata* lipid transfe... 73.4 2e-09
gi|144601654|gb|EF187461.1|*Salvia miltiorrhiza* lipid transfe... 73.4 2e-09
gi|42374743|gb|AY456267.1|*Nicotiana attenuata* lipid-transfer... 73.4 2e-09
gi|698443611|ref|XM_009766482.1|PREDICTED: *Nicotiana sylvest*... 71.6 7e-09

gi|565393387|ref|XM_006362298.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 71.6 7e-09
gi|697145388|ref|XM_009628534.1|PREDICTED: *Nicotiana tomento*... 69.8 2e-08
gi|566210242|ref|XM_002323631.2|*Populus trichocarpa* putative... 69.8 2e-08
gi|565356840|ref|XM_006345207.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 69.8 2e-08
gi|328925265|dbj|AB625593.1|*Nicotiana tabacum* NtLTP1 gene fo... 69.8 2e-08
gi|118487808|gb|EF147722.1|*Populus trichocarpa* clone WS0124_... 69.8 2e-08
gi|21668052|gb|AF519812.1|*Nicotiana tabacum* cultivar W38 non... 69.8 2e-08
gi|731398682|ref|XM_002270934.2|PREDICTED: *Vitis vinifera* no... 68.0 8e-08
gi|698522194|ref|XM_009759609.1|PREDICTED: *Nicotiana sylvest*... 68.0 8e-08
gi|698511602|ref|XM_009802585.1|PREDICTED: *Nicotiana sylvest*... 68.0 8e-08
gi|697110244|ref|XM_009610697.1|PREDICTED: *Nicotiana tomento*... 68.0 8e-08
gi|697110242|ref|XM_009610696.1|PREDICTED: *Nicotiana tomento*... 68.0 8e-08
gi|565359792|ref|XM_006346612.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 68.0 8e-08
gi|337730992|gb|JN021934.1|*Helianthus annuus* cultivar HA383 ... 68.0 8e-08
gi|328925267|dbj|AB625594.1|*Nicotiana tabacum* NtLTP3 gene fo... 68.0 8e-08
gi|159138462|gb|EU112761.1|*Helianthus annuus* genotype ha89 n... 68.0 8e-08
gi|159138458|gb|EU112759.1|*Helianthus annuus* genotype ha52 n... 68.0 8e-08
gi|147802121|emb|AM470038.2|*Vitis vinifera* contig VV78X27094... 68.0 8e-08
gi|48526016|gb|AY562132.1|*Nicotiana tabacum* lipid transfer p... 68.0 8e-08
gi|218291|dbj|D13952.1|TOBLTP *Nicotiana tabacum* mRNA for lipi... 68.0 8e-08
gi|566210240|ref|XM_002323036.2|*Populus trichocarpa* hypothet... 66.2 3e-07
gi|566210238|ref|XM_006373987.1|*Populus trichocarpa* hypothet... 66.2 3e-07
gi|565403911|ref|XM_006367334.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 66.2 3e-07
gi|470145029|ref|XM_004308099.1|PREDICTED: *Fragaria vesca* su... 66.2 3e-07
gi|227955638|gb|FJ889521.1|*Chimonanthus praecox* lipid transf... 66.2 3e-07
gi|118490065|gb|EF101531.1|*Lactuca sativa* lipid transfer pro... 66.2 3e-07
gi|110962344|gb|DQ834940.1|*Solanum sogarandinum* non-specific... 66.2 3e-07
gi|21952515|gb|AF525363.1|*Solanum tuberosum* putative non-spe... 66.2 3e-07
gi|21952513|gb|AF525362.1|*Solanum tuberosum* putative non-spe... 66.2 3e-07
gi|49659944|gb|AY621632.1|*Nicotiana glauca* lipid transfer pr... 64.4 1e-06
gi|67937772|gb|DQ066731.1|*Fragaria x ananassa* non-specific l... 64.4 1e-06
gi|6782435|gb|AF151214.1|AF151214 *Nicotiana glauca* cell-type ... 64.4 1e-06
gi|697110246|ref|XM_009610698.1|PREDICTED: *Nicotiana tomento*... 62.6 4e-06
gi|645221427|ref|XM_008246696.1|PREDICTED: *Prunus mume* non-s... 62.6 4e-06
gi|645221425|ref|XM_008246689.1|PREDICTED: *Prunus mume* non-s... 62.6 4e-06
gi|328925269|dbj|AB625595.1|*Nicotiana tabacum* NtLTP4 gene fo... 62.6 4e-06
gi|190613926|gb|EU424267.1|*Prunus dulcis* x *Prunus persica* pu... 62.6 4e-06
gi|190613924|gb|EU424266.1|*Prunus dulcis* x *Prunus persica* pu... 62.6 4e-06
gi|60459406|gb|AY829652.1|*Capsicum annuum* putative non-speci... 62.6 4e-06
gi|13507261|gb|AF329829.1|*Corylus avellana* lipid transfer pr... 62.6 4e-06
gi|743917245|ref|XM_011004306.1|PREDICTED: *Populus euphratic*... 60.8 1e-05
gi|731344618|ref|XM_010685215.1|PREDICTED: *Beta vulgaris* sub... 60.8 1e-05
gi|645221438|ref|XM_008246748.1|PREDICTED: *Prunus mume* non-s... 60.8 1e-05
gi|595830839|ref|XM_007206086.1|*Prunus persica* hypothetical ... 60.8 1e-05
gi|565377642|ref|XM_006355219.1|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... 60.8 1e-05
gi|470133536|ref|XM_004302574.1|PREDICTED: *Fragaria vesca* su... 60.8 1e-05

| | | |
|---|---|---|
| gi\|160957198\|emb\|CU231311.1\|*Populus* EST from mild drought-st... | 60.8 | 1e-05 |
| gi\|60735417\|gb\|AY793558.1\|*Lens culinaris subsp. culinaris* li... | 60.8 | 1e-05 |
| gi\|60735409\|gb\|AY793554.1\|*Lens culinaris* lipid transfer prot... | 60.8 | 1e-05 |
| gi\|66957889\|gb\|AY093699.2\|*Prunus persica* cultivar Springcres... | 60.8 | 1e-05 |
| gi\|565377664\|ref\|XM_006355228.1\|PREDICTED: *Solanum tuberosum*... | 59.0 | 4e-05 |

**A-3 LTP15(6)_B10 BLASTP ANALİZİ SONUÇLARI**

Veritabanı: PDB Protein Veritabanı

Uzunluk= 112

| Anlamlı Benzerliklerin Sekansları: | Skor (Bits) | E Değeri |
|---|---|---|
| Chain A, Non-Specific Lipid Transfer Protein 1 Fro... | 85.5 | 3e-22 |
| Chain A, Crystal Structure Of Peach Pru P3, The Pr... | 84.7 | 7e-2 |
| Chain A, Lipid Transfer Protein Complexed With Pal... | 84.7 | 7e-22 |
| Chain A, Solution Structure Of Lipid Transfer Prot... | 84.3 | 7e-22 |
| Chain A, Solution Structure Of A New Ltp1 [Nicotia... | 84.0 | 1e-21 |
| Chain A, Nmr Structure Of Mung Bean Non-Specific L... | 83.2 | 2e-21 |
| Chain A, Structural Basis Of Non-Specific Lipid Bi... | 82.4 | 4e-21 |
| Chain A, Lipid Binding In Rice Nonspecific Lipid T... | 80.9 | 2e-20 |
| Chain A, The Crystal Structure Of Wheat Non-Specif... | 80.9 | 2e-20 |
| Chain A, Solution Structure Of Wheat Ns-Ltp Comple... | 79.7 | 4e-20 |
| Chain A, X-Ray Structure Of The Self-Defense And S... | 38.5 | 5e-05 |
| Chain A, Mbp-Fusion Protein Of The Major Peanut Al... | 31.2 | 0.11 |
| Chain A, Crystal Structure Of Hydrophobic Protein ... | 29.6 | 0.15 |
| Chain A, Solution Structure Of The Brazil Nut 2s A... | 28.9 | 0.40 |
| Chain A, Crystal Structure Analysis Of Hi1317 [Hae... | 28.1 | 1.2 |
| Chain A, Solution Structure Of A Liganded Type 2 W... | 26.2 | 1.9 |
| Chain A, Solution Structure Of Plant Nsltp2 Purifi... | 26.2 | 2.5 |
| Chain A, Structure In Solution Of A Methionine-Ric... | 26.6 | 3.1 |
| Chain B, Crystal Structure Of Mabinlin Ii [Cappari... | 25.8 | 3.6 |
| Chain N, Homology Model For The Spinach Chloroplas... | 26.6 | 3.9 |
| Chain 2, 39s Large Subunit Of The Porcine Mitochon... | 26.6 | 4.5 |
| Chain A, Crystal Structure Of Glun2d Ligand-Bindin... | 25.4 | 8.9 |
| Chain A, Glun2d Ligand-binding Core In Complex Wit... | 25.4 | 9.2 |

## EK-B: LTPR6_9 DİZİN ANALİZİ, BLASTN VE BLASTP SONUCU

### B-1 LTPR6_9 NÜKLEOTİD DİZİNİ VE AMİNOASİT DİZİNİ

```
CGA TTG CTG TGG TTT TGG CAG ATG TAT AGA GAG ACT TAA TTC CGC CAC AGC AGG
  T   Q   K   L   K   H   L   I   Y   T   R   F   S   S   A   M   A   S
GGG GAG GAA CAA CGT TGC CAC CCT GCA CAT AAC CTA GGC ACG GTT TCA GCT GAC
  A   V   V   K   A   T   C   F   V   L   I   A   V   A   L   V   A   P
CCA CCA CCG TGC CAC ACG AGA TTG CTG CAT CAG CTA GTG GCG CCA CTA GGG CCA
  L   A   D   A   A   I   S   C   G   T   V   V   G   Q   L   K   P   C
CCG CTA TCA GGA CAA AAC ATG TTG CCT TAA CAA CTG CAG AAG CCA TTG CAG AAG
  L   G   Y   V   Q   G   G   N   V   V   P   P   P   C   C   G   G   I
AAA ATC TAG TAT AAA TTA AGT GTT TTA ATT TCT GTG T
  K   S   L   Y   T   S   A   K   T   T   A   I   X
```

### B-2 LTPR6_9 BLASTN DİZİ ANALİZ SONUÇLARI

Veritabanı: Nükleotid koleksiyonu
Sorgu= lcl|22571
Uzunluk=253

| Anlamlı Benzerliklerin Sekansları: | Skor (Bits) | E Değeri |
|---|---|---|
| emb\|HE962530.1\| *Hirudo medicinalis* partial mRNA for putative ... | 178 | 5e-41 |
| gb\|EF506504.1\| *Olea europaea* putative plant lipid transfer pr... | 66.2 | 2e-07 |

### B-3 LTPR6_9 BLASTP DİZİ ANALİZ SONUÇLARI

Veritabanı: PDB Protein Veritabanı

Uzunluk= 85

| Anlamlı Benzerliklerin Sekansları: | Skor (Bits) | E Değeri |
|---|---|---|
| 09757912.1\|PREDICTED: uncharacterized protein LOC104... | 61.2 | 2e-09 |
| ref\|XP_002305878.2\|lipid transfer family protein [Populus tr... | 59.7 | 3e-09 |
| gb\|AAX84944.1\|non-specific lipid transfer protein-like antim... | 59.3 | 3e-09 |
| ref\|XP_002528683.1\|Nonspecific lipid-transfer protein precur... | 59.3 | 3e-09 |
| ref\|XP_010252074.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 59.3 | 3e-09 |
| gb\|ABK94706.1\|unknown [*Populus trichocarpa*] | 58.9 | 4e-09 |
| ref\|XP_011007240.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 58.5 | 5e-09 |
| gb\|AFK44274.1\|unknown [*Medicago truncatula*] | 58.5 | 6e-09 |
| ref\|XP_003605266.1\|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... | 58.5 | 7e-09 |
| ref\|XP_002270970.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 58.2 | 8e-09 |
| emb\|CAN70512.1\|hypothetical protein VITISV_005630 [*Vitis vin*... | 58.2 | 9e-09 |
| gb\|AGC08424.1\|lipid transfer protein [*Gossypium hirsutum*] | 58.5 | 1e-08 |
| sp\|A0AT31.1\|NLTP5_LENCU RecName: Full=Non-specific lipid-tran... | 57.8 | 1e-08 |
| gb\|AII99870.1\|protease inhibitor/seed storage/ltp family [Ci... | 58.2 | 1e-08 |
| gb\|AGC08421.1\|lipid transfer protein [*Gossypium hirsutum*] | 58.2 | 1e-08 |
| emb\|CDY33268.1\|BnaA01g19350D [*Brassica napus*] | 57.8 | 1e-08 |
| ref\|XP_003623596.1\|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... | 57.8 | 2e-08 |
| gb\|AEC04836.1\|lipid transfer protein [*Dimocarpus longan*] | 57.4 | 2e-08 |
| gb\|AES79814.2\|Lipid transfer protein [*Medicago truncatula*] | 57.4 | 2e-08 |
| gb\|ABK96813.1\|lipid transfer protein isoform 1.1 precursor [... | 57.0 | 2e-08 |
| gb\|AES79828.2\|Lipid transfer protein [*Medicago truncatula*] | 57.0 | 3e-08 |
| ref\|XP_006429568.1\|hypothetical protein CICLE_v10012953mg [C... | 57.4 | 3e-08 |
| ref\|XP_011095136.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 56.6 | 3e-08 |
| gb\|AFR31532.1\|lipid transfer protein [*Betula platyphylla*] | 56.6 | 3e-08 |
| gb\|ABY21307.1\|pollen allergen Pla o 3 [*Platanus orientalis*] | 56.6 | 3e-08 |
| gb\|AES79797.2 Lipid transfer protein [*Medicago truncatula*] | 57.0 | 3e-08 |
| gb\|ADK60918.1\|lipid transfer protein [*Castanea sativa*] | 56.6 | 3e-08 |
| gb\|AFI61838.1\|harmalin [*Peganum harmala*] | 56.6 | 3e-08 |
| gb\|AAL27855.1\|lipid transfer protein precursor [*Davidia invo*... | 56.6 | 4e-08 |
| ref\|XP_010683515.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 56.2 | 4e-08 |
| sp\|Q39794.1\|NLTP_GERHY RecName: Full=Non-specific lipid-trans... | 56.2 | 4e-08 |
| ref\|XP_006400974.1\|hypothetical protein EUTSA_v10014841mg [*E*... | 56.6 | 4e-08 |
| gb\|AAY43800.1\|FSLTP2 [*Gossypium hirsutum*] | 56.2 | 4e-08 |
| gb\|KHG13955.1\|Non-specific lipid-transfer 1 [*Gossypium arbor*... | 56.2 | 4e-08 |
| sp\|A0AT29.1\|NLTP2_LENCU RecName: Full=Non-specific lipid-tran... | 56.2 | 4e-08 |
| gb\|AFM35695.1\|nonspecific lipid transfer protein [*Vitis pseu*... | 56.2 | 4e-08 |
| sp\|O23758.1\|NLTP_CICAR RecName: Full=Non-specific lipid-trans... | 55.8 | 5e-08 |
| gb\|AEN70936.1\|lipid transfer protein [*Gossypium gossypioides*] | 55.8 | 5e-08 |
| ref\|XP_010692489.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 55.8 | 6e-08 |
| emb\|CAL07989.1\|lipid transfer protein [*Platanus* x *acerifolia*] | 55.8 | 6e-08 |
| gb\|ACL01093.1\|lipid transfer protein [*Castanea mollissima*] | 55.8 | 6e-08 |
| ref\|XP_004302608.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 55.5 | 7e-08 |
| ref\|XP_010109652.1\|Non-specific lipid-transfer protein [*Moru*... | 55.8 | 7e-08 |
| ref\|XP_004506429.1\|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... | 55.5 | 8e-08 |

gb|AGC08428.1|lipid transfer protein [*Gossypium hirsutum*] 55.5 8e-08
ref|XP_003516420.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 55.5 9e-08
ref|XP_009608993.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 55.5 9e-08
gb|AGC08426.1|lipid transfer protein [*Gossypium hirsutum*] 55.5 9e-08
ref|XP_010253094.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 55.1 1e-07
ref|XP_003623610.1|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... 55.5 1e-07
gb|ABE11609.1|lipid-transfer protein precursor [*Solanum chac*... 55.1 1e-07
ref|XP_010517150.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 55.1 1e-07
sp|A0AT30.1|NLTP3_LENCU RecName: Full=Non-specific lipid-tran... 55.1 1e-07
gb|AFK46170.1|unknown [*Lotus japonicus*] 55.1 1e-07
sp|A0AT28.1|NLTP1_LENCU RecName: Full=Non-specific lipid-tran... 54.7 1e-07
gb|KHG21711.1|Non-specific lipid-transfer [*Gossypium arboreum*] 54.7 1e-07
gb|AAF35186.1|AF195865_1 lipid transfer protein precursor [*Go*... 54.7 1e-07
gb|AEI70829.1|non-specific lipid-transfer protein [*Helianthu*... 54.7 2e-07
gb|AAF35185.1|AF195864_1 lipid transfer protein precursor [*Go*... 54.7 2e-07
ref|XP_007140137.1|hypothetical protein PHAVU_008G087100g [*P*... 55.5 2e-07
gb|ADY68820.1|lipid transfer protein 3 [*Gossypium herbaceum* ... 54.7 2e-07
gb|KCW88359.1|hypothetical protein EUGRSUZ_A00745 [*Eucalyptu*... 54.7 2e-07
gb|EMS55040.1|Non-specific lipid-transfer protein 4.1 [*Triti*... 55.1 2e-07
gb|AEN70918.1|lipid transfer protein [*Gossypium turneri*] 54.3 2e-07
ref|XP_003623593.1|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... 5 4.3 2e-07
dbj|BAI94496.1|lipid transfer protein [*Dianthus caryophyllus*] 54.3 2e-07
ref|XP_003623579.1|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... 54.3 2e-07
dbj|BAO51648.1|lipid transfer protein [*Suaeda japonica*] 54.3 2e-0
ref|XP_010043178.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 54.3 2e-07
gb|AAG29777.1|lipid transfer protein 3 precursor [*Gossypium* ... 54.3 2e-07
ref|XP_009148874.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 54.3 2e-07
gb|ACE07188.1|Art v 3.0301 allergen precursor [*Artemisia vul*... 54.3 2e-07
gb|AFR43276.1|lipid transfer protein precursor [*Gossypium he*... 54.3 2e-07
ref|XP_010509135.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 54.3 2e-07
gb|AEI70828.1|non-specific lipid-transfer protein [*Helianthu*... 54.3 2e-07
gb|AAY43801.1|FSLTP3 [*Gossypium hirsutum*] 54.3 2e-07
gb|AFR43291.1|lipid transfer protein precursor [*Gossypium ra*... 54.3 2e-07
ref|XP_003623615.1|Non-specific lipid-transfer protein [*Medi*... 54.3 2e-07
ref|NP_568904.1|non-specific lipid-transfer protein 4 [*Arabi*... 53.9 3e-07
gb|AEN70919.1|lipid transfer protein [*Gossypium mustelinum*] 53.9 3e-07
gb|AEN70915.1|lipid transfer protein [*Gossypium thurberi*] 53.9 3e-07
ref|XP_004506487.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 53.9 3e-07
ref|XP_008370253.1|PREDICTED: non-specific lipid-transfer pr... 53.9 3e-07

# ÖZGEÇMİŞ

**KİŞİSEL BİLGİLER**

| | |
|---|---|
| Adı Soyadı | :Dilek ÇAĞLAR |
| Doğum Tarihi ve Yeri | :22.05.1987/Tolbuhin |
| Yabancı Dili | :İngilizce |
| E-posta | :dilekcglr@gmail.com |

**ÖĞRENİM DURUMU**

| Derece | Alan | Okul/Üniversite | Mezuniyet Yılı |
|---|---|---|---|
| Y. Lisans | Mol. Biy. ve Genetik | Yıldız Teknik Üniversitesi | 2015 |
| Lisans | Biyoloji | Çanakkale 18 Mart Üniversitesi | 2009 |
| Lise | Fen Bilimleri | Vefa Poyraz Süper Lisesi | 2005 |

**İŞ TECRÜBESİ**

| Yıl | Firma/Kurum | Görevi |
|---|---|---|
| 2011-Devam Ediyor | Biogen Medikal Aletler Ltd. Şti. | Ürün Sorumlusu |