



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE ABC
PROTEİNLERİNDEN MDR ALT AİLESİNİN
TANELERDE İFADE ANALİZİ**

Hamed JALILI

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Birsen ÇAKIR

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 22.05.2017

Bornova-İZMİR

2017

EÜ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE ABC

PROTEİNLERİNDEN MDR ALT AİLESİNİN

TANELERDE İFADE ANALİZİ

Hamed JALILI

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen ÇAKIR

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 22.05.2017


**Bornova-İZMİR
2017**

Hamed JALILI tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan ‘‘SULTANI ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE ABC PROTEİNLERİNDEN MDR ALT AİLESİNİN TANELERDE İFADE ANALİZİ’’ başlıklı bu alışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 22.05.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Doç. Dr. Birsen ÇAKIR
Raportör Üye : Prof. Dr. Hülya İLBI
Üye : Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇELİK

İmza


.....

.....

.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE ABC PROTEİNLERİNDEN MDR ALT AİLESİNİN TANELERDE İFADE ANALİZİ ” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

22/05/2017

Hamed JALILI

ÖZET**SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ ÜZÜM ÇEŞİDİNDE ABC
PROTEİNLERİNDEN MDR ALT AİLESİNİN TANELERDE İFADE
ANALİZİ**

JALILI, Hamed

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkiler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Birsen ÇAKIR

22.05.2017, 72 sayfa

ABC Proteinleri/ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcıları/ABC Taşıyıcıları (ABC Proteins/ATP Binding Cassette Transporters/ABC Transporters) protein ailesi evrimsel olarak oldukça çeşitli ve en büyük protein ailelerinden biridir. ABC proteinleri hücrelerin ve organellerin membranında yer alarak iç ve dış çevre ile olan madde alışverişinden sorumlu olan proteinlerden oluşmaktadır. Bu proteinler kromozom yapısının düzenlenmesi, protein sekresyonu, ilaç direnci geliştirme, antikor oluşumu, fitohormon taşınımı ve sinyal iletimi gibi birçok metabolik yolakta görev alan proteinleri de içermektedir. Bu tez çalışmasında, genom projesi tamamlanmış olan *Vitis vinifera* L. (asma) bitkisinin olası ABCB/MDR gen ailesinin üzüm tanelerinin gelişimi boyunca ifade profili analiz edilmiştir.

Sultaniye çekirdeksiz (*Vitis vinifera*) çeşidine ait tanelerde *Vitis* ABCB/MDR alt ailesine ait 19 adet genin farklı tane gelişim dönemlerinde Real-time PCR tekniği ile ifade profilleri çıkarılmıştır. *VvMDR3*, *VvMDR12*, *VvMDR13*, *VvMDR14*, *VvMDR16* ve *VvMDR17* genlerinin ifadesi çiçeklenmeden 4-6 hafta sonra artış göstermiş ve ben düşme dönemine doğru ise azalmıştır. *VvMDR7*, *VvMDR10*, *VvMDR11* ve *VvMDR15* genlerinin ifadesi çiçeklenme, tane tutumu ve ben düşmeden sonra yüksek düzeyde seyretmiş, ancak olgunlaşma ve ben düşme döneminde ise minimum düzeyde seyretmiştir. *VvMDR1*, *VvMDR2*, *VvMDR8* genlerinin ifadesi ise tane tutumunda ve bendüşmeden önce yüksek tespit edilmiştir. Çiçeklenme ve tane tutumu sırasında *VvMDR* genlerinin ifadesinin yüksek olması bu dönemde oksin taşınımında rol oynayabileceklerini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: ABC, ABCB, MDR, mRNA ifadesi, *Vitis vinifera*



ABSTRACT**EXPRESSION ANALYSIS OF MDR SUBFAMILY FROM ABC PROTEINS IN BERRIES OF SULTANA SEEDLESS GRAPE VARIETY**

JALILI, Hamed

MSc in Horticulture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Birsen ÇAKIR

22.05.2017, 72 pages

The ABC Proteins / ATP Binding Cassette Transporters / ABC Transporters protein family is one of the largest and most diverse protein families during the evolution. ABC proteins consist of proteins that are involved in the exchange of substances with the internal and external environment of the cell, are localized on the membranes of cells and organelles. These proteins include proteins involved in many metabolic pathways such as regulation of chromosome structure, protein secretion, drug resistance, antibody formation, phytohormone transport and signal transduction. In this study, the expression profile of the putative ABCB / MDR gene family of the *Vitis vinifera*, whose genome project has been completed was analyzed during the different stages of development in grapes berries. Expression profile of the 19 genes belonging to Vitis ABCB / MDR sub-family, were obtained by real-time PCR at different periods of development in Sultaniye çekirdeksiz (*Vitis vinifera*) berries. The expression of VvMDR3, VvMDR12, VvMDR13, VvMDR14, VvMDR16 and VvMDR17 genes increased 4-6 weeks after flowering and decreased towards veraison. Expression of VvMDR7, VvMDR10, VvMDR11 and VvMDR15 genes was high at flowering, fruit set and after veraison, but decreased at a minimum level during ripening and over-ripening stage. Expression of VvMDR1, VvMDR2, and VvMDR8 genes was high at fruit set and before fruit set. The high expression of VvMDR genes during flowering and fruit set suggests that they may play a role in auxin transport during this period.

Keywords: ABC, ABCB, MDR, mRNA Expression, *Vitis vinifera*

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşarak, bana tezimde uygun bir çalışma ve laboratuvar ortamı sağlayan sayın Doç. Dr. Birsen ÇAKIR'a, çalışmalarım boyunca benden desteğini hiç esirgemeyen değerli arkadaşlarım Khalid ABDU ve Güneş TURGAY ve sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma "2014-ZRF-001" no'lu "Asma Bitkisinde (*Vitis vinifera*) ABC Proteinlerinden ABCB (MDR) Alt Ailesinin Farklı Gelişim Dönemlerine Ait Tanelerdeki İfade Profilinin Belirlenmesi" adlı BAP projesi tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xx
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxi
1.GİRİŞ.....	1
1.1 Biyolojik Membran Yapısı.....	2
1.2 ABC Proteinleri.....	5
1.2.1 ABC taşıyıcı proteinlerinin yapısal organizasyonu.....	7
1.2.2 ABCA alt ailesi.....	9
1.2.3 ABCB alt ailesi.....	10
1.2.4 ABCC alt ailesi.....	18
1.2.5 ABCD alt ailesi.....	19
1.2.6 ABCE alt ailesi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
1.2.7 ABCF alt ailesi.....	20
1.2.8 ABCG alt ailesi.....	21
1.2.9 ABCI alt ailesi.....	23
1.2.10 Asma (<i>Vitis vinifera</i> L.).....	24
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	28
2.1 Materyal.....	28
2.1.1 Bitki materyali.....	28
2.1.2 RNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve kimyasallar.....	28
2.2 Yöntem.....	29
2.2.1 <i>Vitis vinifera</i> L. farklı organlarından toplam RNA izolasyonu.....	29
2.2.2 Toplam RNA'ya DNase uygulanması.....	31
2.2.3 cDNA sentezi.....	32
2.2.4 kullanılan Primerler.....	33
2.2.5 Real Time PCR uygulamaları.....	35
2.2.6 Örneklerin Cihaza Yüklenmesi.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.7 Verilere Ait Analizler.....	36
3. BULGULAR.....	37
3.1 Toplam RNA'ların İzolasyonuna Ait Bulgular.....	37
3.1.1 VvMDR Gen Ailesinin Tanelerde Farklı Gelişim Dönemlerinde İfade Analizi.....	38
4. TARTIŞMA.....	57
5. SONUÇ.....	61
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Fosfolipitlerin Genel Yapısı	3
1.2 Biyolojik Membran Yapısı.....	5
1.3 ABCA/AOH Alt Ailesinin Topolojisi.....	9
1.4 ABCA/ATH Alt Ailesinin Topolojisi.....	10
1.5 ABCB Alt Ailesinin Topolojisi.....	11
1.6 ABCB/ATM Alt Ailesinin Topolojisi.....	11
1.7 ABCB/TAP Alt Ailesinin Topolojisi.....	12
1.8 Hücreler arası Oksinin taşınımı.....	13
1.9 ABCB ve PIN proteinlerinin oksin taşınımındaki rolleri.....	14
1.10 ABCB Proteinlerinin Genel Yapısı.....	15
1.11 ABCB Proteinlerinin Polar Oksin Taşınması.....	17
1.12 ABCC/MRP Alt Ailesinin Topolojisi.....	19
1.13 ABCD/PMP Alt Ailesinin Topolojisi.....	19
1.14 ABCE/RLI Alt Ailesinin Topolojisi.....	20

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.15 ABCF/GCN Alt Ailesinin Topolojisi.....	21
1.16 ABCG/WBC Alt Ailesinin Topolojisi.....	22
1.17 ABCG/PDR Alt Ailesinin Topolojisi.....	23
1.18 ABCI/SMC Alt Ailesinin Topolojisi.....	23
1.19 ABCI/NAP Alt Ailesinin Topolojisi.....	24
1.20 Üzüm Tane Morfolojisi.....	25
1.21. Asmada Tane Gelişim Aşamaları.....	26
2.1 Standart Eğrisi.....	35
2.2 RT-PCR grafiği.....	36
3.1 Tanelerde farklı gelişim dönemlerine ait toplam RNA jel görüntüsü.....	37
3.2 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR1 Geninin İfade Analizi.....	38
3.3 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR2 Geninin İfade Analizi.....	39
3.4 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR3 Geninin İfade Analiz.....	40
3.5 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR4 Geninin İfade Analizi.....	41
3.6 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR5 Geninin İfade Analizi.....	42

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR6 Geninin İfade Analizi.....	43
3.8 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR7 Geninin İfade Analizi.....	44
3.9 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR8 Geninin İfade Analizi.....	45
3.10 Tanelere Farklı Gelişim Döneminde VvMDR9 Geninin İfade Analizi....	46
3.11 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR10 Geninin İfade Analizi..	47
3.12 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR11 Geninin İfade Analizi..	48
3.13 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR12 Geninin İfade Analizi..	49
3.14 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR13 Geninin İfade Analizi..	50
3.15 Tanelede Farklı Gelişim Döneminde VvMDR14 Geninin İfade Analizi..	51
3.16 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR15 Geninin İfade Analizi..	52
3.17 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR16 Geninin İfade Analizi..	53
3.18 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR17 Geninin İfade Analizi..	54
3.19 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR18 Geninin İfade Analizi..	55
3.20 Tanelerin Farklı Gelişim Döneminde VvMDR19 Geninin İfade Analizi ..	56
4.1 VvMDR3, VvMDR12, VvMDR13, VvMDR14, VvMDR16 ve VvMDR17 Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerinde İfade Profilleri.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)**Şekil****Sayfa**

4.2 *VvMDR7, VvMDR10, VvMDR11 ve VvMDR15* Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerinde İfade Profilleri.....59

4.3 *VvMDR1, VvMDR2, VvMDR8* Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerinde İfade Profilleri.....60



ÇİZELGELER DİZİNİ**Çizelge****Sayfa****2.1. Olgunlaşma esnasında toplanan tane örnekleri.....28****2.2. Toplam RNA'ya DNase uygulanması.....32****2.3. Çalışmada kullanılan primerler.....34**

KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
µg	Mikrogram.
µL	Mikrolitre.
ABC	ATP Binding Cassette Transporters
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool.
cDNA	Tamamlayıcı DNA (Complementary DNA).
DEPC	Diethylpyrocarbonate.
DNase	Deoksiribonükleaz enzimi.
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat.
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
MDR	Multidrug Resistance
NBD	Nucleotide Binding Domain
PCR	Polimeraz zincir tepkimesi (Polymerase Chain Reaction).
PEG	Polietilen glikol.
PIP	Plazma membranı intrinsik protein.
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone.
rpm	Dakikadaki devir sayısı (Revolutions Per Minute).

KISALTMALAR DİZİNİ(devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
SDS	Sodium dodecyl sulfate.
SIP	Küçük temel intrinsik protein
TMD	Transmembrane Domain
Vv	<i>Vitis vinifera</i>



1. GİRİŞ

Vitis vinifera L. (asma) sistematik olarak “*Dicotyledoneae*” sınıfı içerisinde, “*Rhamnales*” takımında, “*Vitaceae*” ailesinde ve “*Vitis*” cinsi içerisinde yer alan çok yıllık sarıncı bir bitkidir (Keller, 2010). Dünyada yetiştiriciliği en yaygın düzeyde yapılan ve en yüksek ekonomik değere sahip meyve çeşididir. Üzümde başlıca; taze meyve (sofralık üzüm), kuru meyve ve şarap üretimi amacıyla yararlanılmaktadır.

Asmada üzüm tanelerinin gelişimi üç farklı aşamada incelenir (Castellari et al., 2011). Birinci aşama, çiçeklenmenin hemen ardından başlayan ve yaklaşık 60 gün süren bu evrede tane oluşumu gerçekleşir. Bu evrede taneler hızlıca büyür ve organik asit birikimi sürdüğü halde, şeker içeriği düşük kalmaktadır.

Çiçeklenmeden 7-10 hafta sonra gerçekleşen ikinci aşama (Fillion et al., 1999), üzüm gelişiminin duraklama aşamasıdır. Tane gelişimi belirgin bir şekilde duraklamakta ve tanelerin organik asit yoğunlukları maksimum düzeye ulaşmaktadır. İklimsel koşullar ve çeşide göre değişmekle birlikte duraklama evresi, yaklaşık 2-3 hafta sürmektedir (Dokoozlian, 2000). Duraklama evresinin ardından 24 saat içinde gerçekleşen III. aşamaya geçiş (Coombe, 1992), ben düşme olarak isimlendirilmekte ve olgunlaşmanın başlangıcına karşılık gelmektedir. Bu aşamada tanede yüksek miktarda şeker ve amino asit birikimi başlar. Tat ve aroma veren bileşikler de meyvede birikmektedir. Ayrıca tane yumuşaması da görülür. Bu aşamadaki büyüme hücre bölünmesinden çok hücrelerin büyümesi ile tanımlanır ve yaklaşık olarak 6-8 hafta sürer (Kennedy, 2002). Tane olgunlaşması boyunca ABA, brassinosteroidler (BR’ler) ve etilen; olgunlaşma zamanını veya olgunlaşmayla ilişkili bazı süreçleri teşvik ederler. Tane olgunlaşmasının erken aşamaları boyunca oksin ve sitokinler, olgunlaşmayı geciktirici etki gösterebilir.

ABC proteinleri temel olarak hücrelerin ve organellerin membranında yer alarak iç ve dış çevre ile olan madde alışverişinden sorumlu olan proteinlerden oluşsa da, nükleik asitlerin düzenlenmesi, kromozom yapısının düzenlenmesi, fitohormon taşınımı, protein salınımı, ilaç direnci geliştirme, antikör oluşumu ve

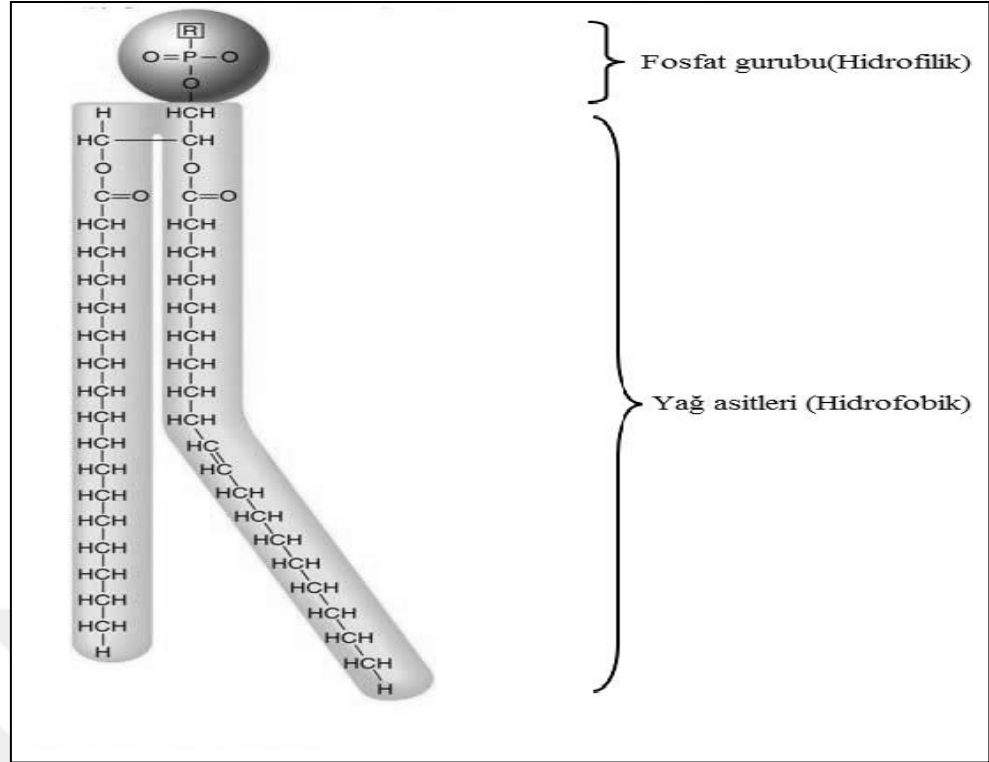
sinyal iletimi gibi diđer birçok metabolik yolda görev alan proteinleri de içermektedir (Fath and Kolter, 1993; Higgins, 1992; Higgins and Linton, 2003; Rea, 2007). ABC proteinlerinden *ABCB/MDR* alt ailesinin bireyleri memeli analoglarında olduđu gibi bitkilerde de ilaç tařımada görev aldıkları dűřünűlműř, ancak metabolik olarak deđiřik roller oynadıkları ortaya çıkmıřtır.

ABCB/MDR alt ailesi bireyleri *Arabidopsis thaliana*'da herbisit direncinde görev aldığı gibi apikal meristemde oksin taşınımında görev alırlar (Dudler and Hertig, 1992).

Ekonomik deđeri yűksek olan *Vitis vinifera*'da uzun vadede őrűn veriminin artırılması, biyotik/abiyotik strese dayanıklı çeřitlerin őrűtilmesi ve besin deđerlerinin artırmak amacıyla *ABCB /MDR* alt ailesinin őrűm taneleri ve farklı organlarda ifade profillerinin çıkarılması ve karakterize edilmesi gerekmektedir. Tane geliřimi boyunca *VvMDR* gen ailesinin, ifadesinin nasıl deđiřtiđinin gűzlemlenmesi bu hedefe ulařmakta bűyűk bir etken olabilir.

1.1 Biyolojik Membran Yapısı

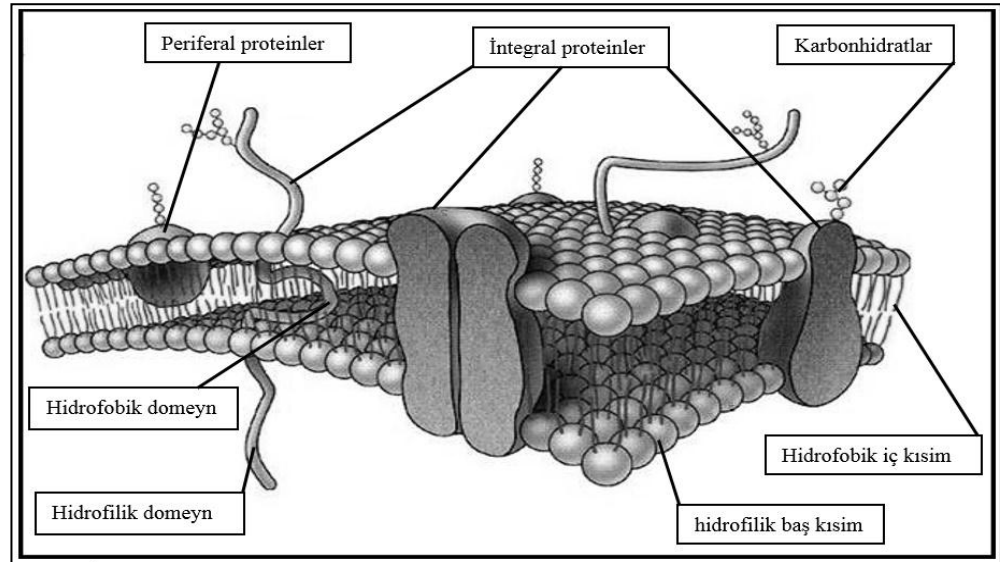
Biyolojik membranlar, çift tabaka fosfolipitlerden, lipitlerin ara ve yűzey kısımlarında bulunan proteinlerden ve bu iki molekűl grubuna bağlı karbonhidratlardan oluşmaktadırlar (Purves et al., 2000; Lodish et al., 2003). Lipitler biyolojik membranların ana elemanlarıdır ve fosfolipitler asıl membran yapısını oluştururlar. Membranların buldukları yapı ve görev farklılığı nedeni ile lipitler, sadece fosfolipit çeşitlerinin değil diğer lipit çeşitlerinin de yapıya katılması ile farklılık gűsterebilirler. Fosfolipitlerden oluşan biyolojik membranlar yapısal olarak iç kısımda hidrofobik yađ asitlerinden ve dış kısımda fosfat gruplarından meydana gelir.



Şekil 1.1 Fosfolipitlerin Genel Yapısı: Fosfolipitler, hidrofilik ve hidrofobik kısımlardan oluşmaktadır. Hidrofilik kısım zarın dışarı bakan yüzeyini oluşturarak fosfat içeren değişken bir gruptan meydana gelir. Bu gruba bağlı zarın içine bakan hidrofobik kısım, gliserolün iki yağ asidine bağlanması ile oluşur. Yağ asitlerinin karbon-karbon bağlarının karakteri ve karbon ayaklarının uzunluğu farklılık gösterir.

Seçici geçirgen bir karaktere sahip olan membran, su ve iyon gibi hidrofilik moleküllerin geçişini hızlı bir şekilde sağlamanın yanı sıra, diğer madde geçişlerini ve sinyal transferini de gerçekleştirmektedir (Purves et al., 2000; Lodish et al., 2003). Membran proteinleri, biyolojik membranı oluşturan önemli moleküllerden biridir. Membranlar da madde taşınımını sağlayan taşıyıcı proteinler, dış çevredeki değişimleri saptayan reseptör proteinler, zarın iç kısmına bağlı enzim yapılar, hücre-hücre etkileşiminde görev yapan ve hücreleri birbirine bağlayan adhezyon proteinleri, hücreleri hücre iskeletleri ile birbirine bağlayan bağlantı proteinleri ve hücrenin tanınmasını sağlayan yüzey proteinleri gibi çeşitli metabolik olayları düzenleyen farklı görevlere sahip proteinler bulunmaktadır (Purves et al., 2000; Lodish et al., 2003).

Membranlarda yapısal olarak iki çeşit protein yapı bulunur. Bunlar “periferal” ve “integral” proteinlerdir. Periferal proteinler membran üzerinde bulunan fosfolipitlerin fosfat taşıyan grupları ya da diğer membran proteinleri ile ilişkili olup membranın hidrofobik iç kısmı ile etkileşim halinde olmayan proteinlerdir. İntegral proteinlerse, fosfolipitler gibi hidrofilik ve hidrofobik karakterde bölgelere sahip ve membran içerisine gömülü halde bulunan proteinlerdir. Hidrofilik amino asitlerin oluşturduğu protein domainleri membranın iç veya dış kısmına bakan yüzeylerde bulunurken, hidrofobik karakterli aminoasitlerin oluşturduğu protein domainleri membranın içerisine gömülü halde bulunurlar. Bir integral protein olan “transmembran” proteinler membranın her iki yüzeyiyle de etkileşime girme yeteneğine sahiptirler. Bu yapılar dış çevre ile membran arasında sinyal ve madde taşınımından sorumlu proteinlerdir. Ancak membrana gömülü olarak bulunan ve membranın tek yüzü ile etkileşen integral proteinler de vardır (Alberts et al., 2007; Chapman, 1988; Gennis,1989; Lodish et al., 2013; Sadava et al., 2011a). Karbonhidratlar ise membranın üzerinde bulunan diğer bir yapıdır. Bu yapılar lipitlere bağlanarak glikolipitleri, proteinlere bağlanarak glikoproteinleri oluştururlar ve hücre membranının dış kısmında yer alarak hücrenin diğer hücre ve moleküller tarafından tanınmasında ve sinyal iletiminde rol alırlar (Alberts et al., 2007; Chapman, 1988; Gennis, 1989; Lodish et al., 2013; Sadava et al., 2011a). Karbonhidrat, lipit ve proteinler membran içerisinde bireysel veya birlikte çeşitli yapılar oluştururlar. Bu yapılar hücre membranından madde taşınması, reseptörlerle dış çevrenin ve diğer hücrelerin tanınması, hücre yapısının korunması için hücre iskeletinin oluşturulması ve membranın iç kısmına bağlı yapılar ile metabolik olayların düzenlenmesi gibi olaylarda görev alırlar.



Şekil 1.2 Biyolojik Membran Yapısı: “İntegral” ve “Periferik” Proteinler: Membran proteinleri membranın içerisinde (integral) ve membranın yüzeyinde bulunabilirler (periferik).

1.2 ABC Proteinleri

Membran proteinleri içerisinde yer alan ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcıları/ ABC Proteinleri/ ABC Taşıyıcıları (ATP Binding Cassette Transporters/ ABC Proteins/ ABC Transporters) süper ailesi, en büyük protein ailelerinden biridir (Higgins, 1992; Higgins and Linton, 2003).

Bu proteinler en az gelişmiş mikroorganizmadan insana kadar tüm türlerde bulunur ve çeşitli fizyolojik olaylarda rol oynamaktadırlar. Bu yüzden oldukça tıbbi ve ekonomik öneme sahiptirler. ABC taşıyıcıları mikroorganizmalarda, antibiyotik ve antifungal direnç merkeziyken insanlarda ise, sistik fibroz, tanca hastalığı, “obstetrik cholestases” gibi genetik hastalıklarla ve kanser ilaçlarına dayanıklılıkla ilişkilendirilirler.

Besinlerin alınımına da aracılık eden bu taşıyıcı protein sistemlerinin fizyolojisi, 1970'lerde bakterilerde (özellikle, *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*) detaylı olarak incelenmiştir. Bütün *E.coli* genomunun yaklaşık % 5 i ABC taşıyıcıların bileşenlerini kodlamaktadır (Verrier et al., 2008). Bitki ABC taşıyıcıları yağ asitleri, kütiküler lipidler, oksin, ağır metaller, ksenobiotikler ve

sekonder metabolitler dahil olmak üzere bir çok molekülün taşıma sistemlerinde yer alırlar.

Temelde sitoplazma ile dış çevre arasında kanal oluşturan ve ATP Bağlayan Kaset Taşıyıcıları ailesine ait olan bu proteinler; ATP'nin bağlanması ve hidrolizi sonucu ortaya çıkan enerjiyi kullanarak madde konsantrasyon farkını gözetmeksizin maddelerin her iki yönde taşınmasını sağlarlar (Fath ve Kolter, 1993; Theodoulou, 2000; Jones, O'Mara et al., 2009; Rees, Johnson et al., 2009; Licht and Schneider, 2011). Taşınımı dış çevreden içeriye veya tam tersi yönde gerçekleştirebilirler. Fakat henüz aynı taşıyıcının her iki yönde de taşıma yaptığı gösterilmemiştir (Higgins, 1992; Higgins and Linton, 2003).

Membran üzerinde madde taşınmasından sorumlu olan bu proteinler diğer yandan evrimsel süreçte yüksek oranda çeşitlenmiş ve bu ABC taşıyıcıları ailesi içerisinde; besin alımı, ozmotik denge sağlanması, hücre bölünmesi, antibiyotik ve toksik maddelere direnç sağlanması, kolesterol ve yağ taşınım trafiğinin düzenlenmesi, kök hücre gelişimi ve bakteriyel bağışıklık sağlanması, DNA tamiri, RNA translasyonu ve hücre bağışıklığının sağlanması gibi birçok hücrenel olaylarda rol alan proteinler yer alırlar (Higgins, 1992; Theodoulou, 2000; Higgins and Linton, 2003; Jones, O'Mara et al., 2009; Rees, Johnson et al., 2009; Licht and Schneider, 2011).

Arkea, bakteriya ve ökaryota alemlerinin tümünde bulunan ABC taşıyıcı proteinleri yapısal olarak, iki "Transmembran Domain" (TMD) ve iki "Nükleotid Bağlanma Domain'den" (NBD) oluşur (Oswald, Holland et al. 2006; Licht and Schneider, 2011). Yapılan DNA ve protein dizi analiz sonuçlarında, bu domainler tek gen üzerinden kodlanarak sentezlenebileceği gibi birden fazla gen tarafından kodlanarak da sentezlenebileceği görülmüştür (Higgins, 1992; Fath and Kolter, 1993; Theodoulou, 2000; Licht and Schneider, 2011). Buna bağlı olarak; ABC taşıyıcı protein ailesi yapısal olarak üç gruba ayrılmaktadır;

Birinci grupta, aynı gen üzerinde iki adet TMD ve NBD kodlanan tam molekül ABC taşıyıcıları yer alır. İkinci grupta ise, TMD ve NBD'nin sadece bir kopyasını aynı gen üzerinde kodlayan yarım molekül ABC taşıyıcıları

bulunmaktadır. Bu farklı genomik organizasyonlar; proteinlerin monomerik, homo-heterodinamik veya tetramerik yapıda olmasına neden olur. Son grupta ise sadece NBD taşıyan ve diğer metabolik olaylarda rol alan çözümlü ABC taşıyıcı proteinleri bulunur (Linton, Rosenberg et al., 2003; Varadi, Tusnady et al., 2003; Oswald, Holland, et al., 2006; Rees, Johnson et al., 2009).

1.2.1 ABC taşıyıcı proteinlerinin yapısal organizasyonu

ABC proteinlerinin yapısında bulunan TMD ve NBD proteinin aktif olabilmesi için değişik görevler üstlenmişlerdir. Taşıyıcının membran yüzeyinde kanal yapısı oluşturarak maddelerin geçişini sağlayan bölge NBD adını alır. TMD ise yüksek hidrofobik karaktere sahip heliks yapılardan oluşmuştur. Transmembran heliks yapı, membran üzerinde beş ila on arası bir hat çizerek, bir kanal yapısı oluşturur. Oluşan bu yapıdan dolayı TMD; peptit, vitamin, ilaç hormon, toksik madde, amino asit ve inorganik asitler gibi değişik birçok maddenin seçici şekilde taşınımını gerçekleştirir (Locher, 2004; Oswald et al., 2006; Licht and Schneider, 2011). TMD'nin oldukça farklılaşmış yapısına rağmen; NBD, TMD ile %30- %50 arası dizi benzerliğine sahip olup, hidrolizin gerçekleştiği ve ABC proteinlerinin görev yapması için gerekli olan ATP'nin bağlandığı yerdir. NBD (200 amino asitlik bir bölge) P-loop/Walker A (GXXGXGK(S/T) ve Walker B [(hidrofobik amino asit)₄ (D/E)] motiflerine sahiptir. Bu dizilerin arasında; ABC taşıyıcı proteinlerinin imzası olan C motifi bulunur. Tüm ATP hidrolizi gerçekleştiren proteinlerde bulunan Walker A ve Walker B motiflerinin yanı sıra, C-motifi sadece ABC taşıyıcı proteinlerine özeldir. Bu üç motifin dışında, Q loop ve H motifi adı verilen iki tane birbirinden değişik korunmuş bölge bulunmaktadır. Burada; Walker A motifi ATP'nin α ve β -fosfatlarına bağlanır, Walker B motifinin sahip olduğu β -katlanma (sheet) Mg^{++} iyonlarını dengeleyerek ATP molekülününün sabitlenmesinde rol oynar. Walker B' nin sonrasında ortaya çıkan glutamik asit ise ATP hidrolizini, H motifi ve C motifi ise γ -fosfatı stabil hale getirerek nükleotid bağlanma bölgesini meydana getirirler (Higgins, 1992; Theodoulou, 2000; Oswald et al. 2006; Rea, 2007). Sadece dışarıdan içeriye doğru madde taşınımında rol oynayan ABC taşıyıcılarında Substrat Bağlanma Proteini (Substrate Binding Protein/SBP) mevcuttur. TMD yapısı, taşınacak maddeye direk bağlanmaz. Bu protein

taşınacak olan maddeye bağlanarak, TMD'ye aktarılmasını sağlar. Yapılarında iki globüler domain mevcuttur (Higgins, 1992; Fath and Kolter, 1993; Licht and Schneider, 2011). SBP Gram-negatif bakterilerde, periplazmik bir boşlukta yer almasına rağmen, arkea ve Gram-pozitif bakterilerde lipit bir çapa yardımıyla membrana tutunarak görevini gerçekleştirir (Higgins, 1992; Fath and Kolter, 1993).

Bakteri veya hayvanlarda bitkilere nazaran daha az sayıda ABC taşıyıcısı bulunduğu görülmektedir. Diğer yandan genom büyüklüğü ile karşılaştırıldığında bakterilerin daha fazla ABC taşıyıcı proteinlere sahip olduğu görülmektedir. *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomların da 120'nin üzerinde ABC taşıyıcı protein mevcuttur (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Garcia et al., 2004). Bu proteinlerin bitkilerde sayıca fazla oluşu, bitkinin biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma geliştirmesi, iç ve dış kaynaklı toksinlerin atılımının sağlanması, yoğun metabolizma ve fotosentez sonucu oluşan ürünlerin çeşitliliği gibi olayların ABC proteinleri tarafından düzenlenmesinden dolayı kaynaklandığı sanılmaktadır.

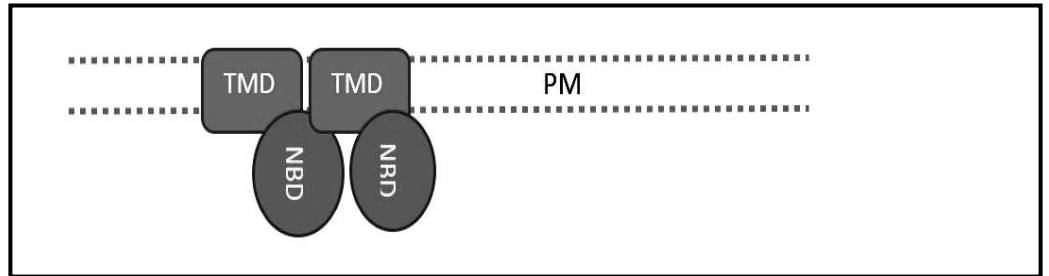
ABC Taşıyıcı protein ailesi bitkilerde, proteinlerin yapısal farklılıklarına ve hücre de aldığı göreve göre 13 farklı alt aileye ayrılır (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Rea et al Licht and Schneider, 2011). Bu sınıflandırmaya göre; *MDR* (Multidrug Resistance homologları), *MRP* (Multidrug Resistance Associated homologları), *PDR* (Pleiotropic Drug Resistance homologları) ve *AOH* (*ABCA1* homologları) tam molekül ABC taşıyıcılarını; *PMP* (Peroxisomal Membrane Protein homologları), *WBC* (White Brown Complex homologları), *ATH* (*ABC2* homologları), *ATM* (Mitokondriyal ABC taşıyıcıları homologları) ve *TAP* (Antijen üretimi ile ilgili taşıyıcıların homologları) ise yarım molekül ABC taşıyıcılarını; membrana bağlı olmayan ve *RLI* (*RNas L* inhibitör homologları), *GCN* (maya *GCN-20* homologları) ve *SMC* (kromozom yapısal onarım homologları) alt aileleri de üçüncü grubu meydana getirir. Bu gruplara dahil olmayan ve yapısal farklılıkları bulunan diğer alt aileyi de *NAP* (Non Intrinsic ABC taşıyıcıları) oluşturur.

Öte yandan tüm ABC taşıyıcılar ile aynı isme sahip olan bitki ABC taşıyıcı proteinlerinde de aynı sınıflandırılma sistemi kullanılmaktadır. Bu sınıflandırma sisteminde HUGO (human genome organization) tarafından onaylanmış (omurgalı ve omurgasız grupları için kullanılan) alt aile sınıflandırması kullanılmaktadır. Bitkilerde ABCH alt ailesine ait protein yapıları şimdilik görülmemiştir (Verrier et al., 2008).

Burada her iki sınıflandırma yani harflendirme ile yapılan (ABCA-I) sınıflandırma ve parantez içerisindeki ABC proteinlerinin hücrede bulunma yerlerine ve gördükleri işe göre sınıflandırma yapılmıştır. İç içe verilerek eski ve yeni sınıflandırmaları karşılaştırılmıştır.

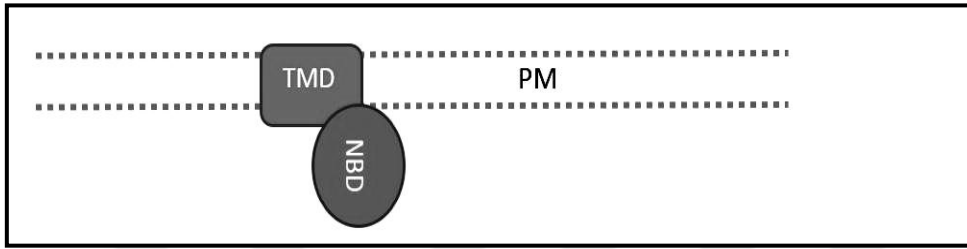
1.2.2 ABCA alt ailesi

Arabidopsis thaliana genomunda ABCA/AOH (ABCA1 Homologları) alt ailesine ait bir adet AtAOH1 (AtABCA1) bulunur. Diğer yandan *Oryza sativa* veya maya genomuna bakıldığında ise herhangi bir karşılığına rastlanmamıştır (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Garcia et al., 2004). NBD'den sonra geniş bir bağlayıcı (L-domain) yapıya sahip olmasına rağmen, yapısal olarak tam-molekül ve ileri yönlü bir protein olup yaklaşık 1800 aa içerir. İnsanda ABCA1 lipit taşınımından sorumludur ve mutasyonu lipoprotein birikiminden kaynaklı "Tangier" hastalığına neden olmaktadır (Bodzioch et al., 1999). AOH'ın tohum olgunlaşmasında ve çimlenme sırasında bitkilerde de insanda olduğu gibi lipit taşınımından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Rea et al., 2003).



Şekil 1.3 ABCA/AOH Alt Ailesinin Topolojisi: ABCA Alt Ailesi hücre membran üzerinde yer alan tam-molekül ve ileri yönlü bir protein ailesidir.

ABCA/ATH (ABC2 Homologları) alt ailesi yarım molekül taşıyıcılardan meydana gelir. Ökaryotik ABCA alt ailesi her ne kadar tam molekül taşıyıcıları içerse de ATH proteinlerinin işlevsel benzerliklerinin olmasından dolayı bu grupta yer alırlar. *Oryza sativa* genomunda 6 adet ve *Arabidopsis thaliana* genomunda 11 adet ATH geni bulunur. ATH proteinleri taşıma işinde ve aynı zamanda ilaç direnci ile ilgili fonksiyonlarda da rol alır (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Rea et al., 2003; Rea, 2007).



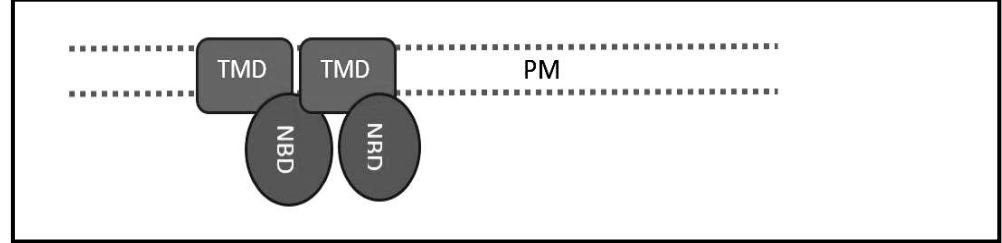
Şekil 1.4 ABCA/ATH Alt Ailesinin Topolojisi: ABCA alt ailesine ait hücre membranında lokalize olan yarım molekül ileri yönlü ATH taşıyıcı protein grubunu içerir.

1.2.3 ABCB alt ailesi

(*ABCB* /*MDR* /*PGP* (Multidrug Resistance Homologları) / (permeability glycoprotein / P-glycoprotein) alt ailesi bitkilerde, ABC taşıyıcıları içerisinde ikinci en büyük alt aileyi ve en büyük tam-molekül (full transporter) alt ailesini oluşturmaktadır. *Arabidopsis thaliana* genomunda 22 ve *Oryza sativa* genomunda 24 adet temsil edilmektedir (Garcia et al., 2004). İnsan kanser hücrelerinde fazlaca ifade edildiğinde kanser ilaçlarına karşı hücreyi koruyarak ilaç direnci oluşturduğundan dolayı bu isim verilmiştir.

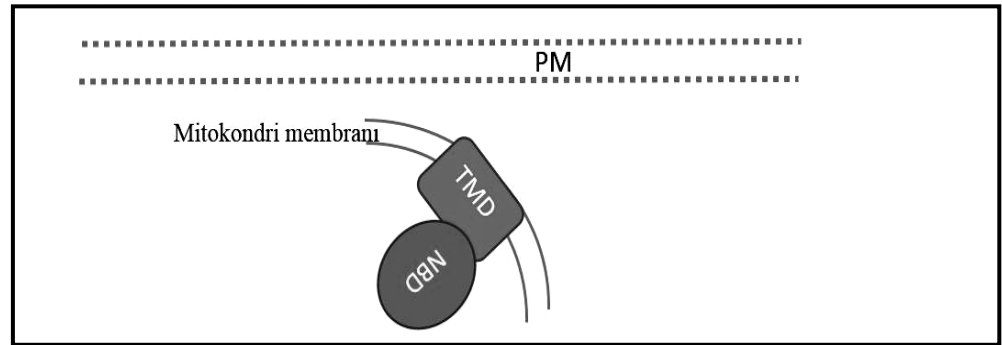
TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 yapısına sahip MDR alt ailesi, ileri yönlü ve yaklaşık 1200 amino asit uzunluğunda olan proteinleri içerir. Memeli analoglarında olduğu gibi bitkilerde de *MDR* alt ailesinin bireylerinin ilaç taşımada görev aldığı düşünülmüş ancak, metabolik olarak değişik roller aldığı kanıtlanmıştır. *Coptis japonica*'da yapılan çalışmalarda *CjMDR1* proteininin "berberin" taşımada rol aldığı ve bir ökaryotik ABC taşıyıcısının içeri yönlü taşımam yaptığı belirtilmiştir.

Arabidopsis thaliana'da herbisit direncinde görev aldığı düşünülen *AtABCB1*'in aslında apikal meristemde oksin taşınımında görev aldığı görülmüştür (Dudler and Hertig, 1992).



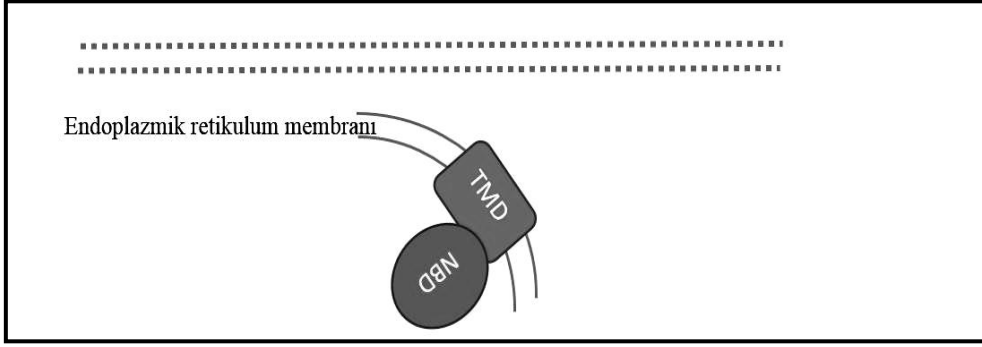
Şekil 1.5 ABCB Alt Ailesinin Topolojisi; *ABCB* alt ailesi hücre membranı üzerinde yer alan tam-molekül (full transporter) ve ileri yönlü proteinleri içermektedir.

İleri yönlü yarım molekül taşıyıcıları olan *ABCB/ATM* (ABC transporter of mitochondria)/(mitochondrial transporters) protein ailesi mitokondri membranı üzerinde görev yaparlar. Demir atılımında, *Arabidopsis thaliana* genomunda 3 tane ve *Oryza sativa* genomunda bulunan 1 tane ATM rol almaktadır (Theodoulou, 2000; Rea et al., 2003; Garcia et al., 2004).



Şekil 1.6 ABCB/ATM Alt Ailesinin Topolojisi; *ABCB* alt ailesine ait, ileri yönlü yarım molekül ATM taşıyıcıları mitokondri membranı üzerinde yer alırlar.

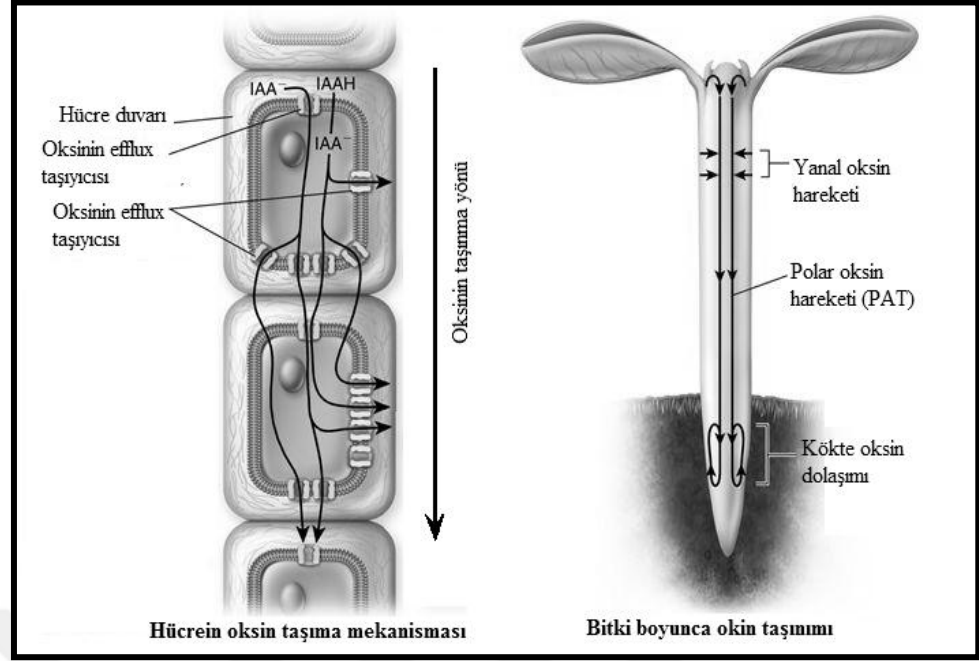
Bir diğer ileri yönlü yarım molekül taşıyıcısı *ABCB/TAP* (Transporter Associated with antigen Processing) (Antijen Üretimi ile ilgili Taşıyıcıların Homologları) alt ailesidir. *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarında 3'er adet birey bulunduran TAP, endoplazmik retikulum zarından antijenik peptitlerin salgılanmasından sorumludur (Theodoulou, 2000; Rea et al., 2003; Garcia et al., 2004).



Şekil 1.7 ABCB/TAP Alt Ailesinin Topolojisi; TAP proteinleri ABCB alt ailesine ait ileri yönlü yarım molekül taşıyıcılardır.

1.2.3.1 Oksin taşınımı

Oksin (indol-3-asetik asit; IAA) bitki gelişiminin düzenlenmesinde önemli bir sinyal moleküldür. Oksin işlevselliği, bitkide sentezlendiği dokular içerisinde maximum konsantrasyonda olmasına ya da hücreler arasındaki dağılımının farklı olmasına bağlıdır. Oksin dağılımının farklı olması, biyosentezi ve inaktif formdan aktif forma dönüşümü ve hücreler arasındaki taşınımına bağlıdır. Bitki dokularında Polar oksin taşınımı (PAT) özel olarak düzenlenmiştir ve bitki dokularında bulunan diğer herhangi bir sinyal molekülü için buna benzer bir yapı tespit edilmemiştir. *Arabidopsis thaliana* model bitki sisteminde moleküler biyolojik ve genetik yöntemler, oksin taşınımının aydınlatılmasına önemli katkılarda bulunmuştur. Oksinin hücreler arası, uzun veya kısa mesafelerde taşınımı pasif ve aktif olarak, gerçekleşir. Bitki gelişimi sırasında, oksinin aktif bir şekilde hücreden hücreye taşınmasının, plazma membranında bulunan içeri (influx) ve dışarı (efflux) yönlü taşıyıcılar ile gerçekleştiği görülmektedir.

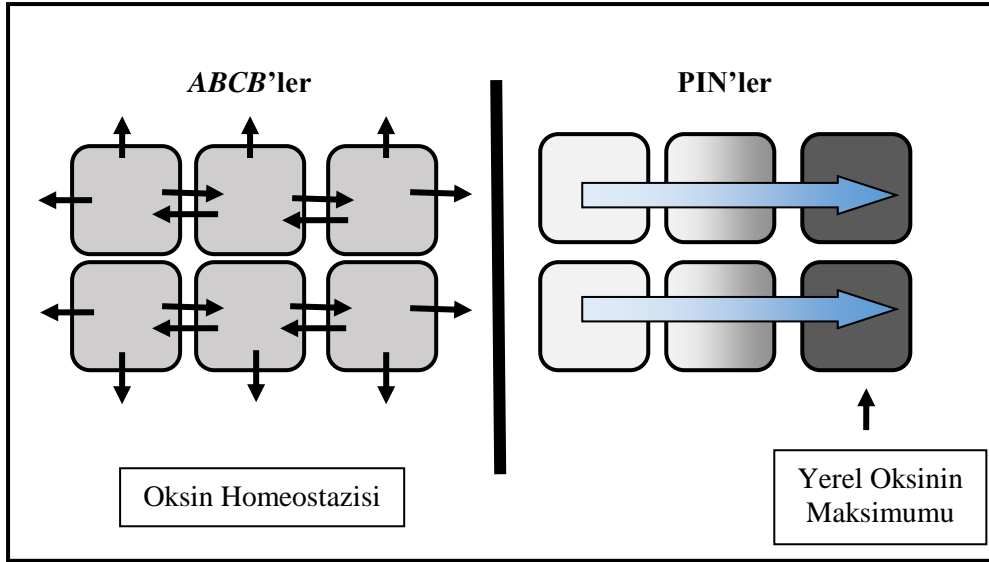


Şekil 1.8 Hücreler arası Oksinin taşınımı: Oksinin hücreler arası, uzun veya kısa mesafelerde taşınımı pasif ve aktif olarak gerçekleşir.

1.2.3.1.1 ABCB proteinlerinin oksin taşınımındaki rolü

ABCB proteinleri ABC proteinlerinin ikinci alt ailesi olup bitkilerde önemli gelişimsel işlevler dahil, bir çok fizyolojik olayların kontrolünde görev alırlar. Oksin, bitkinin büyüme ve gelişmesini düzenleyen, çevresel sinyallere cevap veren önemli hormonlardandır. indol-3-asetik asit (IAA) bitkilerde en çok bulunan oksinin doğal formu olup, birçok fizyolojik olayda yer alan bir fitohormondur. Embriyojenez, hücre bölünmesi, hücre uzaması, yanal kök gelişimi, apikal meristem hakimiyeti, gravitropizm, fototropizm ve diğer gelişimsel ve fizyolojik olayda rol oynar (Benjamin and Scheres, 2008).

Oksin yaprak primordiasında ve genç yapraklarda sentezlendiğinden, diğer organlara taşınmalıdır. Bitkide oksin formunun programlanması sürgünden gelen oksinin kök ucuna polar taşınması ve kök ucunun yeniden yönlendirilmesi için gereklidir. Bu işlemler çok sayıda genin kontrolü altındadır. Oksin gradienti, doğrudan oksin taşınımında etkili olur ve oksinin biyolojik işlevleri için çok önemlidir.



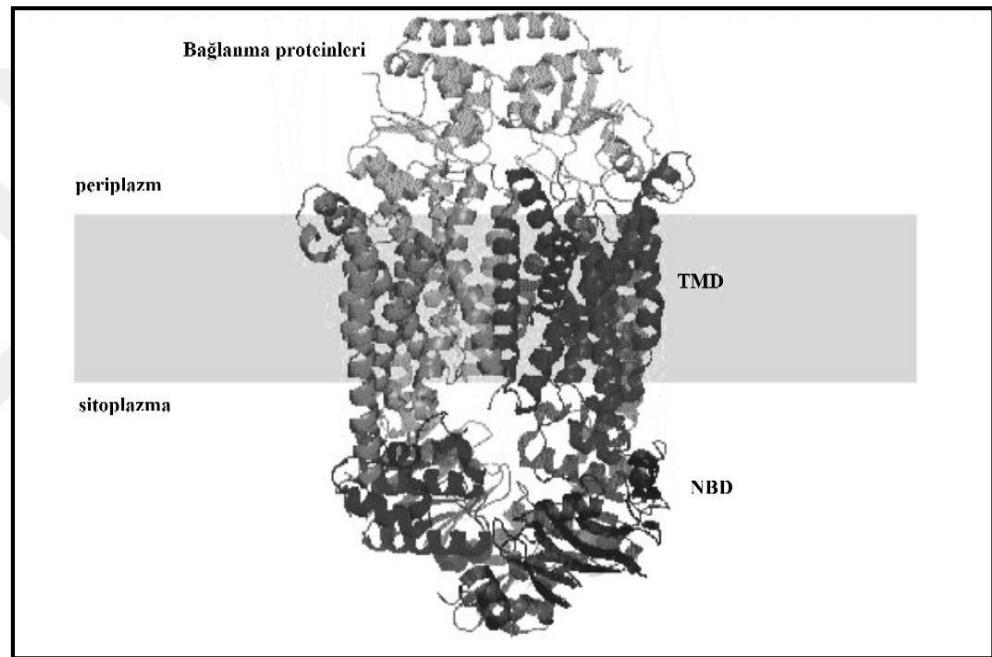
Şekil 1.9 ABCB ve PIN proteinlerinin oksin taşınımındaki rolleri: ABCB proteinleri ve PIN proteinlerinin oksin taşınımında görevleri farklıdır. ABCB proteinleri hücre membranında simetrik olarak lokalize olurlar ve temel oksin taşıyıcıları olarak işlev görürler. Ayrıca hücresel oksin homeostazisini de düzenlerler. PIN proteinleri ise asimetrik olarak lokalize olmalarından dolayı gelişimsel ve çevresel nedenlerle doğrudan oksin taşınımına aracılık ederler.

Dokular arasında doğrudan oksin taşınımı ve oksin gradientinin oluşması, farklı oksin taşıyıcılarının iş birliği ile gerçekleşmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda üç tip oksin taşıyıcısı saptanmıştır; AUXIN RESİSTANT 1 / LIKE AUX1s (AUX1/LAXs); Oksin içeriye (influx) taşınımında rol oynarken, PIN ve ABCB/MDR/PGP proteinleri; Oksin çıkışında (efflux) rol oynarlar (Zazimalova et al., 2010; Petrasek et al., 2009). PIN ve ABCB aileleri esas olarak “efflux” proteinlerini kodlarken, AUX / LAX ailesi ise influx proteinlerini kodlarlar.

İlk belirlenen PIN PINFORMED1 (PIN1) genidir (Goto et al., 1987, Okada et al., 1991). PINFORMED (PIN) protein ailesi bitki hücrelerinin zarında yer alarak sekonder taşıyıcı olarak işlev yaptıkları düşünülmektedir. PIN proteinlerine ilave olarak, AUXIN RESİSTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1 / LAX) ve ABCB proteinleri de oksin taşınım mekanizmasında görev almaktadır.

ABCB alt ailesinin en az 5 üyesinin oksin veya oksin türevlerinin hücresel taşınımında aracılık ettiği rapor edilmiştir (Cho M, and Cho H., 2013). Bu genlerin tekil mutant fenotipleri PIN (PIN-FORMED) mutantları kadar oksin

taşıyımında rol almaya da, bazı doku larda oksinin doğrudan taşınmasına belli ölçüde katkı sağlarlar. Bunlar arasından *ABCB1*, *ABCB4* ve *ABCB19* iyi bir oksin taşıyıcıları olarak karakterize edilmiştir (Titapiwatanakun B, Murphy AS., 2009). Ancak son çalışmalarda *ABCB14* ve *ABCB15* gibi diğer *ABCB* proteinlerinin de polar oksin taşınımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kaneda M, et al., 2011). Bu bulgular daha farklı *ABCB* proteinlerinin de oksin taşınımına dahil olabileceğini göstermektedir. Diğer taraftan, *ABCB4*, *ABCB14* ve *ABCB19* proteinlerinin oksin taşınımı dışında fonksiyonel aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar, *ABCB* proteinlerinin çeşitli moleküler fonksiyonlarının olduğunu gösterir.



Şekil 1.10 ABCB Proteinlerinin Genel Yapısı: *ABCB* proteinleri hücre membranında simetrik olarak lokalize olur ve oksin homeostazını düzenlerler.

Oksinin dışarı taşınım mekanizmasında görev alan PIN ve *ABCB* proteinleri arasında olan etkileşim, oksin taşınımının düzenlenmesini sağlar. Bu proteinler bağımsız olarak oksin taşınımına aracılık ederler. PIN1 ve *AtABCB19* bir kompleks oluşturduğunda, sinerjik bir etki gösterir (Blakeslee et al., 2007, Rojas-Pierce et al., 2007). Bununla birlikte, PIN2 ve *AtABCB1* veya *AtABCB19* arasında olan bir etkileşim oksin taşınımına engel olmuştur (Blakeslee et al., 2007, Rojas-Pierce et al., 2007).

Oksin, bitkilerde uzun mesafelere taşınma floem içinde konjuge biçimde ve kısa mesafelere ise polar oksin taşınma (PAT) yoluyla iki şekilde taşınır. PAT, hücre içi aktif bir taşıma türü olup plazma membranında olan üç farklı protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, *ABCB* proteinlerinin “efflux” taşıyıcı olarak işlevi olduğu belirtilmiş fakat *ABCB* mutant fenotipleri *ABCB* proteinlerinin doku oluşumu, hücre gelişmesi ve hücre bölünmesi gibi olayların düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Cho M, and Cho H., 2013).

PIN protein ailesinin alt grupları oksin taşınımının yanı sıra fonksiyonel benzerlik taşırlar. Ancak *ABCB* proteinlerinin yalnız bir alt grubu oksin taşınımındaki rolü belirtilmiş ve bu oksin taşıyan *AtABCB* proteinlerinin aynı filogenetik dala ait olmadığı kanıtlanmıştır.(Noh and ark., 2001).

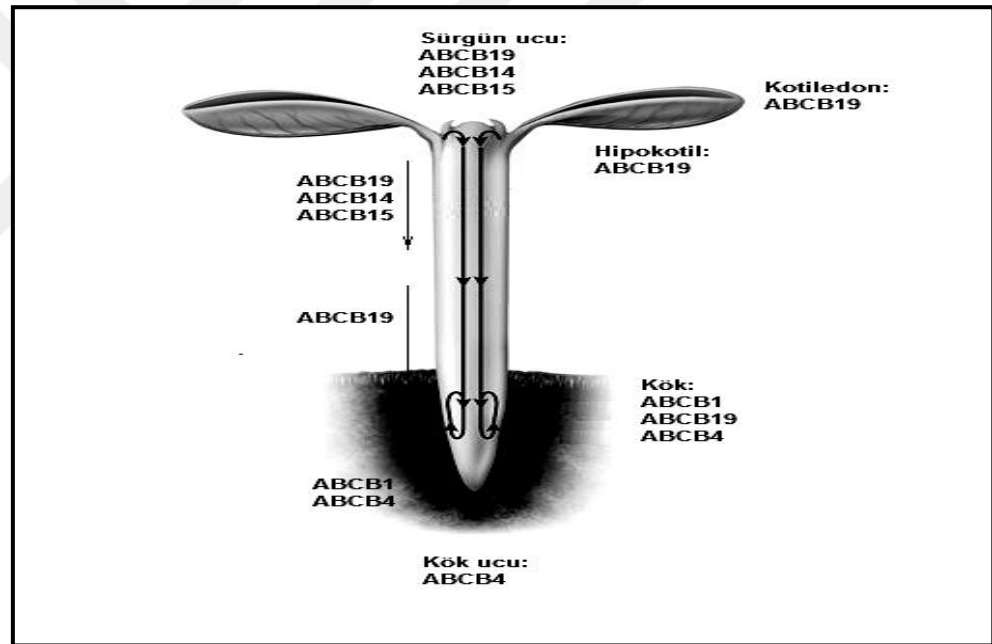
AtABCB genlerinin tekli mutanları genellikle PIN mutantlarına göre daha hafif fenotipler göstermektedirler. *MDR1* mutantları kotiledonlarda, ilk gerçek yapraklarda, hipokotil ve köklerde “epinasti” göstermektedirler (Noh et al., 2001).

AtABCB4 mutantları yabani tiplerinden farklı olarak daha uzun saçak köklere sahiptirler. *AtABCB14* mutantları çiçek saplarının vasküler gelişimleri yetersizdir (Kaneda M, et al., 2011). *AtABCB1* ve *AtABCB19*'nin çift mutantlarını taşıyan bitkiler cüceleşme göstermişlerdir (Noh et al. 2001). *Arabidopsis* saçak köklerinde saçak köklerine özgü *At-ABCB* genlerinin aşırı ifadesinin saçak köklerinin büyümesinde azalmalara neden olduğu gösterilmiştir (Lee SH, Cho H-T., 2009). PIN genlerinin aşırı ifadesine bakıldığında ise bitkilerde saçak köklerin büyümesinin engellenmesine (PIN5 hariç) büyük etkisi olduğu görülmüştür (Cho M, et al., 2007; Ganguly et al., 2010). Bu çalışmalarda, oksinin saçak köklerin büyümesinin düzenlemesi üzerine olumlu etkisi olduğu ve *ABCB1*, *ABCB4* ve *ABCB19*'un oksinin dışarı taşınmasında PIN proteinlerinden daha az etkili olduğu gösterilmiştir (Cho M, et al., 2007; Ganguly et al., 2010).

Saçak kök hücrelerinin oksinin dışarı taşınımında nispeten daha az etkili olmalarına rağmen, *At-ABCB* genlerinin tekli mutantlarında oksin taşınımının oldukça fazla etkilendiği anlaşılmıştır. *ABCB19* kök merkezi ve vasküler

dokularda lokalize olmaktadır (Zazimalova et al., 2010). *ABCB19* proteininin sürgün ve kök uçlarında apikal dokularda lokalize olması, oksinin basipetal akışının sağlanmasında rol oynadığını göstermektedir (Zazimalova et al., 2010). Ayrıca *ABCB14* ve *ABCB15*, çiçek sapının vasküler dokularında lokalize olarak bu dokularda polar oksin taşınımını etkilemektedirler (Kaneda M, et al., 2011). Bunun yanı sıra, *ABCB1* ve *ABCB4* sürgün ucunda oksin taşınımını kolaylaştırmaktadır.

ABCB1, kök apikal bölgesinde, kök korteks hücrelerinde ve epidermisinde ifade olur. Kök ucundan sürgün ucuna oksin akışının sağlanmasında görev alır (Geisler et al., 2005). *ABCB4* kök epidermisinde ifade olur ve sürgün ucuna oksin taşınımına aracılık eder (Lewis et al., 2007).



Şekil 1.11 *ABCB* Proteinlerinin Polar Oksin Taşınımı

ABCB19 tekli ve *ABCB1- ABCB19* da gerçekleşen ikili mutasyonlarının kök ucundaki oksin taşınımının azalmasına, PIN1 mutasyonundan daha büyük etkisinin olduğu görülmüştür (Blakeslee et al., 2007). *ABCB19* gibi diğer *ABCB* proteinlerinin de PIN proteinlerinin hücre içi ile iletişim kurmasına ve/veya hücre içi dağılımında önemli bir rollerinin yanı sıra hücre membranı içine sterollerin taşınımında da rol aldıkları düşünülmektedir. Bu konuda mayada yapılan

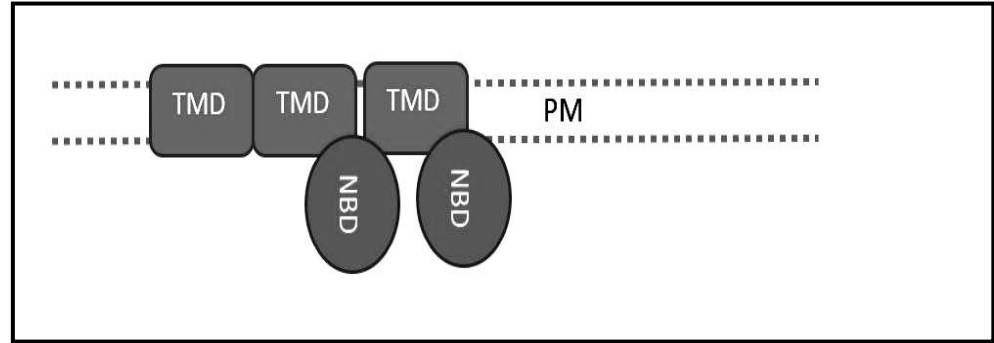
çalışmalarda, ABC proteinlerinin ER (endoplazmik retikulum)'den hücre membranına sterolün taşınımını gerçekleştirdiği kanıtlanmıştır (Li Y, Prinz WA., 2004; Cabrito et al., 2011). *ABCB1*, *ABCB4* ve *ABCB19*'un insan *MDR*'leri ile yapısal benzerliğe sahip olduğu ve bunun oksin taşınmasını kolaylaştırdığı, ayrıca, *ABCB14* ve *ABCB15*'in de oksin taşınımını sağladığı bilinmektedir.

1.2.4 ABCC alt ailesi

ABCC/MRP (Multidrug Resistance Proteins) alt ailesi de büyük tam moleköl taşıyıcılarını içerir. MRP alt ailesi ileri yönlü proteinleri içermesi ile *MDR* alt ailesine benzerlik gösterir. Ortalama olarak 1500 (*MDR*'den daha fazla sayıda) amino asitten meydana gelirler. Yapısında bulunan üç değişik ekstra protein domaini bulunur. Bunlardan birincisi; TMD domeyni (TMD0) ve ucunda yaklaşık 200 amino asitlik bir bölge vardır. Taşınacak maddelerin doğru olarak hedeflenmesi ve kanal yapısı içerisindeki hareketinin sağlanmasında TMD0 domeyninin rol aldığı gösterilmiştir. Linker -L- domeyni (bağlayıcı), birinci NBD domeyninden (NBD1) sonra bulunur. C ucundaki ilave uzamalar ise üçüncü yapı olarak bilinir (TMD0-TMD1-NBD1-L-NBD2-TMD2-C) (Theodoulou, 2000; Rea et al., 2003; Schulz and Kolukisaoglu, 2006; Rea, 2007). Sistik fibrozis hastalığına; bu alt ailede yer alan ve insanda Cl^- iyon kanalı olarak görev yapan ABCC7 (CFTR/ Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) proteininin geçirdiği nokta mutasyon sebep olmaktadır (Gadsby et al., 2006).

İlgili maddelerin taşıma işinde görev almalarının yanı sıra ABCC/MRP alt ailesinde bulunan proteinler, diğer taşıyıcıların fonksiyonlarına da yardımcı olurlar. Memeli analoglarında olduğu gibi glutatyon konjugatlarının taşınmasında görev alan bu proteinler bitkilerde MRP alt ailesinde bulunur. *Arabidopsis thaliana*'da tonoplast üzerinde lokalize olan AtABCC1 ve AtABCC2 proteinleri ksenobiyotiklerin vakuol içerisinde depolanmasını sağlarlar (Geisler et al., 2005). Ayrıca AtABCC2'nin yaprak yaşlanması sırasında endojen kaynaklı toksinlerin depolanmasında görev yaptığı gözlemlenmiştir (Liu et al., 2001). *Arabidopsis thaliana*'da AtABCC4 ve AtABCC5 proteinlerinin stomalarda bekçi hücrelerinin zarında lokalize olarak stomaların fizyolojisinin kontrolünde rol oynarlar. Ayrıca

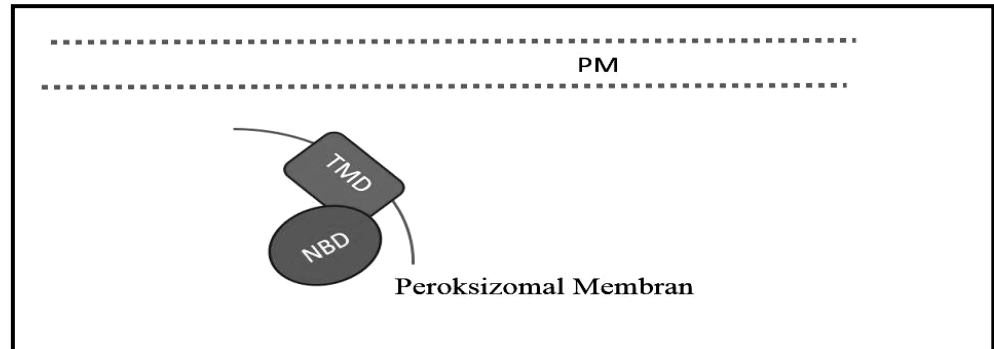
bu genlerin söndürülmesiyle yapılan deneylerde bitkinin kuraklığa direncinin azaldığı belirtilmiştir (Gaedeke et al. 2001).



Şekil 1.12 ABCC/MRP Alt Ailesinin Topolojisi: ABCC/MRP ailesi ileri yönlü büyük tam molekül proteinleri içermektedir. Yapısal olarak üç değişik ekstra protein domeynini içerir (TMD0-TMD1-NBD1-L-NBD2-TMD2-C).

1.2.5 ABCD alt ailesi

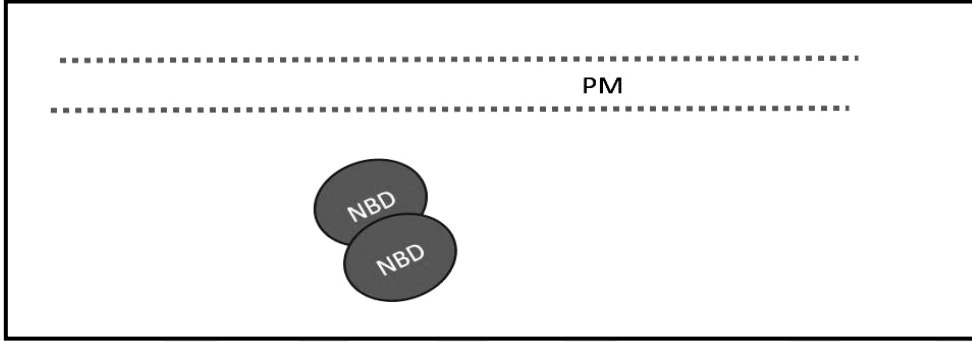
Peroxisom zarında bulunan ABCD/PMP (Peroxisomal Membrane Protein) proteinleri, yağ asitlerinin ve Acetyl-CoA'nın taşınımında görev alırlar. ABCD alt ailesi *Oryza sativa*'da 2 tam molekül ve 1 yarım molekül, *Arabidopsis thaliana*'da 1 yarım molekül ve 1 tam molekül ile temsil edilmektedir. İleri yönlü tam molekül bir taşıyıcı olan AtABCD1 tonoplastta yer alır (Theodoulou, 2000; Rea et al., 2003; Garcia et al., 2004; Yazaki et al., 2009).



Şekil 1.13 ABCD/PMP Alt Ailesinin Topolojisi: ABCD/PMP peroksisom zarında lokalize olan tam ve yarım molekül proteinleri içerir.

1.2.6 ABCE alt ailesi

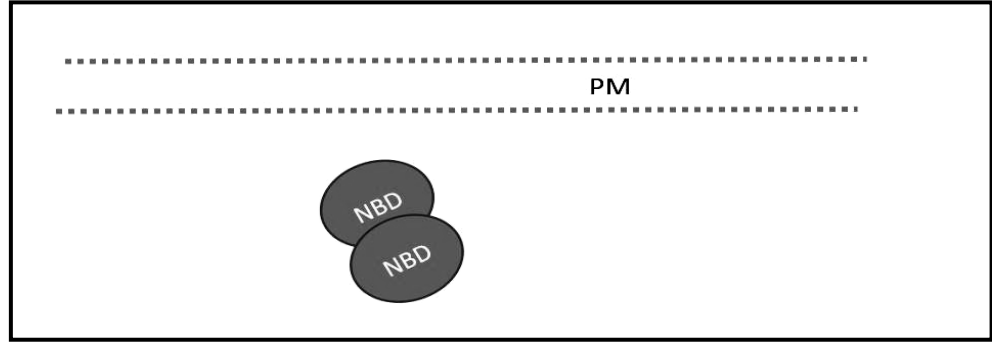
Taşıma işinde görev yapmayan, çözünür durumda olup zar da bulunmayan ve TMD bulundurmeyen diğer bir alt ailedir. ABCE/RLI (RNaz-L İnhibitör) 2 NBD'nin füzyonu ile oluşur. RLI sadece ökarya ve arkealarda görülmektedir. *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarında ikişer adet RLI geni bulunur. Genel olarak RNA interferans ve RNA susturulmasında bu alt ailenin bireylerinin görev aldığı düşünülmektedir. *Arabidopsis thaliana* da AtABCE2'nin hemen hemen tüm dokularda ifade olduğu ve görev aldığı gösterilmiştir (Sarmiento et al. 2006).



Şekil 1.14 ABCE/RLI Alt Ailesinin Topolojisi: ABCE/RLI proteinleri, çözünür durumda ve taşıma işinde görev almazlar. Yapısal olarak sadece 2 NBD'den oluşurlar.

1.2.7 ABCF alt ailesi

ABCF/GCN (General Control Non-repressible proteins) (Maya GCN-20 Homologları) alt ailesi proteinleri insanda enfeksiyon sonrası protein sentezinin artırılmasında görev alırlar. *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarında 5'er adet GCN mevcuttur. AtABCF1, AtABCF4 ve AtABCF5'in yaprak ve kökte, AtABCF'nin ise kök, polen ve anterlerde yüksek derecede ifade olduğu gösterilmiş fakat fizyolojik görevleri ise henüz kanıtlanmamıştır (Yazaki et al., 2009).

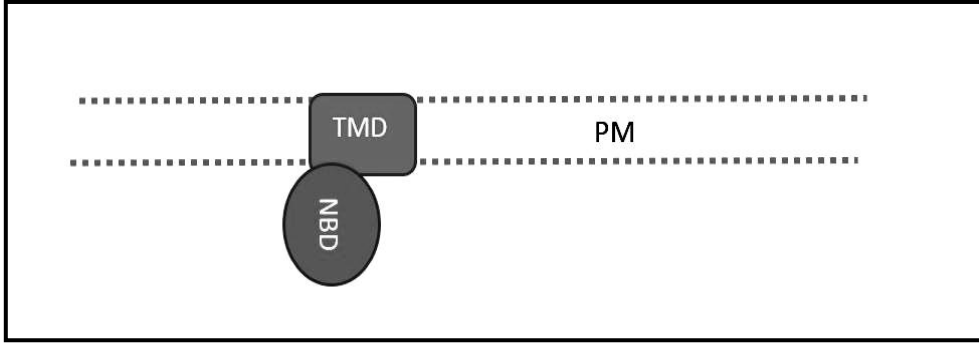


Şekil 1.15 ABCF/GCN Alt Ailesinin Topolojisi: ABCF/GCN proteinleri çözünür şekilde bulunurlar ve sadece 2 NBD'den meydana gelirler.

1.2.8 ABCG alt ailesi

ABCG/WBC (White-Brown Complex) alt ailesi, *Arabidopsis thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarında sırasıyla 29 ve 30 adet üye ile temsil edilirler (Sanchez-Fernandez et al., 2001; Garcia et al. 2004). WBC ökaryotik sınıflandırmada ters yönelime sahip (NBD-TMD) ve yarım molekül yapısında olan ABCG alt ailesi içerisinde bulunmaktadır. ABCG alt ailesi bitki ABC taşıyıcı protein ailesinin en büyük alt ailesini oluşturur.

WBC alt ailesi *Drosophila*'da renk pigmentlerinin taşıyıcısı olarak tanımlandığı için bu şekilde nitelendirilmiştir. ABCG alt ailesi, İnsanda fosfolipit ve kolesterol taşınımında bitkilerde ise insandaki homologları ile benzer görevler yapmaktadır AtABCG11 ve AtABCG12'nin *Arabidopsis thaliana*'da yaprak yüzeyinde bulunan kutikula tabakasına lipit taşınımında rol aldığı gösterilmiştir (Theodoulou., 2000). Ayrıca AtABCG11'in normal bitki gelişimini kontrol ettiği gösterilmiştir (Bird et al., 2007). Transgenik bitkilerde AtABCG19'un yüksek ifadesi, direnç gelişmesini sağlamıştır (Mentewab and Stewart 2005). *Gossypium hirsutum*'da GhWBC1'in çiçek ve tohumlarda ifade olduğu ve baskılandığında ise tohum sayısının azaldığı görülmüştür (Zhu et al. 2003). NtWBC1'in *Nicotina tabacum*'da ise seçici bir şekilde çiçeğin stigma ve anterlerinde ifade olduğu gösterilmiştir (Otsu et al. 2004).

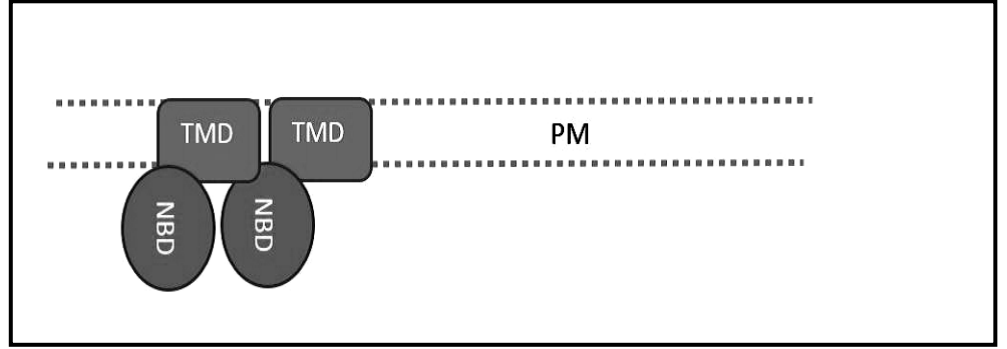


Şekil1.16 ABCG/WBC Alt Ailesinin Topolojisi: ABCG/WBC yarım molekül yapısında olan ters yönlü (NBD-TMD) bir protein ailesidir ve lipit taşınımında görev alır.

ABCG alt ailesi içinde değerlendirilen PDR (Pleiotropic Drug Resistance) proteinleri ise tam molekül proteinlerdir. Şuan için bitkiler ve mayalar dışında diğer organizmalarda örnekleri mevcut değildir. PDR proteinleri ters yönlü ortalama 1500 amino asit büyüklüğündedir (NBD1-TMD1-NBD2-TMD2). *Oryza sativa* ve *Arabidopsis thaliana* genomlarında sırasıyla 23 ve 15 adet PDR geni mevcuttur. Gen duplikasyonu ile PDR'nin evrimsel olarak WBC (White Brown Complex Homologları) alt ailesinden oluştuğu düşünülmektedir. SpTUR2 *Spirodella polyrhiza*'da karakterize edilen ilk PDR'dir. Bu proteinin abiyotik strese yanıt olarak absisik asit (ABA) ve soğuk ile kontrol edildiği gözlemlenmiştir (Smart and Fleming 1996). OsPDR9 *Oryza sativa*'da, abiyotik strese cevap veren diğer bir proteindir. Köklerde ozmotik ve tuz stresleri ile bu proteinlerin ifadesinin kontrol edildiği gözlemlenmiştir (Moons 2003). *Arabidopsis thaliana*'da kurşun stresinde AtABCG40 nin ifadesinin arttığı ve rekombinant olarak sentezlendiği bitkilerde yüksek kurşun direnci geliştiği gözlemlenmiştir (Lee et al. 2005). Demir yoksunluğunda *Nicotina tabacum*'da NtPDR3'ün ifadesinin arttığı ve bu proteinin demir alımında görevli olası bir taşıyıcı olduğu düşünülmektedir (Ducos et al. 2005; Yazaki et al., 2009).

Öte yandan PDR proteinlerinin biyotik strese karşı, bitki savunmasında da rol aldığı gösterilmiştir. *Nicotina plumbaginifolia*'da ifade olan NpPDR1'in sclareol taşınımında rol aldığı gösterilmiştir (Stukkens et al. 2005). Ayrıca PDR alt ailesinden AtPDR12, OsPDR9 ve NpPDR1'in salisilik asit ve etilene verdiği ve hormonlar ile kontrol edildiği gözlenmiştir. AtPDR12'nin patojen direncinde

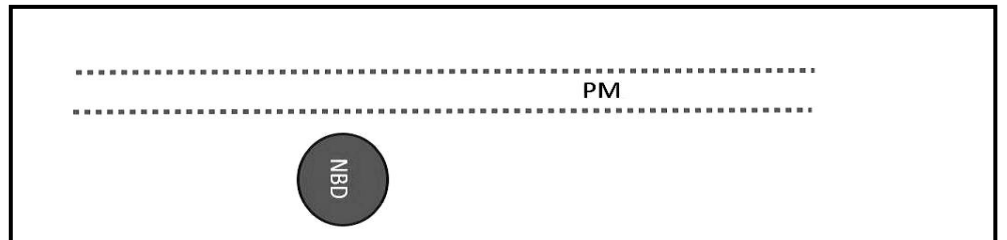
görev aldığı, fungus varlığında ifadesinin yüksek oranda arttığı gösterilmiştir (Yazaki et al., 2009).



Şekil 1.17 ABCG/PDR Alt Ailesinin Topolojisi: ABCG/PDR proteinleri ters yönlü ve tam molekül yapıdadır.

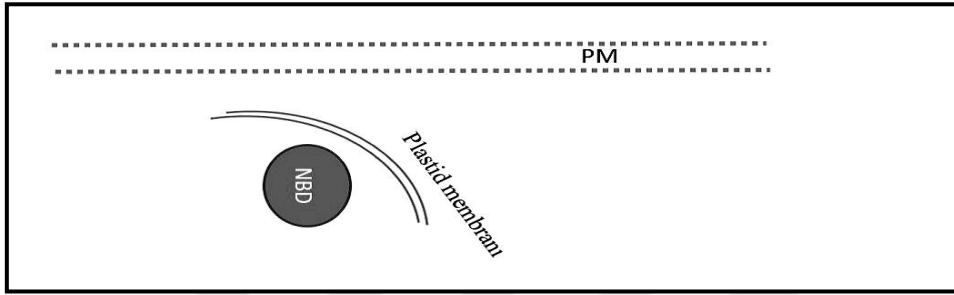
1.2.9 ABCI alt ailesi

ABCI/SMC (Structural maintenance of chromosomes) (Kromozom Yapısal Onarım Homologları) ise son çözünür ABC protein alt ailesini oluşturur. Yapısındaki NBD'nin parçalanmış şekilde bulunmasından dolayı ve iki "Walker" dizisi arasında ABC imzası taşımadığı için ABC proteinleri içerisinde tam protein olarak tanımlanmaz. DNA hasarı, tamiri ve kromozomun yapısal kontrolünde rol alır. *Arabidopsis thaliana* genomu 3 tane SMC içerir ve bu proteinlerin fonksiyonları henüz aydınlatılmamıştır (Sanchez-Fernandez et al. 2001; Rea et al. 2003; Rea 2007; Verrier et al. 2008).



Şekil 1.18 ABCI/SMC Alt Ailesinin Topolojisi: ABCI/SMC proteinleri çözünür şekilde bulunur. DNA hasarı ve kromozom yapısal kontrolünde rol almaktır.

Sadece bir tane NBD taşıyan ABCI/NAP (Non-intrinsic ABC Protein) proteinleri kendi aralarında ve diğer alt üyeler ile hiçbir benzerlik bulundurmazlar. Bu alt ailede farklı görevler alabilen proteinler bulunmaktadır. Plastitlere lokalize olan ABC taşıyıcı proteini AtABC18, plastidlerde tanımlanmayan bir TMD ile kanal oluşturarak klorofil öncülü protoporfirin IX'un kloroplast zarından stromalara taşınımından görevli olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin iç zarında lokalize olan AtABC11 ise, sitokrom-c olgunlaşmasında homoloğu olan AtABC12 ile etkileşir (Xu and Möller 2004; Yazaki et al. 2009).

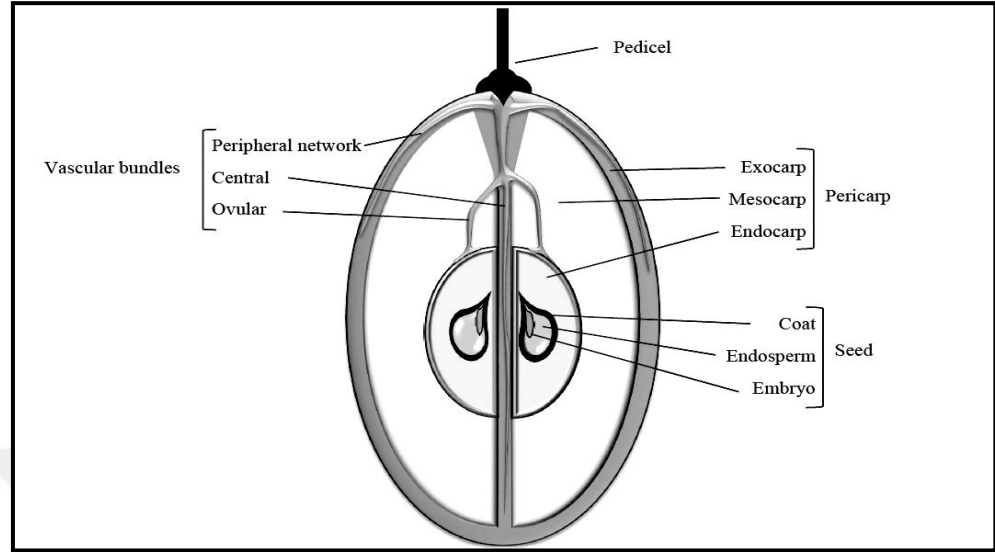


Şekil 1.19 ABCI/NAP Alt Ailesinin Topolojisi: ABCI/NAP proteinleri bir adet NBD taşır ve farklı görevler almaktadırlar.

1.2.10 Asma (*Vitis vinifera* L.)

Vitis vinifera L. hem yetiştiricilik açısından hem de ekonomik açıdan dünyada en önemli bitki türlerinden biridir (Vivier and Pretorius, 2002). Üzüm taneleri, taze meyve veya şarap, meyve suyu, şeklinde de tüketilebilir. Üzüm taneleri fenolik bileşikler bakımından oldukça zengindir (Fraige, Pereira-Filho, and Carrilho, 2014). Bu bileşikler, şarap rengi, oksidasyon reaksiyonları, proteinler ile etkileşime girmeleri nedeniyle üzüm ve şarabın temel kalite faktörlerindedir (Figueiredo-Gonzalez, Martinez-Carballo, et al., 2012). Buna ek olarak, polifenollerin insan sağlığı üzerinde, anti iltihap, antimikrobiyal, yaşlanmaya karşıtı (anti-aging) ve kardiyovasküler hastalıklara karşı çeşitli etkilerinin olduğu da bilinmektedir (Ivanova et al., 2011). Polifenolik bileşikler esas olarak üzüm tanelerinin kabuk ve tohumlarında mevcuttur (Gómez Gallego et al., 2011; Liang, Owens, Zhong, and Cheng, 2011). Bitki sekonder metabolitlerinin membrandan taşınımı yeni gelişen bir araştırma alanıdır (Yazaki, K. 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda (ABC) ATP-bağlayıcı kaset

taşıyıcılarının bazı bitki sistemlerinde bu taşınım mekanizmasında yer aldığı görülmüştür.

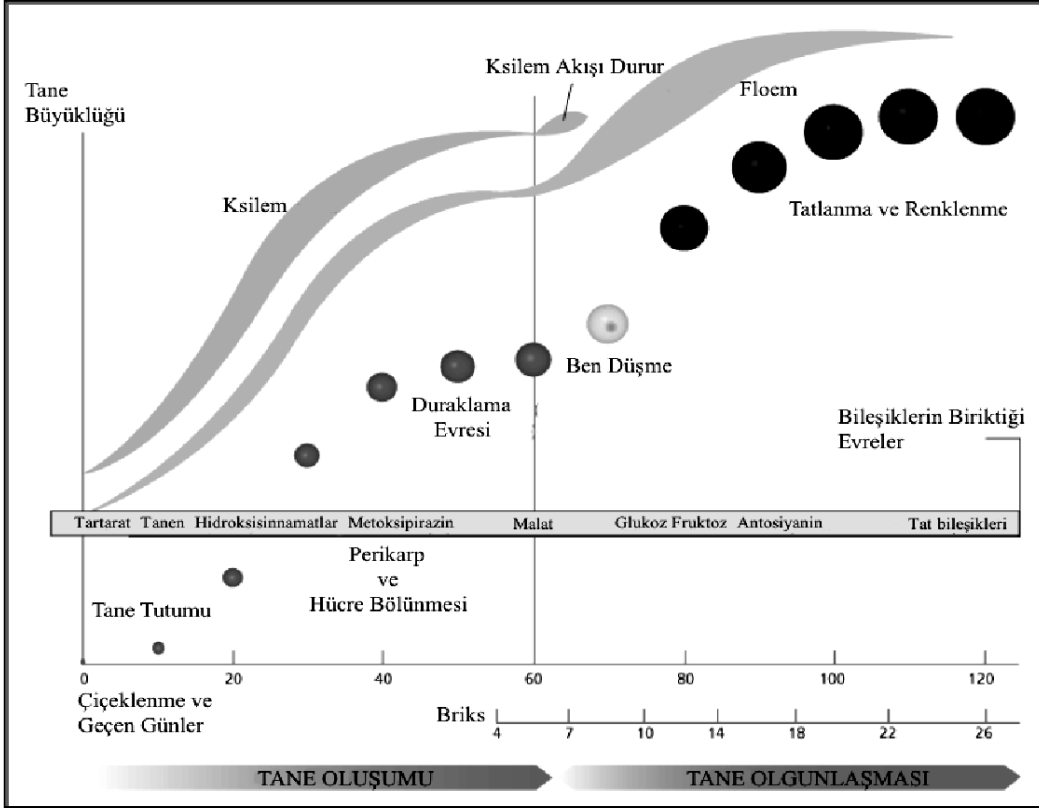


Şekil 1.20 Üzüm Tane Morfolojisi: Üzüm tanesinin kısımlarını; kabuk (exocarp), et (mesocarp ve endocarp), ve çekirdek oluşturur.

Çoğu metabolik işlevlerde görev alan, özellikle madde taşınmasından sorumlu olan ABC proteinlerinin fonksiyonlarının anlaşılması açısından asmanın gelişim dönemleri önemlidir. Asmada tane gelişimi üç farklı aşamada gözlemlenir (Castellarin et al., 2011) (Şekil 1.21). Birinci aşama çiçek oluşumu ve meyve tutumunun ardından iki ay süren ve hızlı tane gelişimi gözlenen evredir. Bu evrede hem hücre bölünmesi hem de hücreler içerisinde organik madde birikimine bağlı hücre büyümesi gerçekleşir. İkinci ayın sonuna doğru hücre bölünmesi yavaşlarken taneler yeşil renkte, sert bir forma bürünürler. Tane içerisinde organik madde depolanmasına rağmen şeker miktarı düşüktür (Dokoozlian, 2000).

İkinci aşama iklim şartlarına bağlı olarak çiçeklenmeden 8-10 hafta sonra yaklaşık 2-3 haftalık bir süreyi kapsayacak şekilde başlar. Bu aşamada tane gelişimi gözle görülür şekilde duraklar. Taneler yeşil renklerini kaybetmeye ve farklı çeşitlerde renk maddeleri olan antosiyaninleri biriktirmeye başladıkları dönem “ben düşme” olarak adlandırılır (Dokoozlian, 2000).

Üçüncü aşama, çiçeklenmeden 13-14 hafta sonra başlayıp, tanede yüksek miktarda şeker ve aminoasit birikimi başladığı dönemdir. Bu dönemde meyve yumuşaması da görülür. Bu aşamadaki büyüme hücre bölünmesinden çok, hücrelerin büyümesi olarak adlandırılır ve yaklaşık olarak 6-8 hafta sürer (Kennedy, 2002).



Şekil 1.21 Asmada Tane Gelişim Aşamaları: Gelişim döneminde üç aşama görülür ve 2. aşamada bir duraklama gerçekleşir. Ben düşme 3. aşamanın başladığı ve şeker miktarının artmaya başladığı dönemdir. Şekil Jordan Koutroumanidis, Winetitles tarafından.

Tezin Amacı

Bu tezde laboratuvar ekibimiz tarafından daha önceden biyoinformatik olarak belirlenmiş ABC kaset taşıyıcılarından *VvABCB/VvMDR* alt ailesine ait 19 adet genin sultani çekirdeksiz (*Vitis vinifera* L.) çeşidinde farklı tane gelişim dönemlerinde Real Time PCR tekniği ile ifade profillerinin çıkarılması hedeflenmiştir.



2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitki materyali

ABC kaset taşıyıcılarından *VvABC*/*VvMDR* ailesinin 19 geninin üzümde farklı gelişim dönemlerinde ifade değişimlerini incelemek amacıyla üzüm taneleri *Vitis vinifera* L. cv. Sultani Çekirdeksiz asma çeşidinden alınmıştır. Taneler 2 haftalık aralıklarla çiçeklenmeden (13.05.2008) aşırı olgunlaşmaya kadar (17.09.2008) olan zamanda toplanmıştır (Çizelge 2.1). Tanelerde *VvMDR* gen ailesinin ifade analizlerini gerçekleştirmek için toplandıktan sonra sıvı azot içerisine batırılıp kuru buz içerisinde taşınarak, -80 °C’de depolanmıştır.

Çizelge 2.1. Örneklerin alınma tarihleri

Alınan örnek tarihi	13.05.2008 (Çiçeklenme)	26.05.2008 (Tane tutumu)	10.06.2008	23.06.2008	09.07.2008	23.07.2008 (Ben düşme)	06.08.2008	20.08.2008	03.09.2008 (Olgunlaşma)	17.09.2008 (Aşırı olgunlaşma)
Hafta çiçeklenmeden sonra	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18

2.1.2 RNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler ve kimyasallar

RNA İzolasyon Tamponu: 1 litre RNA izolasyon tampon için 5 M Sodyum Perklorit Monohidrat ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ve 0,3 M TRIS-Base hazırlandıktan sonra 8.3 pH’a ayarlanarak otoklavlanır. Sonrasında % 1 SDS (Sodium dodecyl sulfate) eklenir, karıştırılıp ısıtılarak çözündürülür. % 2 PEG-40 (Polyethylene glycol) ve % 8,5 PVPP (Polyvinylpolypyrrolidone) eklenip karıştırılarak tampon hazırlanır.

Fenol: Kloroform: İzamil Alkol (Sigma, P2069): Bu çözelti, Genomik DNA izolasyonu gibi pH’ı yüksek olması gereken analizlerde; Equilibration Buffer (2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ile fenolik fazın pH’ı 8 civarına yükseltilmelidir (Fenolik

faz sarı ya da kahverengi ise kullanılmamalıdır). Bunun için Equilibration Buffer'ın tamamı Fenol-Kloroform-İzoamilalkol solüsyonuna katarak yavaşça karıştırılır ve minimum 2-4 saat bekletilir. Fazlar ayrıldıktan sonra ancak DNA izolasyonu için kullanılabilir. Tampon ekleme işleminden sonra ışıktan koruyarak -20°C de 1 yıl saklanabilir. Fenol-Kloroform-İzoamilalkol'ün pH'ı pH kağıtları kullanılarak ölçülebilir.

TE Tamponu (Tris-EDTA): 10 mM Tris-HCl pH 7,4 ile 1 mM EDTA, pH 8,0 eşit hacimlerde karıştırılır.

Etanol (Riedel, 071029): Farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak kullanılmıştır (% 70, % 75, % 90 ve % 100).

2.2 Yöntem

2.2.1 Vitis vinifera L. tanelerinden toplam RNA izolasyonu

1. Sıvı azot içerisinde tane örnekleri ezilerek pudra şeklinde hazırlanır.
2. Her örnekten 2 gr alınıp, 50 ml falkon tüpler içerisine konulur.
3. RNA İzolasyon Tamponundan her birine 10 ml eklenir.
 - Tampon her zaman karıştırılarak alınmalıdır çünkü içerisindeki PVPP çökerek homojenliği bozmaktadır.
4. %1 (100 µl) β-Mercaptoethanol karışıma eklenir ve 15–20 sn vortekslenir.
5. Örnekler çalkalanmalı etüvde 37 °C'de 180 rpm hızda maximum 1.5 saat süre ile karıştırılarak inkübe edilir.
6. Etüvden alınan her bir örnek 10 sn vorteks yapılır. Çözünmeyen yapıların karışımdan uzaklaştırılması için filtre ile süzülmalıdır. Bunun için 50 ml'lik enjektörün iç kısmına yerleştirilen steril pamuk ile hazırlanan kolondan yeni bir falkon tüpe süzülür .

- Pamukların her defasında steril ve kalınlığının 1-2 mm olmasına dikkat edilmelidir.

7. Süzülen örneklerin hacimlerinin 2.5 katı kadar saf etanol ilave edilerek alt-üst edilerek karıştırılır ve 20 °C’de bir gece bekletilir.

8. Ertesi gün örnekler önceden +4 °C’ye soğutulmuş santrifüjde 5000 rpm’ de 30 dk süre ile santrifüjlenir.

9. Sonrasında falkon tüpteki üst faz atılır ve pelet üzerine 2 ml %70’lik etanol ilave edilerek 5 dakika santrifüj yapılır.

10. Üst faz dökülür ve peletde alkol kalmışsa pipetle alkol alınır ve alkol uçurulması için bekletilir.

11. 1,5 ml DEPC’li dH₂O pelete eklenerek pipetle pelet çözülür ve 750 µl olacak şekilde iki ependorf tüpe bölünerek buza alınır.

12. Tüpler 30 sn süreyle ikişer defa vorteks yapılır.

13. Tüplere (750 µl) Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol (25:24:1-v/v/v) ilave edilir ve 30 sn vortekslenir.

14. Örnekler önceden +4 °C’ye soğutulmuş olan santrifüjde 10.000 rpm de 7 dk santrifüjlenir.

15. Santrifüj sonrası oluşan üç fazın en üst fazı yeni bir tüpe alınır. Sonrasında **13. aşama** tekrar edilir.

16. Üst faz yeni bir tüpe alınır ve üzerine 650 µl Kloroform:İzoamil Alkol (24:1-v/v) eklenerek 20 sn vorteks ile karıştırılır.

17. Üst faz yeni bir tüpe alınır ve üst fazın hacminin 1/10’u kadar NaOAc 3 M ilave edilir ve pipet ile iyice karıştırılır. Tüplerin ağzına kadar saf alkol ile doldurularak alt üst edilir.

18. Tüpler -80°C 'ye konularak en az 1,5 saat beklenir.
19. -80°C 'den alınan tüpler, $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuş santrifüje yerleştirilerek 10.000 rpm'de 20 dk santrifüjlenir.
20. Üst faz dökülerek ve pelet üzerine 500 μl % 70'lik etanol ilave edilip 10.000 rpmde 7 dk süreyle santrifüjlenir.
21. Üst faz dökülerek kalan alkol pelete dokunulmadan pipet ile uzaklaştırılır tüpler ağzı açık olarak 5-10 dakika kurumaya bırakılır.
22. Sonrasında 200 μl DEPC'li dH_2O eklenir, pelet pipet yardımıyla iyice çözülür ve üzerine 100 μl LiCl eklenerek iyice karıştırılır.
23. Tüpler en az 16 ve en çok 20 saat $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilir.
24. Tüpler $+4^{\circ}\text{C}$ 'den alınarak önceden $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye soğutulmuş santrifüjde 10.000 rpm'de 40 dk süreyle santrifüj edilir.
25. Üst faz dökülür ve pelet üzerine 500 μl % 70'lik etanol ilave edilerek 10.000 rpm' de 5 dk süreyle santrifüjlenir.
26. Üst faz dökülerek kalan alkol pelete dokunulmadan pipet ile uzaklaştırılır tüpler ağzı açık olarak 5-10 dakika kurumaya bırakılır.
27. Sonrasında pelet üzerine 30 μl DEPC'li dH_2O eklenerek pelet çözülür.
28. İzole edilen RNA'dan 2 μl alınarak izolasyon, % 1'lik agaroz jelde kontrol edilir.

2.2.2 Toplam RNA'ya DNase uygulanması

Jele yüklenerek miktarı ve kalitesi kontrol edilmiş toplam RNA'dan genomik DNA'yı uzaklaştırmak için DNase enzimi uygulanır. Bu uygulamada

DNase I RNase Free (Thermo) enzimi kullanılmıştır ve üreticinin protokolü izlenmiştir. Bu reaksiyon Çizelge 2.2'e göre gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 2.2. Toplam RNA'ya DNase Uygulanması

Aşama	Prosedür
1	<p>RNA 1 µg</p> <p>10 X reaction buffer with MgCl₂ 1 µL</p> <p>DNase I, RNase-free (#EN0521) 1 µL (1 u)</p> <p>Water, nuclease-free total 10 µL</p> <p>37°C 'de 30 dk inkübe edilir.</p>
2	<p>EDTA 50 mM 1 µL</p> <p>65°C'de 10 dk inkübe edilir</p>

2.2.3 cDNA sentezi

Real Time PCR'in ilk aşaması olarak, örneklere ait cDNA sentezi yapılmıştır. Toplam RNA içerisinde bulunan mRNA'lar cDNA sentezi için kullanılmıştır. Farklı gelişim dönemlerinden alınan örneklerdeki RNA'lardan 'Thermo-cDNA Synthesis Kit' kullanılarak aşağıdaki üretici protokolü izlenmiştir.

1-Jel üzerinde yürütülerek belirlenen mRNA bantlarının oranına göre 500 ng RNA kullanılacak şekilde BiO ID software programı kullanılarak her bir örnek analize alınır.

2- Reaksiyon toplam RNA ve 1 µl oligo(dT)₁₈ primeri son hacim 12 µl olacak şekilde dH₂O ile tamamlanarak hazırlanır ve 65 °C'de 5 dakika süreyle su banyosunda inkübe edilir. İnkübasyon işleminden sonra tüpler hemen buza alınır.

3- Sonrasında her bir reaksiyon için 4 µl 5X reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNase Inhibitor, 2 µl dNTP karışımı ve 1 µl RevertAid Revers Transcriptase RNA bağımlı DNA polimeraz içeren Revers transkripsiyon karışımı hazırlanır.

4- Revers transkripsiyon karışımı vorteksle iyice karıştırıldıktan ve kısa bir spin atıldıktan sonra her bir reaksiyona 8 µl eklenir.

5- Reaksiyon 42 °C'de su banyosunda 1 saat süre inkübe edilir. İnkübasyon işleminden sonra tüpler hemen buza alınır.

6- Üretilen cDNA sonraki işlemlerde kullanılmak için -20 °C'ye kaldırılır.

• Üretilen cDNA mRNA miktarının belirlenmesi için kullanılacaksa en fazla bir kez dondurulup çözündürülmelidir. Aksi takdirde içerdiği transkript miktarı değişebilir.

2.2.4 Primerler

VvMDR ailesine ait 19 birey için primer çiftleri tasarlanmıştır (Çizelge 2.3). Gen ifadelerinin tesbiti amacıyla interal kontrol olarak *VvActin* geni kullanılmıştır.

Reaksiyonda kullanılan primerler; baz sayısı (Mer) dikkate alınarak ve son konsantrasyon 10 pg/µl olacak şekilde sulandırılıp hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3. Çalışmada Kullanılan 19 *VvABC*/*VvMDR* Primerlerinin dizilimi.

Sıra	Primer adı	Primer sekansı	TM	(bp)
1	VvMDR1F	ATGGATTCAGGCTTTGGTC	58°C	20
	VvMDR1R	GCCTCCCTCCATACCAGTAA	62°C	20
2	VvMDR2F	TGGTGAGCTACTGCAAAGG	60°C	20
	VvMDR2R	GGCTCGATGTTCTACCAAT	60°C	20
3	VvMDR3F	CCTGGCAGCATCTATAAGCA	60°C	20
	VvMDR3R	CTTGAAGTTGGGAAAAGCACA	58°C	20
4	VvMDR4F	GCAAAGATGGAGCAACAGAA	58°C	20
	VvMDR4R	AGGATTGTTGGGTCCTTGAG	60°C	20
5	VvMDR5F	CGAGCTGTCCTAAAGAACCC	62°C	20
	VvMDR5R	CTGTTGTTCCGGTTCACCATC	60°C	20
6	VvMDR6F	GGAGTTGGGATTTCAGCATT	58°C	20
	VvMDR6R	TTGAAGAATCAGCACCTTGG	58°C	20
7	VvMDR7F	TGCCAAAGGCTTGTCTGTAG	60°C	20
	VvMDR7R	ACCCAAGATGAAGGAAATGC	58°C	20
8	VvMDR8F	TTGGATGGCCTATATGCTGA	58°C	20
	VvMDR8R	GGGAAGATGGTCTTGAAA	58°C	20
9	VvMDR9F	GAGGAGGCAGATAGCTTTGG	62°C	20
	VvMDR9R	CCCATGAAGCATTAGGGTTT	62°C	20
10	VvMDR10F	TTTCATTCTTGGTGTGGCAT	56°C	20
	VvMDR10R	GAACCAGCCTACCTCCATGT	62°C	20
11	VvMDR11F	GCTGCATATTGCGTATGCTT	58°C	20
	VvMDR11R	ACTGTACCAAGCCCTATGCC	62°C	20
12	VvMDR12F	CCTCACCTCATCCTCATCT	62°C	20
	VvMDR12R	ATGCAACCTTCTGCTGACTG	60°C	20
13	VvMDR13F	ATTGTTGGGATGTTGCTTGA	56°C	20
	VvMDR13R	GAACCCAGCAAGCCATAACT	60°C	20
14	VvMDR14F	GCAGCAGATGGGTCTAGTGA	62°C	20
	VvMDR14R	CAGTGGTATGGCCTTCCTTT	60°C	20
15	VvMDR15F	CTTACGGCGCATCTGATAAA	58°C	20
	VvMDR15R	CTCCTCTGTACCTCACCAC	64°C	20
16	VvMDR16F	CCTGATGGACCCAAGAGTTT	60°C	20
	VvMDR16R	GGTTGAAAGCCTGTGTGCTA	60°C	20
17	VvMDR17F	TCCACCAAGATGAGGATCAA	58°C	20
	VvMDR17R	CTCGCTAATGGCATCTTGAA	58°C	20
18	VvMDR18F	ACTCCTTCGTGGGAGAGAGA	62°C	20
	VvMDR18R	AACGCCCATATCCAAGAAC	58°C	20
19	VvMDR19F	AATGGGTCTTGTAGCTTGGG	60°C	20
	VvMDR19R	GGTTGCAGATTCAGAAGCAA	58°C	20
20	VvAct751F	GTTGCAATTCAAGCTGTGCT	60°C	20
	VvAct857R	AATTGCAATTCAAGCTTGCAT	60°C	21

2.2.5 Real Time PCR Uygulamaları

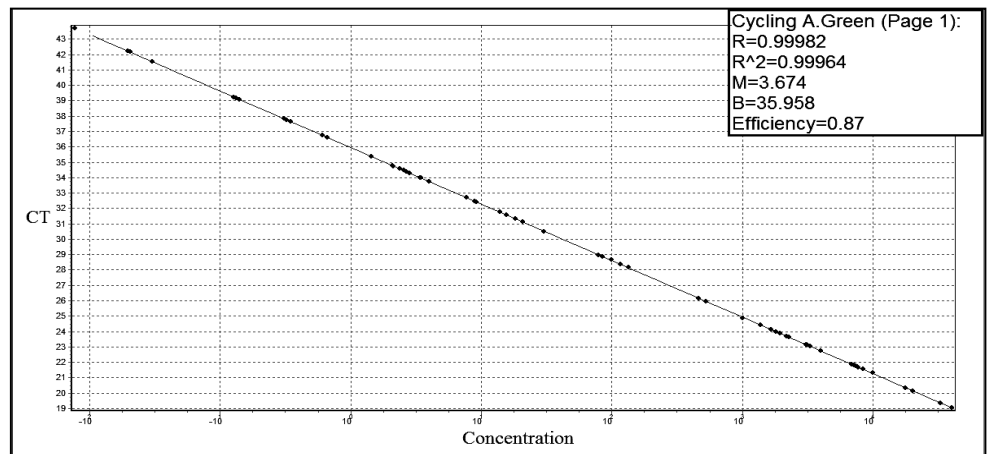
Real Time PCR uygulama reaksiyonları Rotor Gene Q Real Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir. Ege Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Denemeler ihtiyaç duyulduğunda RNA izolasyonu, Real Time PCR uygulamaları vb. yeterli sayıda tekrar edilmiştir.

2.2.6 Örneklerin Cihaza Yüklenmesi

Her bir primere ait örnekleri içeren cDNA'lar ile T.S Maxima SYBER Green qPCR Master Kit içerikleri karışımı cihaza ait 72'lik plakelere yerleştirilerek Real Time PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. RT-PCR reaksiyonu her bir gen için 3 defa tekrarlanmıştır.

Real Time Reaksiyonu için; 1µL cDNA, 12,5 µL SYBR® Green Master Mix, 2 µL Forward ve 2 µL Reverse primer ve 7,5 µL dH₂O tüplere total hacim 25 µL olacak şekilde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.

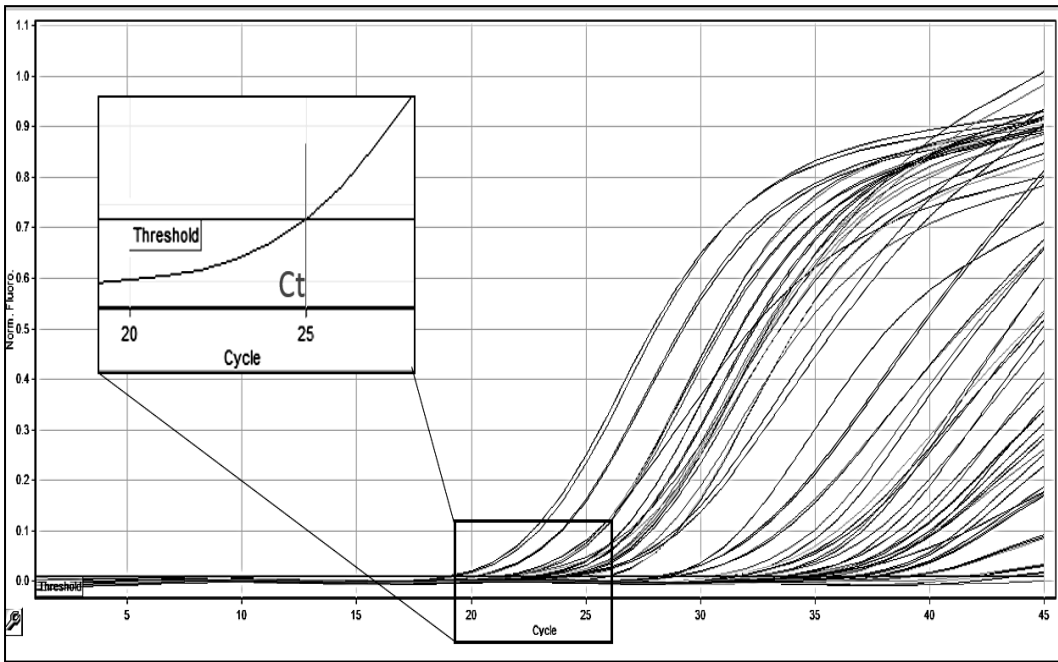
Reaksiyon ölçülerini değerlendirilmesi ve standart eğrisinin çizilebilmesi için 6 logaritmik konsantrasyon 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 ve 1:100000 oranlarında hazırlanmış ve her bir primer için ayrı standart eğrisi RT-PCR programında çizilmiştir (Şekil 2.1). İyi bir standart eğrisi için R veya R² değeri 1 veya 1e yakın ve R > 0.990 veya R² > 0.980 olmalıdır.



Şekil 2.1 Standart Eğrisi

2.2.7 Verilere Ait Analizler:

RT-PCR işlemi sonrasında, her örneğin uygulandığı primere ait pik profilleri belirlenmiştir ve bu pik profillerine göre Ct (Cycle Threshold) değerleri hesaplanmıştır. Bu Ct değerlerine dayanarak sonuçlar grafik olarak gösterilmiştir. Ct Tekrarları arasında gözlemlenen değerlerde anlamlı bir fark olursa R veya R² değerini düşürecektir. Her bir örneğe ait olan pik profili, Threshold çizgisini belirli bir yerde kesip, "Ct" değerini oluşturur. Ct değerlerine dayanarak sonuçlar grafik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.2).



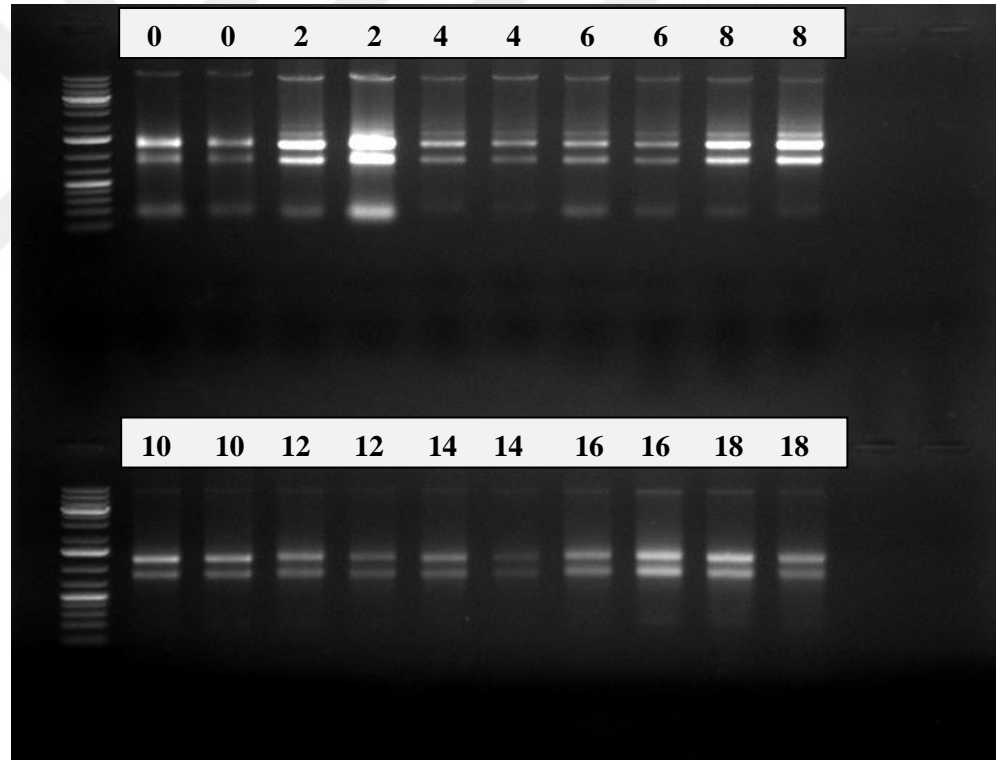
Şekil 2.2 RT-PCR grafiği

3. BULGULAR

3.1 Toplam RNA'ların İzolasyonuna Ait Bulgular

Üzüm tanelerinden alınarak -80 °C'de saklanan örnekler sıvı azotta havan ve havan topu yardımıyla toz haline getirilerek RNA izolasyonu yapılmıştır.

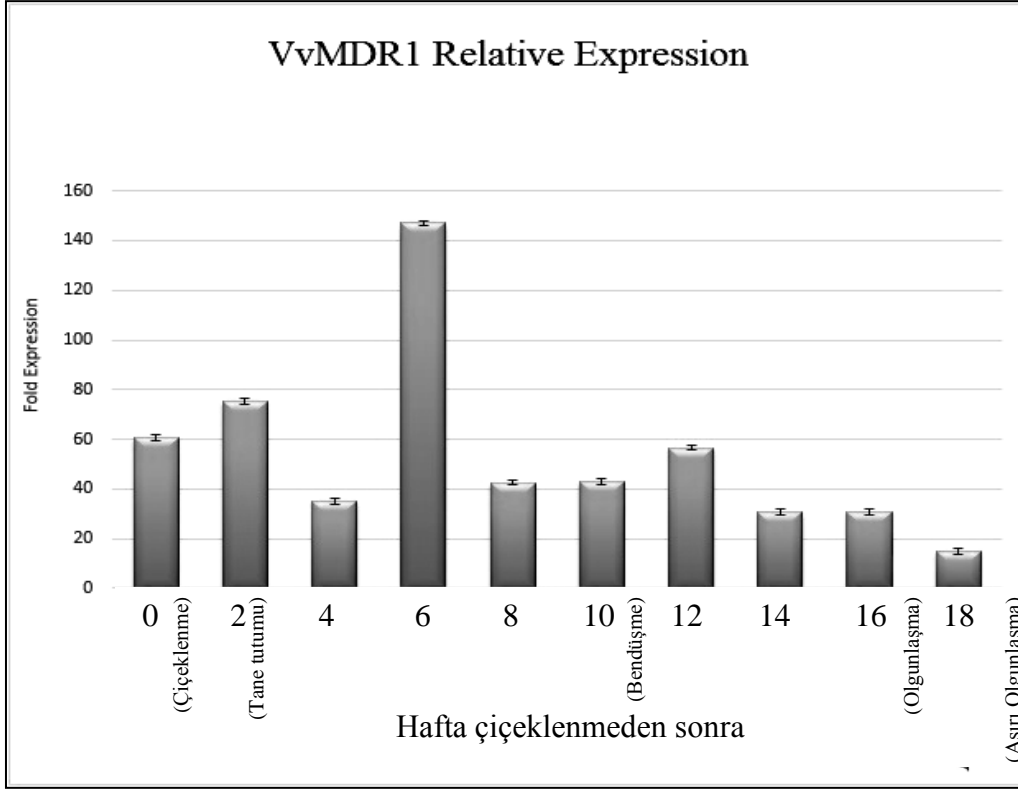
Toplam örneklere ait RNA izolasyonu işlemi her bir örnek için tekrarlanarak yeteri miktarda (yaklaşık 100 ng/μl) toplam RNA elde edilene kadar devam edilmiştir. Bu işlemlerin sonucunda RNA' lar gen ekspresyonu analizlerinde kullanılmak için, kalite kontrol amaçlı elektroforez yöntemiyle agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tanelerde farklı gelişim dönemlerine ait toplam RNA jel görüntüsü: 0 (Çiçeklenme), 2 (Tane tutumu), 4, 6, 8, 10 (Bendüşme) , 12, 14, 16 (Olgunlaşma) ve 18 (Aşırı Olgunlaşma) hafta çiçeklenmeden sonra toplanan örneklerle ait toplam RNA jel görüntüsü

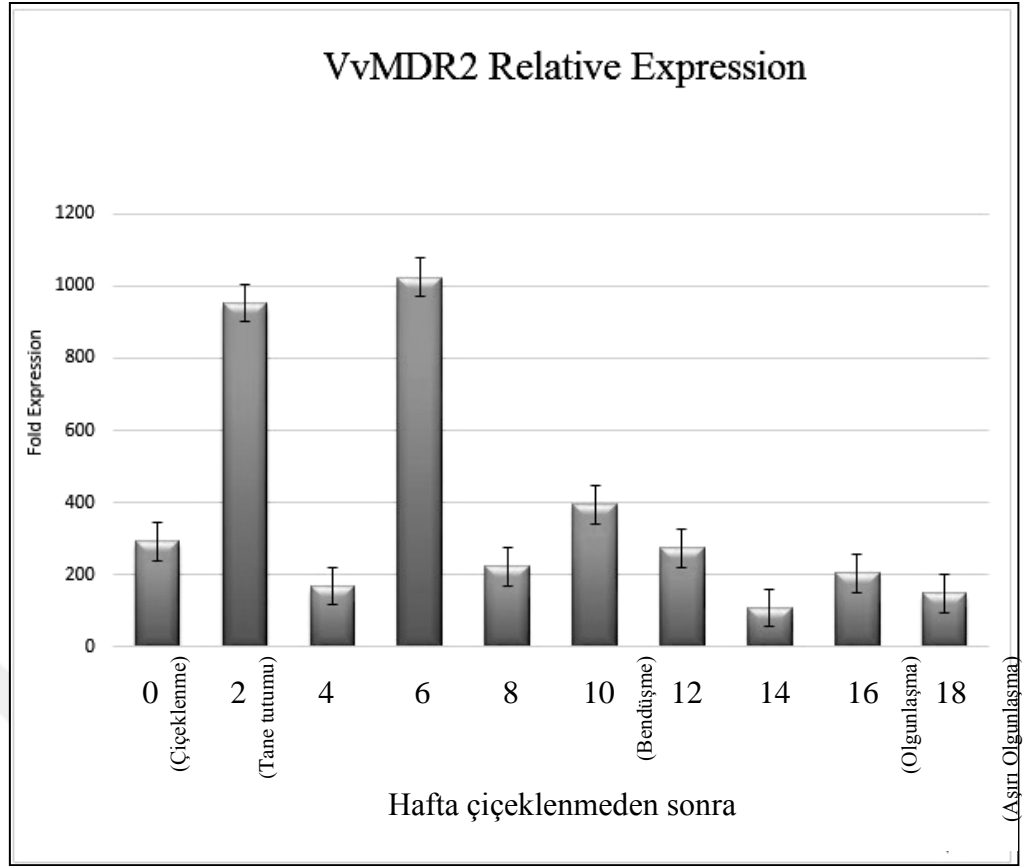
3.1.1 *VvMDR* gen ailesinin tanelerde farklı gelişim dönemlerinde ifade analizi

VvMDR alt ailesinin tane gelişim dönemlerinde mRNA profili incelenmiştir.



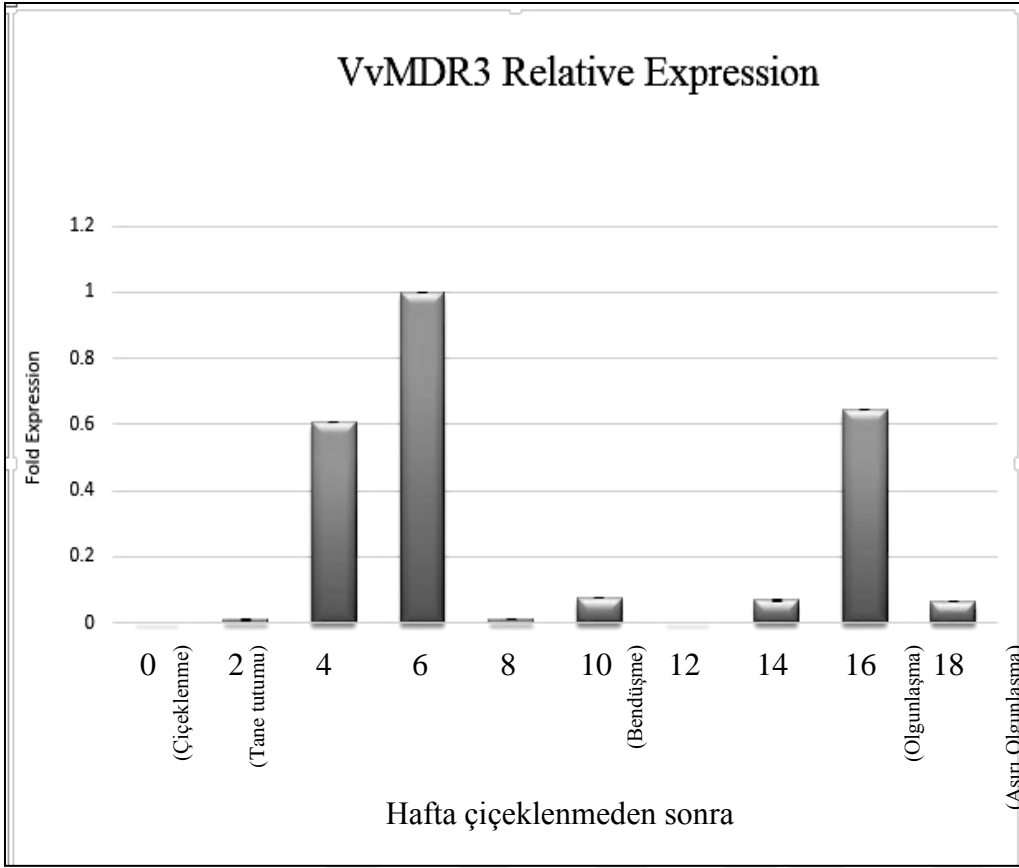
Şekil 3.2 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde *VvMDR1* Geninin İfade Analizi

VvMDR1 geninin ifadesi tane tutumunda hafif bir artış göstermiş ve bu artış çiçeklenmeden 6 hafta sonra en az 2 katına çıkarak maksimum düzeye ulaşmıştır. Bu genin ifadesi çiçeklenmeden 8 hafta sonra baskılanarak yeniden tane tutumundaki düzeyine ulaşmış ve olgunlaşma dönemine kadar benzer düzeyde seyretmiştir. İfadenin aşırı olgunlaşma döneminde yeniden baskılandığı gözlemlenmiştir.



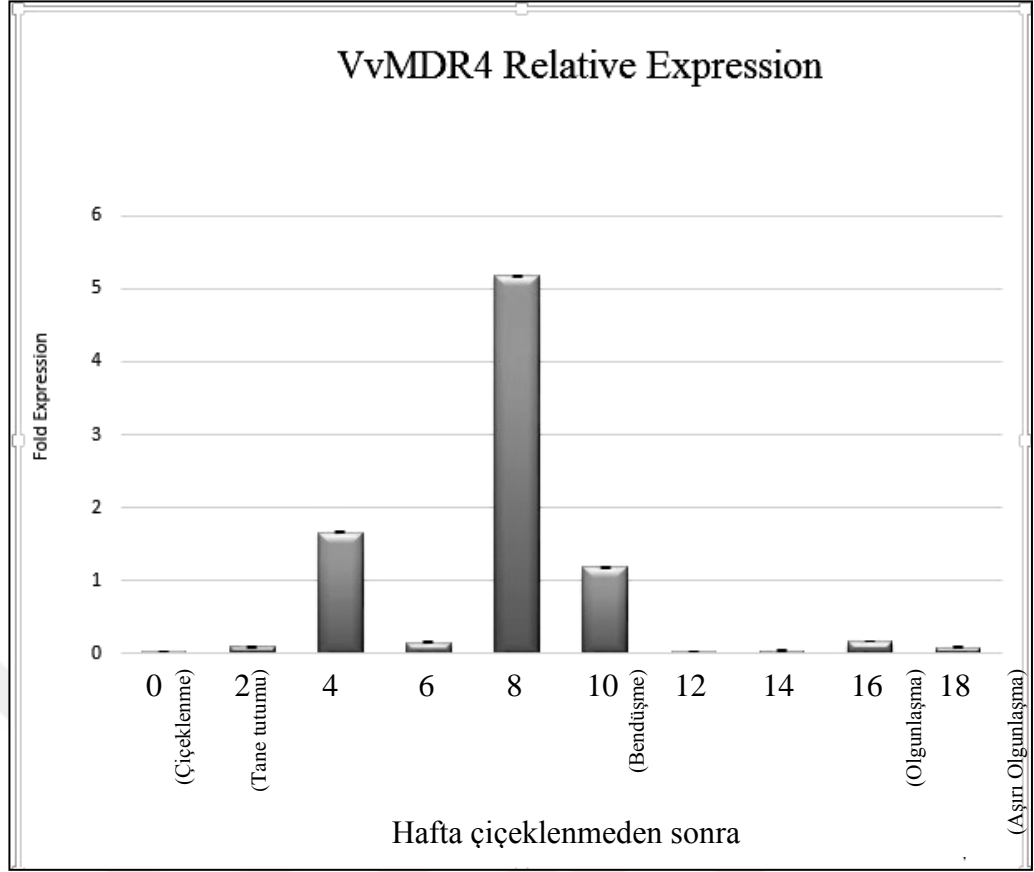
Şekil 3.3 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR2 Geninin İfade Analizi

VvMDR2 geninin ifade analizinin sonuçlarına göre, çiçeklenmeden sonra 2. ve 6. haftalarda bu genin ifadesinde en az 5 kat artış görülmüş ve bu artış tane tutumundan hemen sonra ve çiçeklenmeden 8 hafta sonra ani olarak azalma göstermiştir. VvMDR2 geninin ifadesi ben düşmeden sonra düşük seviyelerde seyretmektedir.



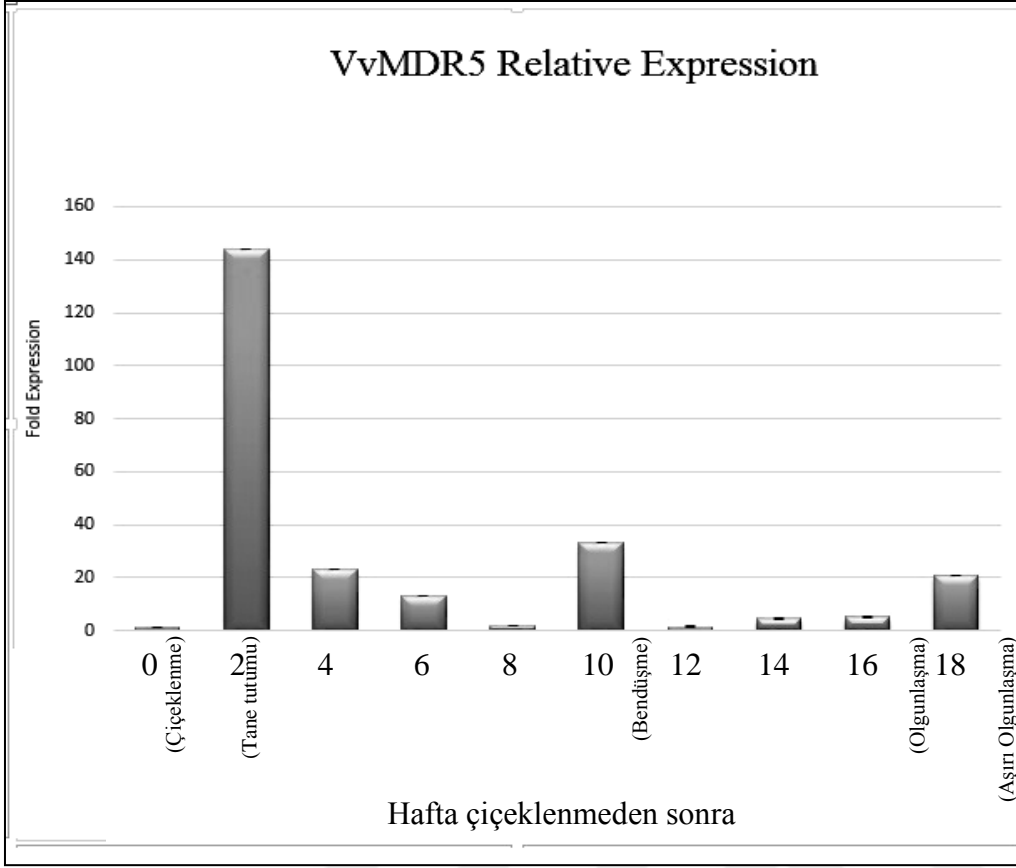
Şekil 3.4 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR3 Geninin İfade Analizi

VvMDR3 geninin ifade analizinin sonuçlarına göre, çiçeklenmeden 4 ve 6 hafta sonra bu genin ifadesinde önemli artışlar gözlemlenmiştir. Bu artış çiçeklenmeden 6 hafta sonra maximum seviyeye ulaşmış (en az 2,5 kat) ancak çiçeklenmeden 8 hafta sonra ani olarak baskılanmıştır. Ben düşmeden olgunlaşma zamanına kadar benzer ve düşük düzeyde seyretmiş ve olgunlaşma döneminde yeniden bir artış göstermiş ve aşırı olgunlaşma döneminde yeniden baskılanmıştır.



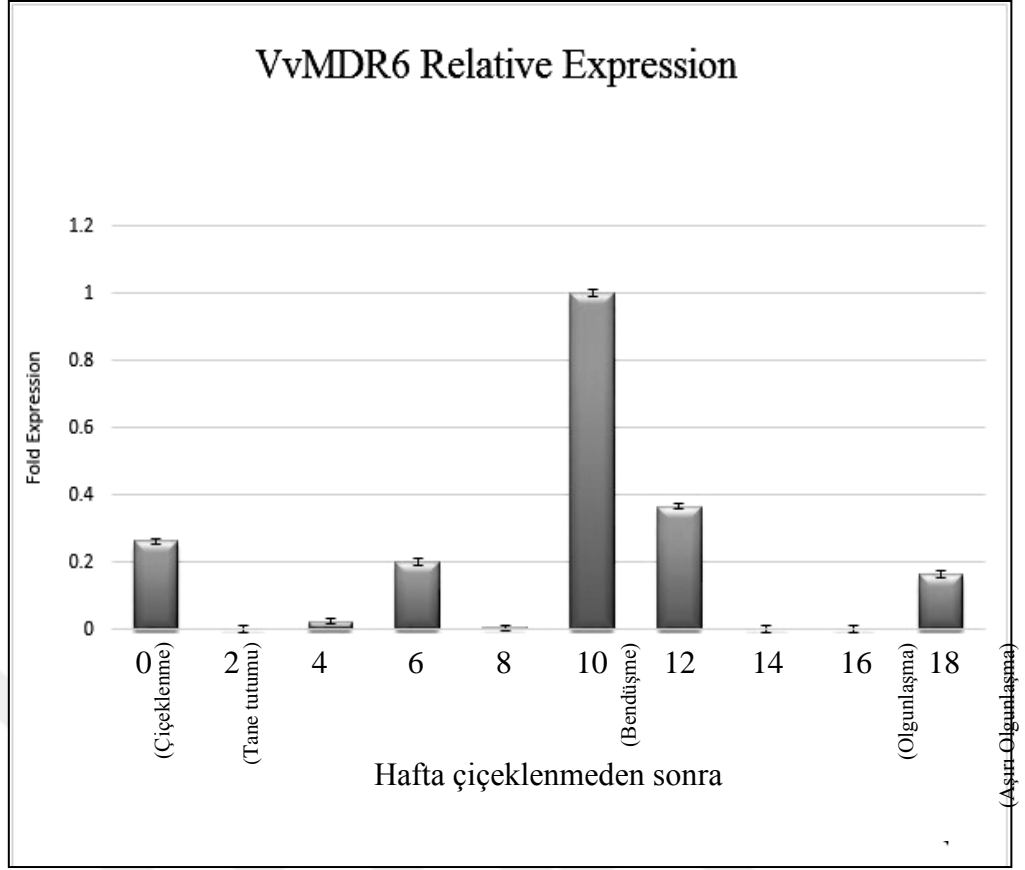
Şekil 3.5 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR4 Geninin İfade Analizi

VvMDR4 geninin ifade analizinin sonuçlarına göre çiçeklenmeden sonra 4, 8 ve 10. haftalarda bu genin ifadesinde büyük artış olduğunu gözlemlenmektedir. Bu genin ifadesi ben düşmeden 2 hafta önce maximum seviyeye ulaşarak diğer zamanlara göre 5 kat artmıştır VvMDR4 geninin ifadesi bu üç zaman dışında düşük seviyelerde seyretmektedir.



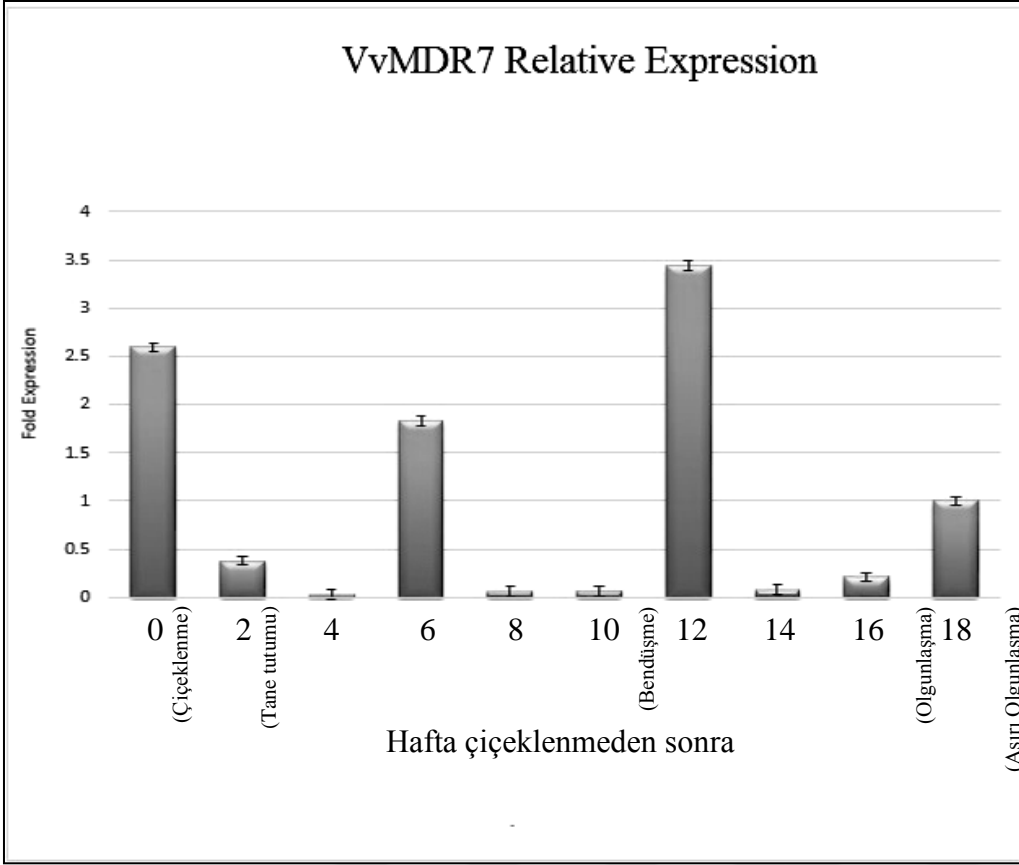
Şekil 3.6 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR5 Geninin İfade Analizi

VvMDR5 geninin ifadesi tane tutumunda ani bir artış (140 kat) göstermiş ve sonra ani bir düşüş ile azalmıştır. Bu genin ifadesi ben düşmeden önce minimum düzeye ulaşmış ve ben düşmede hafif bir düzeyde artış göstermiştir. Ben düşmeden sonra, aşırı olgunlaşma dönemine kadar minimum düzeyde kalmıştır. VvMDR5 geninin ifadesi aşırı olgunlaşma döneminde yeniden hafif bir artış göstermiştir.



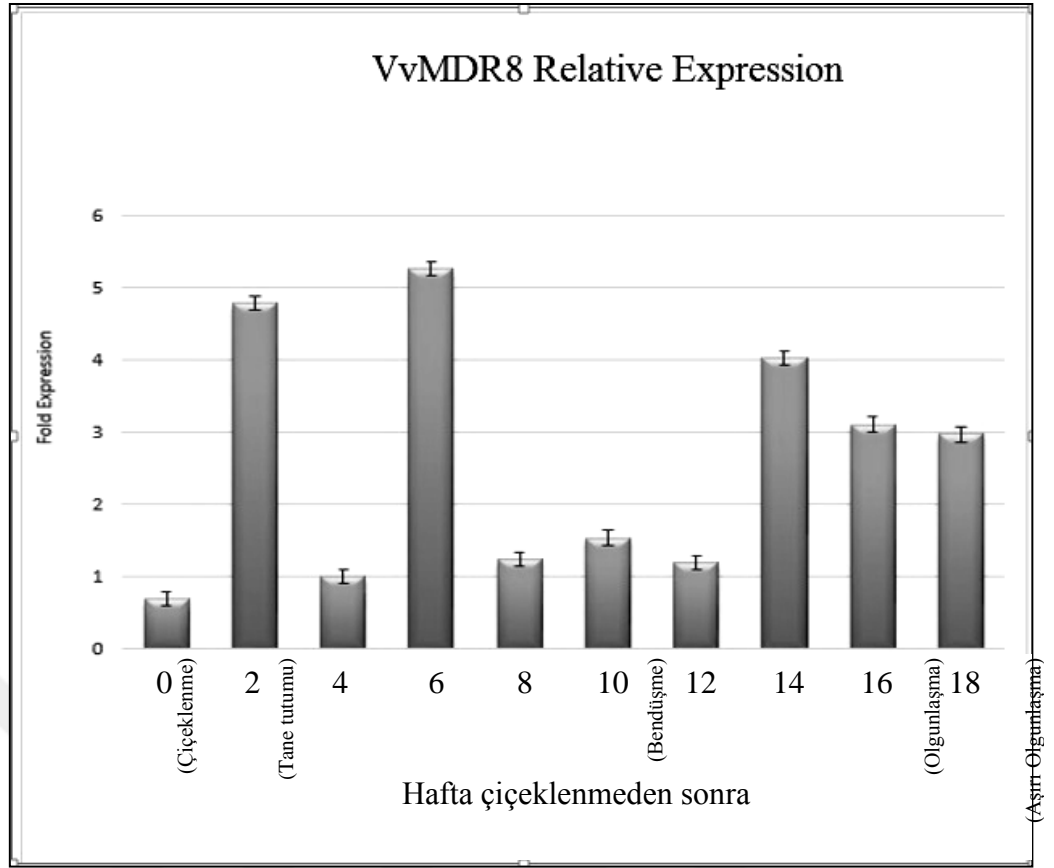
Şekil 3.7 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR6 Geninin İfade Analizi

VvMDR6 geninin ifade profili sonuçlarına göre, tane tutumunda *VvMDR6* geninin ifadesi baskılanmış ve ifade düzeyi ben düşme aşamasına kadar minimum düzeyde seyretmiştir. Ben düşme aşamasında ani bir artış göstermiş ve bu genin ifadesinin kademeli olarak olgunlaşma dönemine kadar azalmış ve aşırı olgunlaşma döneminde ise hafif artış göstermiştir.



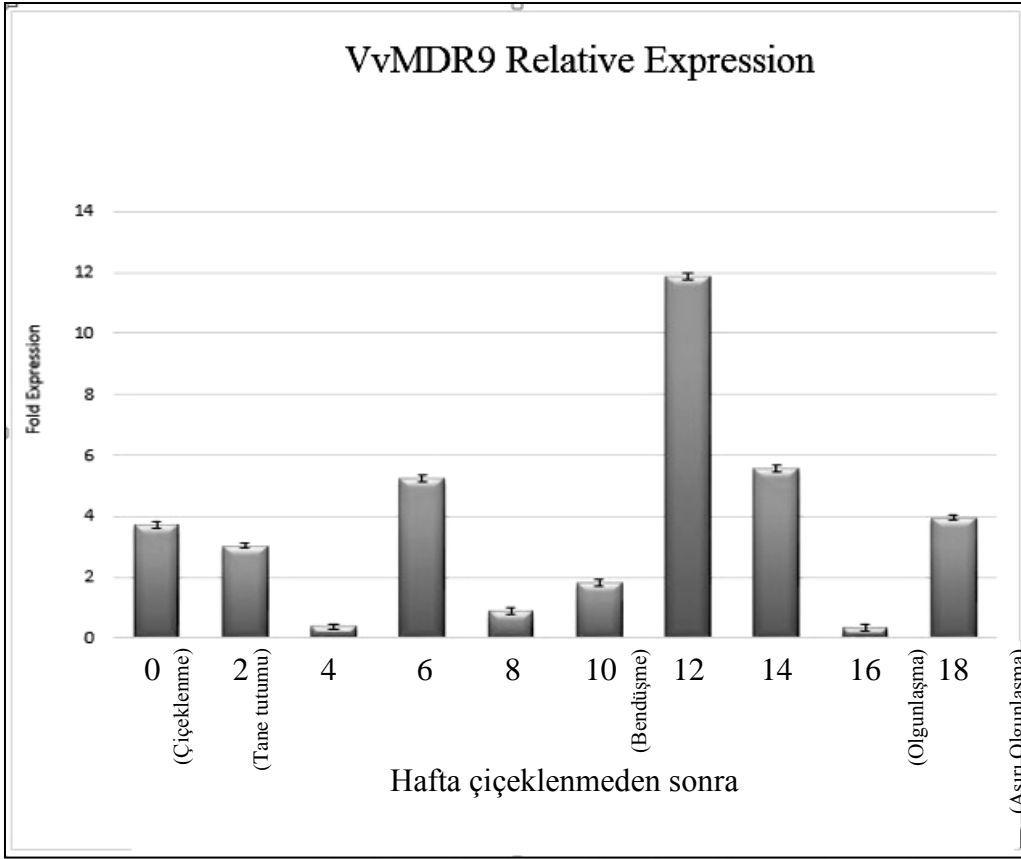
Şekil 3.8 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR7 Geninin İfade Analizi

VvMDR7 geninin ifadesi çiçeklenmeden itibaren 6. haftaya kadar kademeli olarak azalma göstermiştir. Çiçeklenmeden 6 hafta sonra alınan örneklerde VvMDR7 geninin ifadesi yeniden artış göstermiş ve ben düşme aşamasına kadar (çiçeklenmeden 10 hafta sonra) ani olarak baskılanmıştır. Ben düşmeden iki hafta sonra VvMDR7 geninin ifadesi ani bir artış göstermiş ve olgunlaşma döneminde yeniden minimum düzeye ulaşmıştır. Aşırı olgunlaşma döneminde bu genin yeniden ifadesinin arttığı görülmüştür.



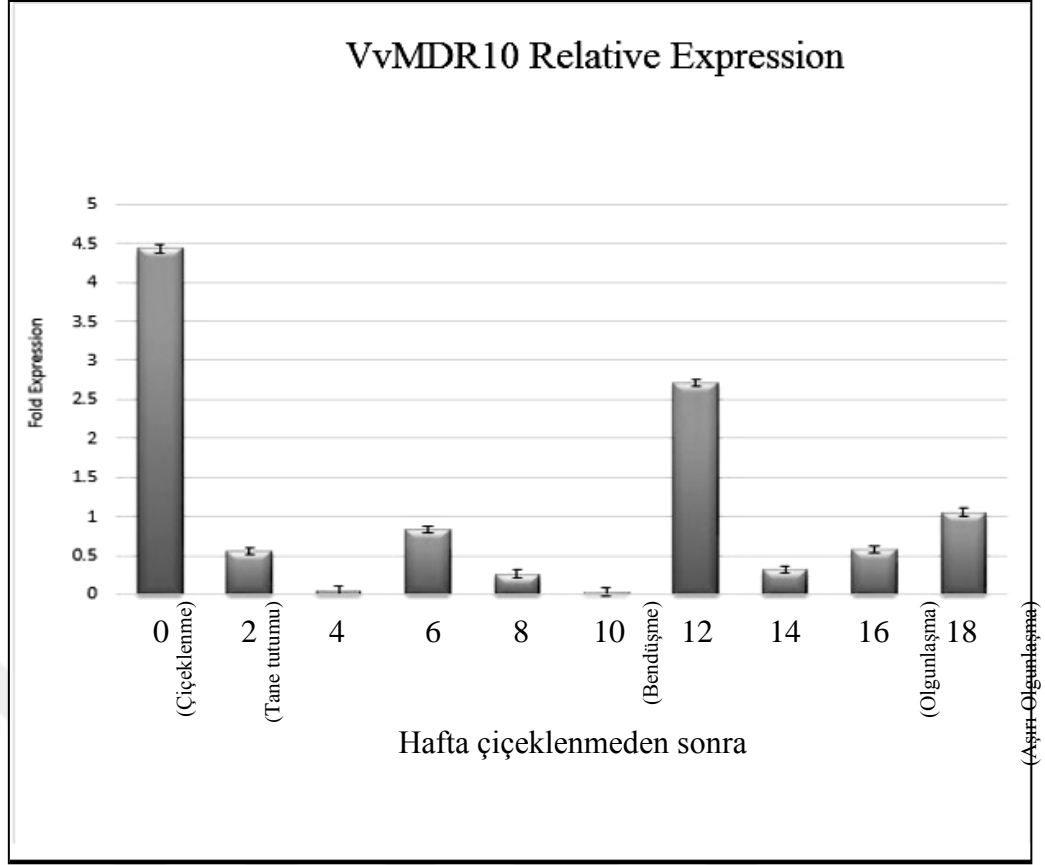
Şekil 3.9 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde *VvMDR8* Geninin İfade Analizi

VvMDR8 geninin ifade analizinin sonuçlarına göre, çiçeklenmede çok düşük seviyede olan *VvMDR8* ifadesi tane tutumunda ani olarak artmış ve 2 hafta sonra ise ani olarak azalmıştır. Bu genin ifadesi çiçeklenmeden 6 hafta sonra yeniden artarak en yüksek düzeye ulaşmıştır. *VvMDR8* geninin ifadesinin olgunlaşma ve aşırı olgunlaşma döneminde yeniden arttığını ve benzer düzeyde olduğu görülmüştür.



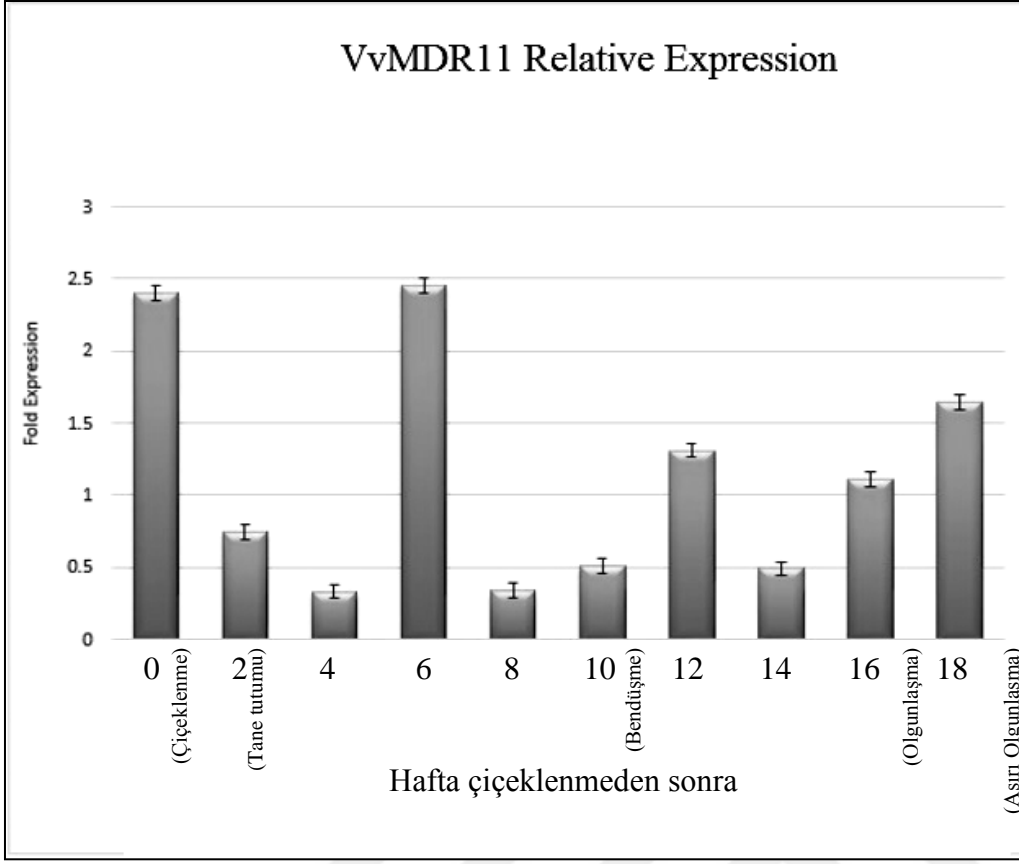
Şekil 3.10 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR9 Geninin İfade Analizi

VvMDR9 geninin ifadesi çiçeklenmeden itibaren 4 haftaya kadar azalmış ve 6. hafta çiçeklenmeden sonra aniden artış göstermiştir. Bu artış bendüşmeye kadar baskılanmış ve olgunlaşmadan önce, çiçeklenmeden 12 hafta sonra alınan örneklerde artarak maksimum düzeye (12 kat) ulaşmış ve bu artış olgunlaşmaya doğru dereceli olarak azalmıştır. *VvMDR9* geninin ifadesinin aşırı olgunlaşma döneminde yeniden arttığını ve bu artışın çiçeklenme dönemindeki ifade düzeyi ile benzer olduğu gözlemlenmiştir.



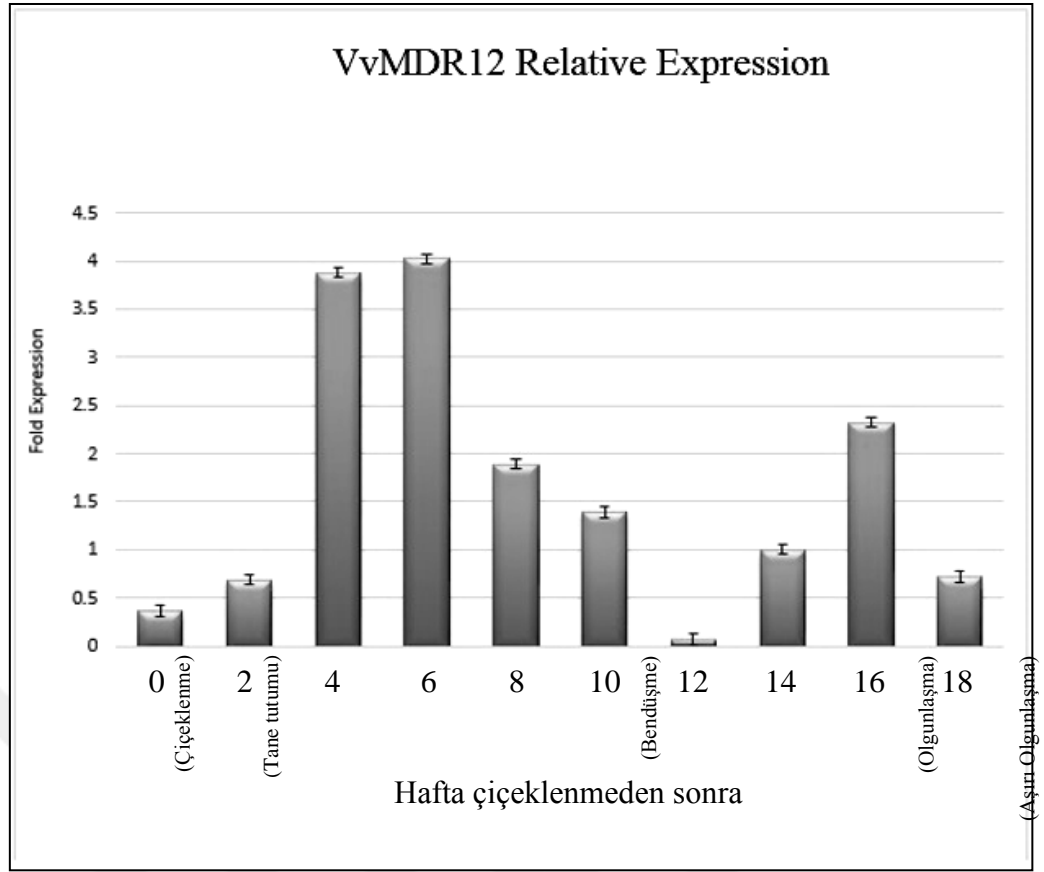
Şekil 3.11 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR10 Geninin İfade Analizi

VvMDR10 geninin ifadesinin çiçeklenme zamanında maksimum düzeyde arttığı ve olgunlaşmadan önce ifadesinin yükseldiği gözlemlenmiştir. Ben düşme, olgunlaşma ve aşırı olgunlaşma dönemlerinde bu genin ifadesi düşük düzeyde seyretmiştir.



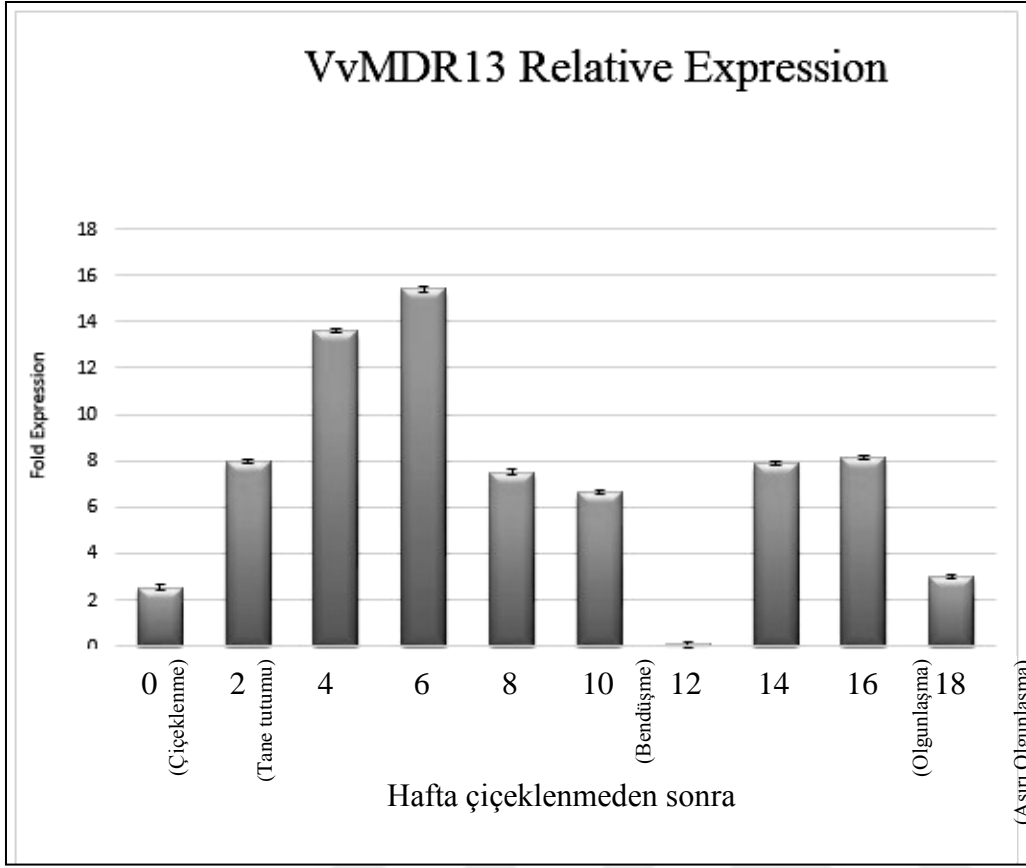
Şekil 3.12 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR11 Geninin İfade Analizi

VvMDR11 geninin ifadesinin çiçeklenme ve bendüşmeden önce önemli düzeyde arttığı ve olgunlaşmaya doğru azaldığı gözlemlenmiştir. Olgunlaşma döneminden sonra aşırı olgunlaşma dönemine kadar ise *VvMDR11* geninin ifadesinin arttığı görülmüştür.



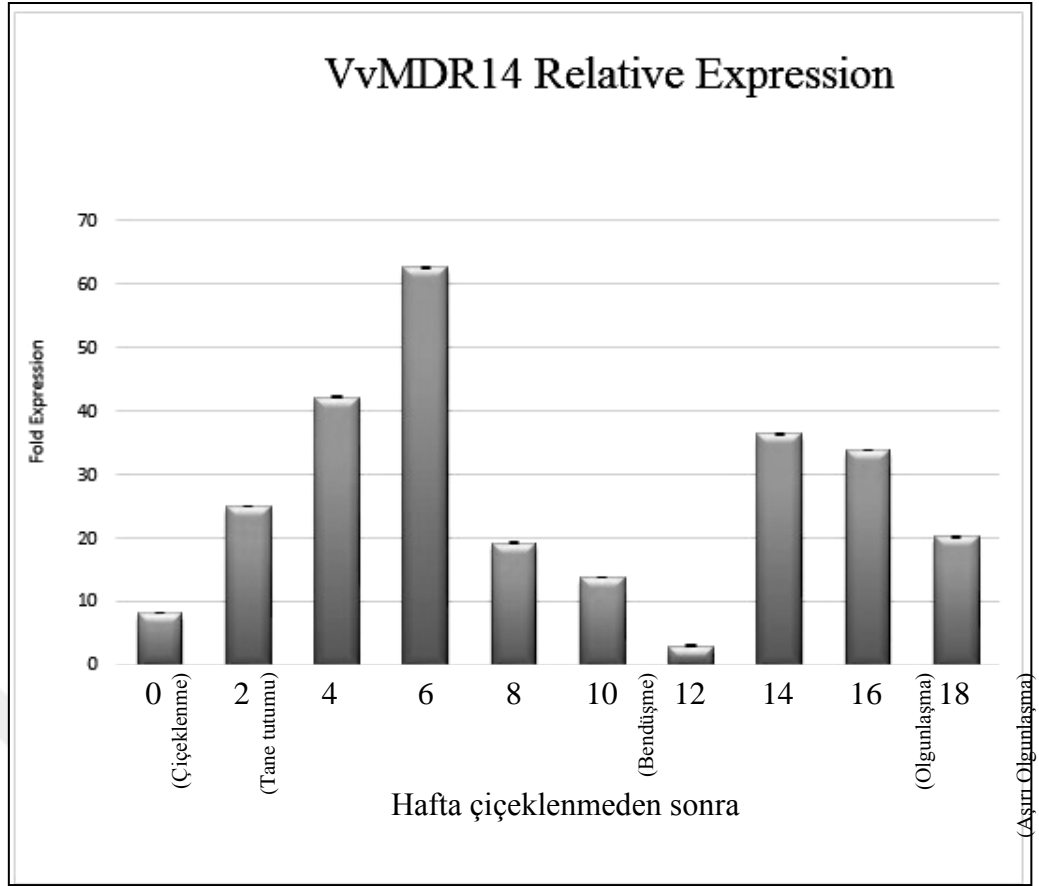
Şekil 3.13 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR12 Geninin İfade Analizi

VvMDR12 geninin ifadesinin tane tutumundan sonra artarak en üst düzeye ulaştığı ve bu ifadenin ben düşmeye doğru azaldığı görülmüştür. Olgunlaşma dönemine doğru VvMDR12 geninin ifadesinin kademeli olarak arttığı ve aşırı olgunlaşma döneminde ise yeniden azaldığı gözlemlenmiştir.



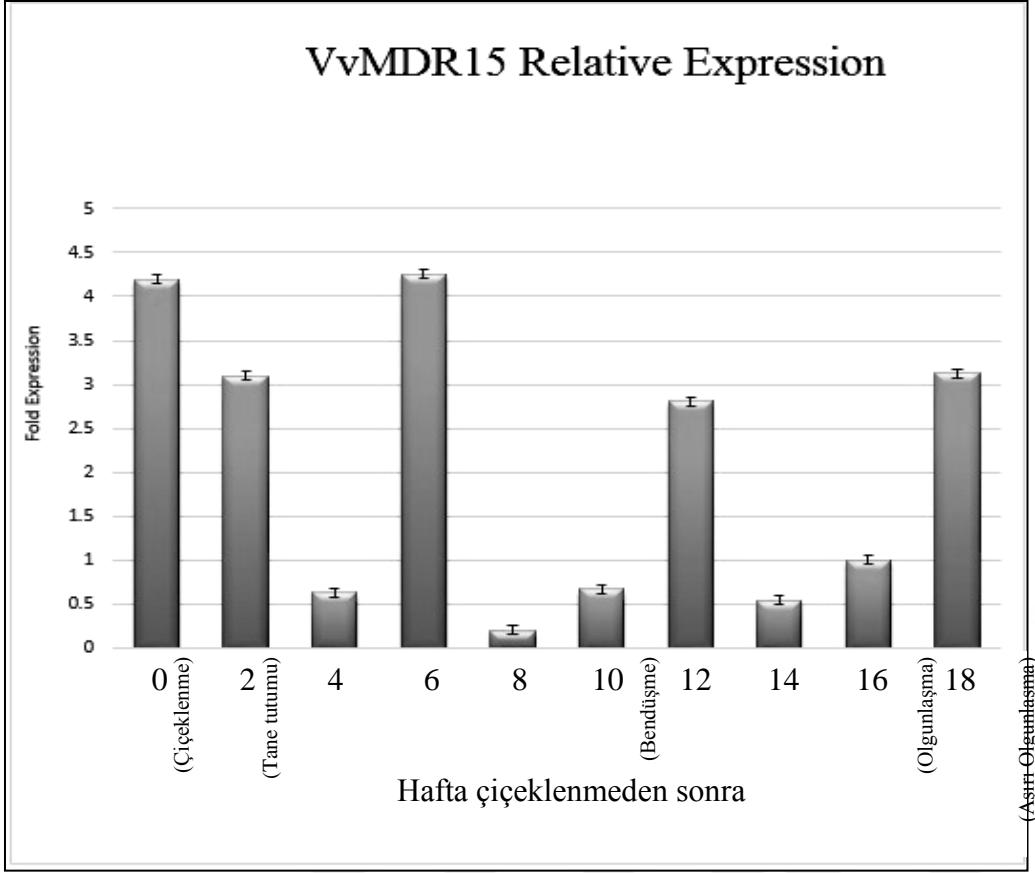
Şekil 3.14 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR13 Geninin İfade Analizi

VvMDR13 geninin ifade analizinin sonuçlarına göre, bu genin ifadesinin çiçeklenmeden itibaren çiçeklenmeden 6 hafta sonrasına kadar arttığı (7 kat) ve sonra kademeli olarak azaldığı görülmüştür. Olgunlaşmadan önce minimum düzeye inen VvMDR12 geni ifadesi olgunlaşma döneminde yeniden artmış ve aşırı olgunlaşma döneminde ise azalmıştır.



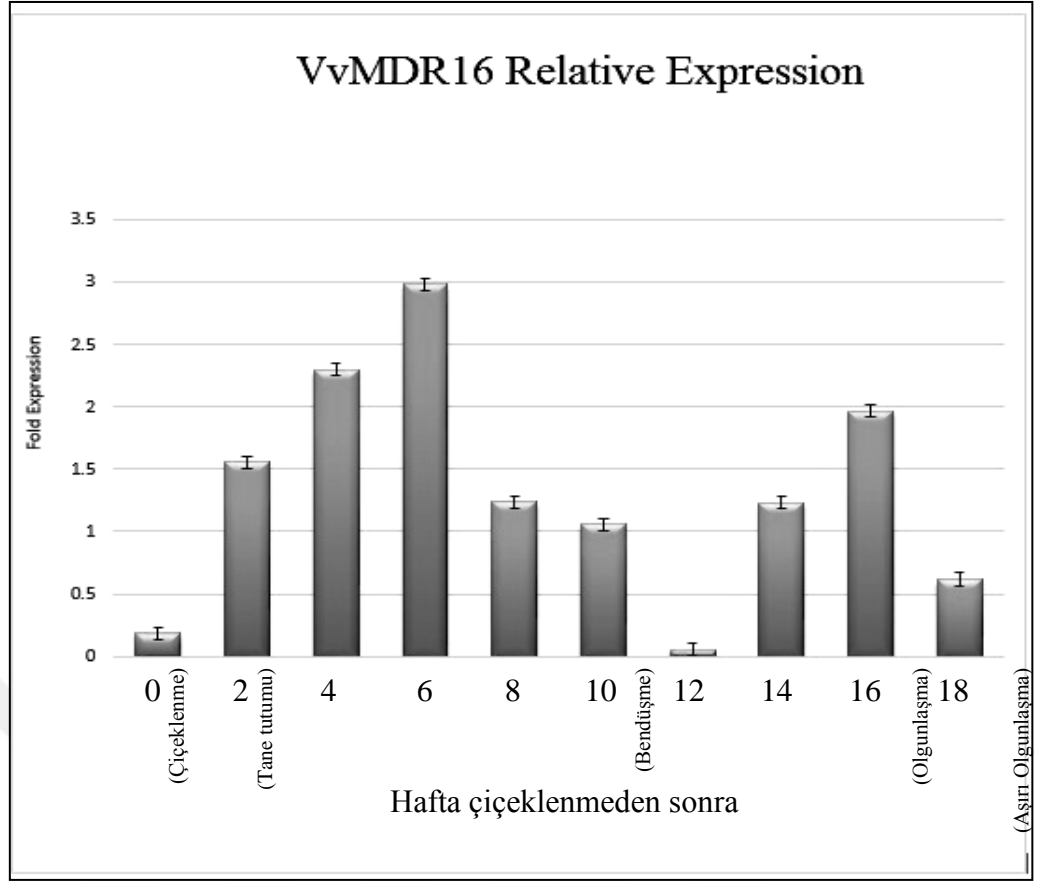
Şekil 3.15 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR14 Geninin İfade Analizi

VvMDR14 geninin ifadesinin çiçeklenme zamanından itibaren kademeli olarak arttığı ve çiçeklenmeden sonra 6. haftada maksimum düzeye ulaştığı gözlemlenmiştir. VvMDR14 geninin ifadesi ben düşmeye doğru azalmış ve olgunlaşma döneminde yeniden artış göstermiştir.



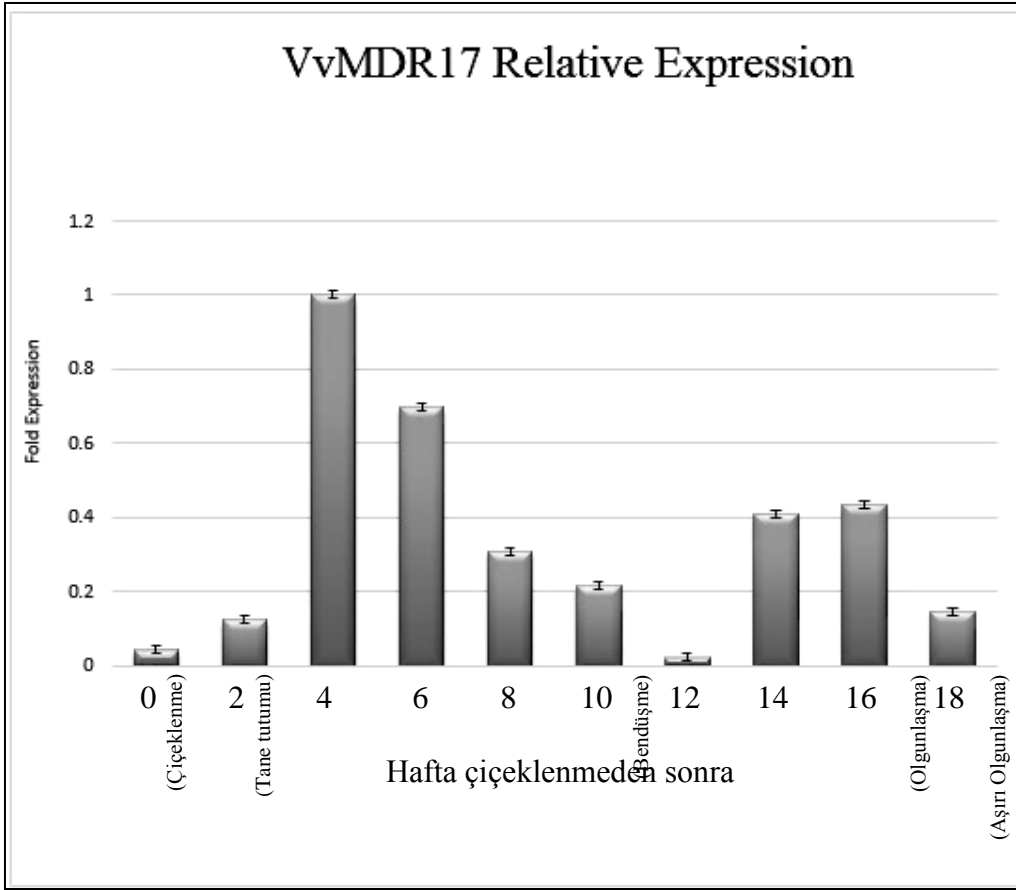
Şekil 3.16 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR15 Geninin İfade Analizi

VvMDR15 geninin ifadesi ise çiçeklenme döneminde çok yüksek olup tane tutumuna doğru azalmış ve tekrar ben düşmeden önce artmıştır. Ben düşme döneminde çok düşük düzeyde olan ifade olgunlaşmadan önce ve aşırı olgunlaşma döneminde yeniden artış göstermiştir.



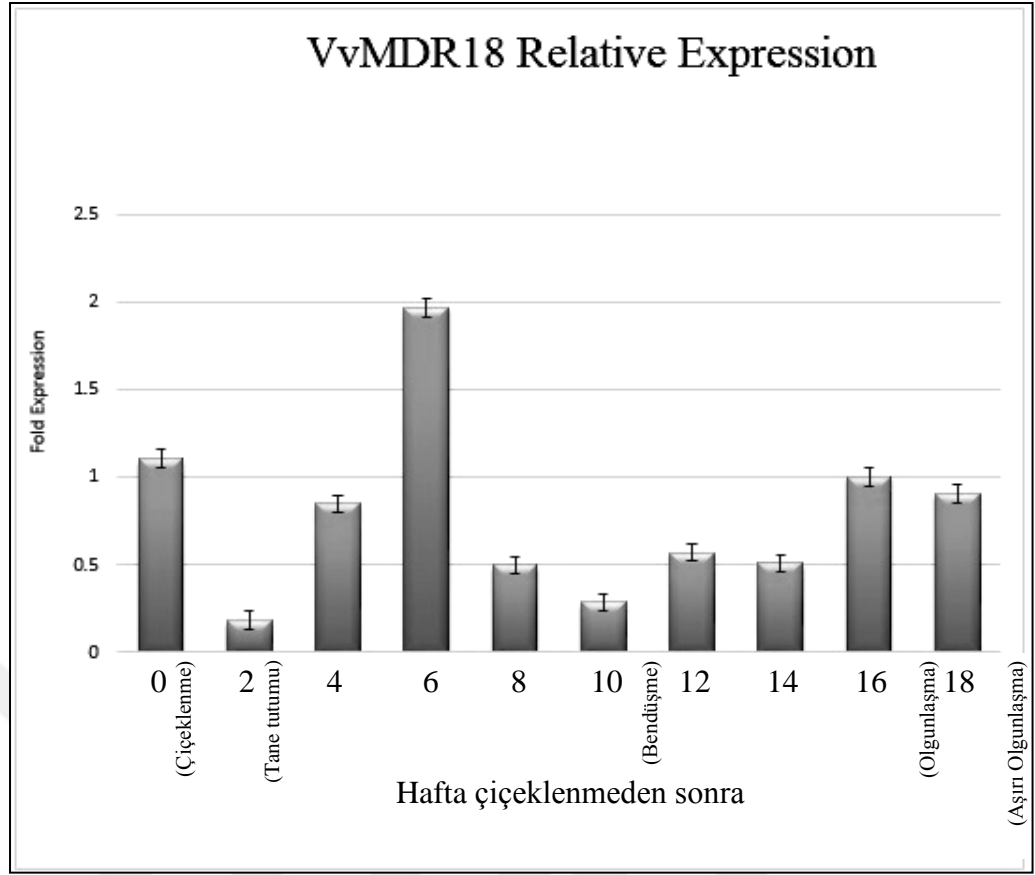
Şekil 3.17 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR16 Geninin İfade Analizi

VvMDR16 geninin ifadesi çiçeklenme zamanından itibaren kademeli olarak çiçeklenmeden 6 hafta sonrasına kadar artmış ve sonra bu ifade ben düşme dönemine doğru azalma göstermiştir. VvMDR16 geni ifadesinin olgunlaşma döneminde yeniden arttığı görülmüştür.



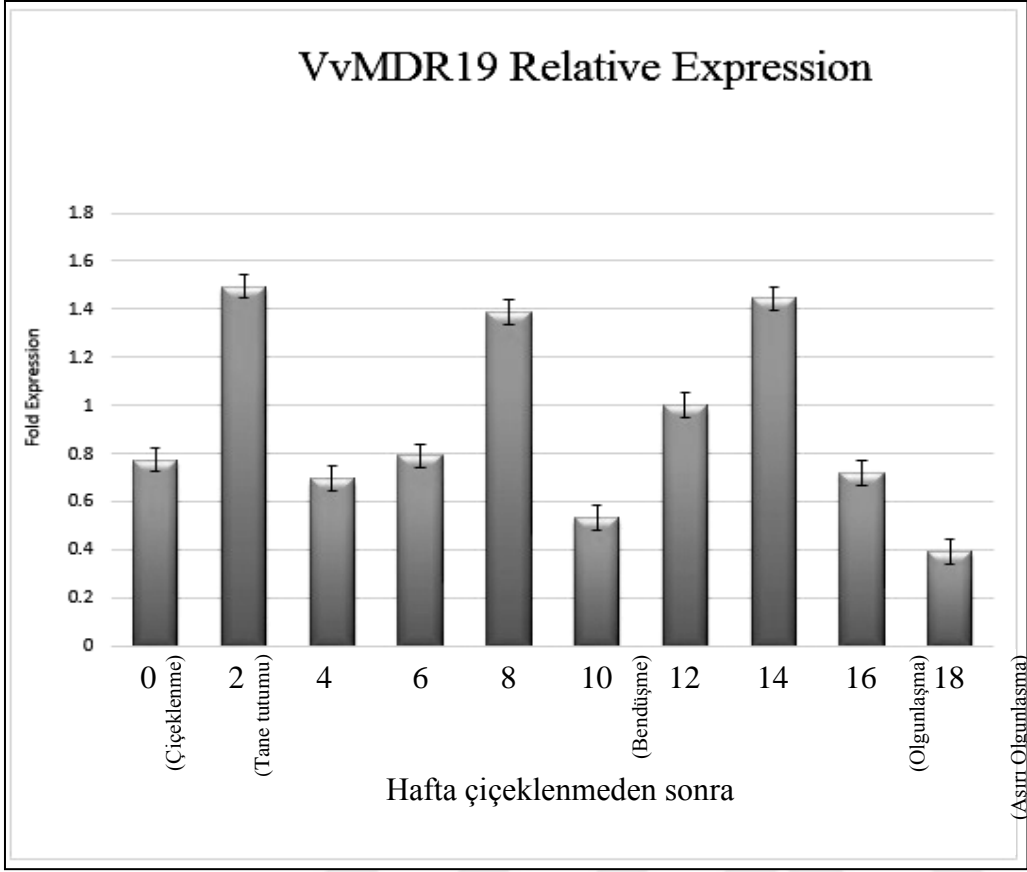
Şekil 3.18. Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR17 Geninin İfade Analizi

VvMDR17 geninin ifadesi çiçeklenmeden 4 hafta sonra en üst düzeye ulaşmış ve ben düşmeye doğru kademeli olarak azalmıştır. VvMDR17 ifade profiline olgunlaşmaya doğru yeniden artış gösterdiği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.19 Tanelerden Farklı Gelişim Döneminde VvMDR18 Geninin İfade Analizi

VvMDR18 geninin ifadesi ise tane tutumundan sonra artış göstermiş ve diğer dönemlerde düşük ve benzer düzeyde seyretmiştir. Bu genin ifadesi tane tutumunda ve bendüşme zamanlarında en düşük seviyededir.

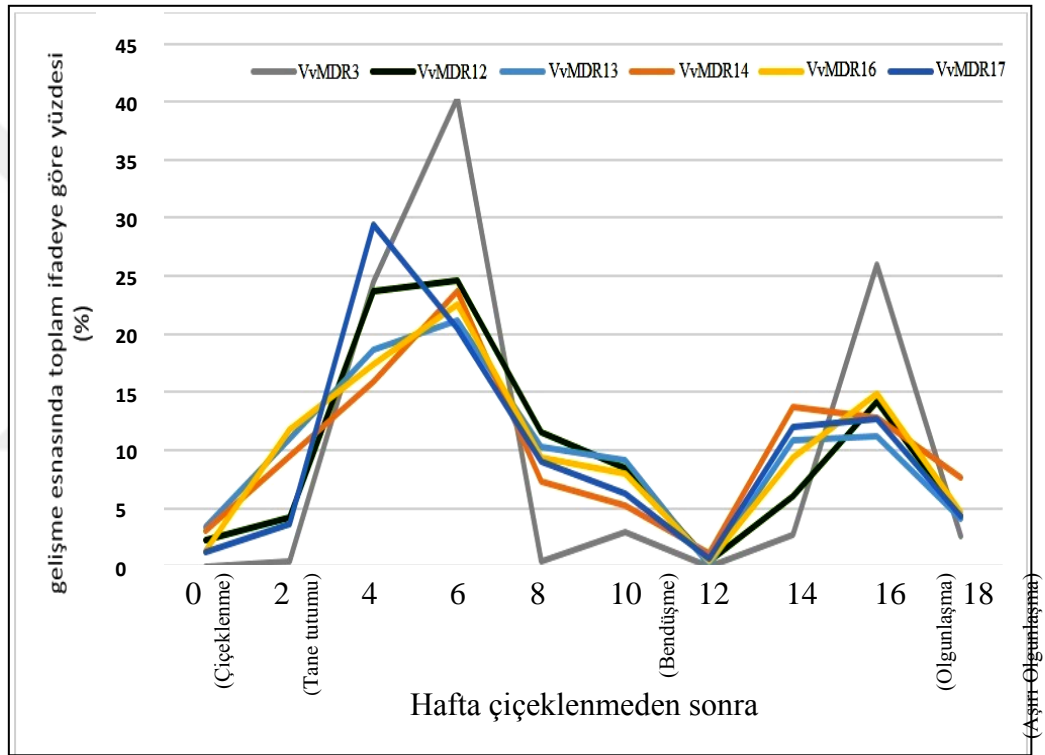


Şekil 3.20 Tanelerde Farklı Gelişim Döneminde VvMDR19 Geninin İfade Analizi

VvMDR19 geninin ifadesinin çiçeklenmeden 2 hafta sonra, ve çiçeklenmeden 8 hafta sonra ve olgunlaşma döneminden hemen önce arttığı görülmüştür.

4. TARTIŞMA

Bu proje çalışmasında, ABC kaset taşıyıcılarından *ABCB* alt ailesine ait olan *MDR* grubunun, 19 üyesinin gen ifade profilleri, üzüm tanelerinde farklı gelişme dönemlerinde incelenmiştir. *VvMDR* proteinlerinin ifade profillerine bakarak bazı *VvMDR* genlerinin benzer bir ifadeye sahip oldukları gözlemlenmiştir



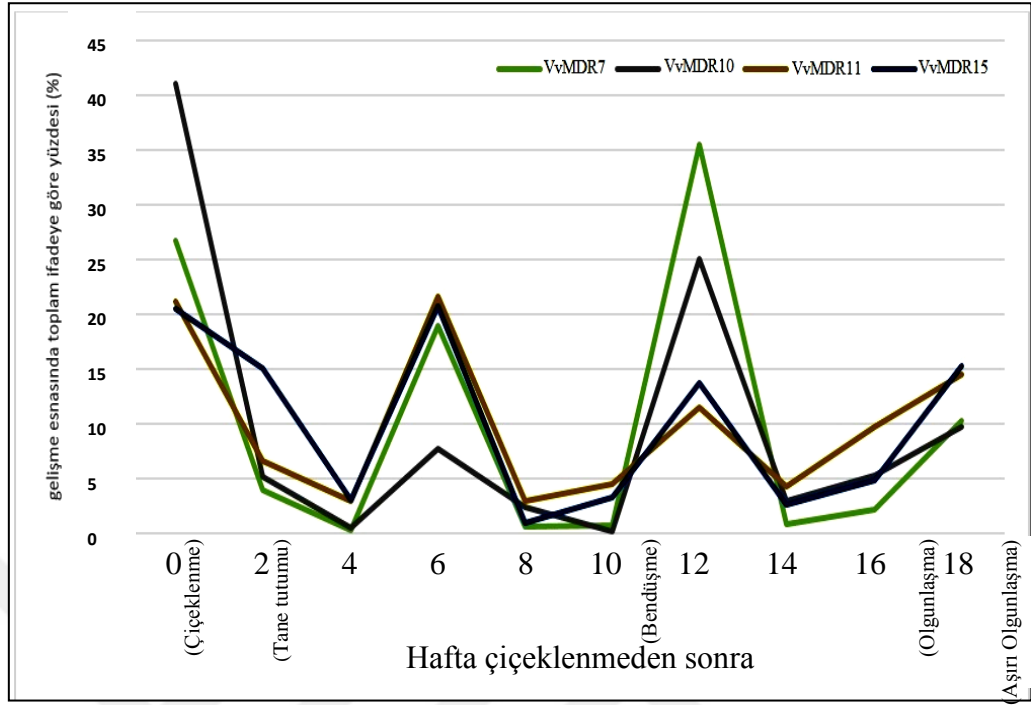
Şekil 4.1 *VvMDR3*, *VvMDR12*, *VvMDR13*, *VvMDR14*, *VvMDR16* ve *VvMDR17* Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerine Göre İfade Profilleri: Üzüm tanelerinin gelişimi boyunca *VvMDR3*, *VvMDR12*, *VvMDR13*, *VvMDR14*, *VvMDR16* ve *VvMDR17* genlerinin ifadeleri benzer bir şekilde artış ve azalış göstermektedir.

Meyve olgunlaşması bir çok bitki hormonu tarafından kontrol edilen bir süreç olup, olgunlaşma sürecinde bu farklı hormonların moleküler etkileşimleri hakkında bilgilerimiz hala yetersizdir (Böttcher C. ve Davies C., 2012). Bendüşme döneminde meydana gelen birçok değişiklik, aynı zamanda gen ekspresyonlarında meydana gelen belirgin değişikliklerden kaynaklanmaktadır.

Bendüşmede meydana gelen değişikliklerin sebebi bilinmese de, oksin seviyelerinde bir azalma veya ABA seviyelerinde artıştan meydana gelmekte ve bu olaylar ilgili genlerin ifadesindeki değişikliklerin koordinasyonu ile gerçekleşmektedir (Robinson and DAVIES. 2000).

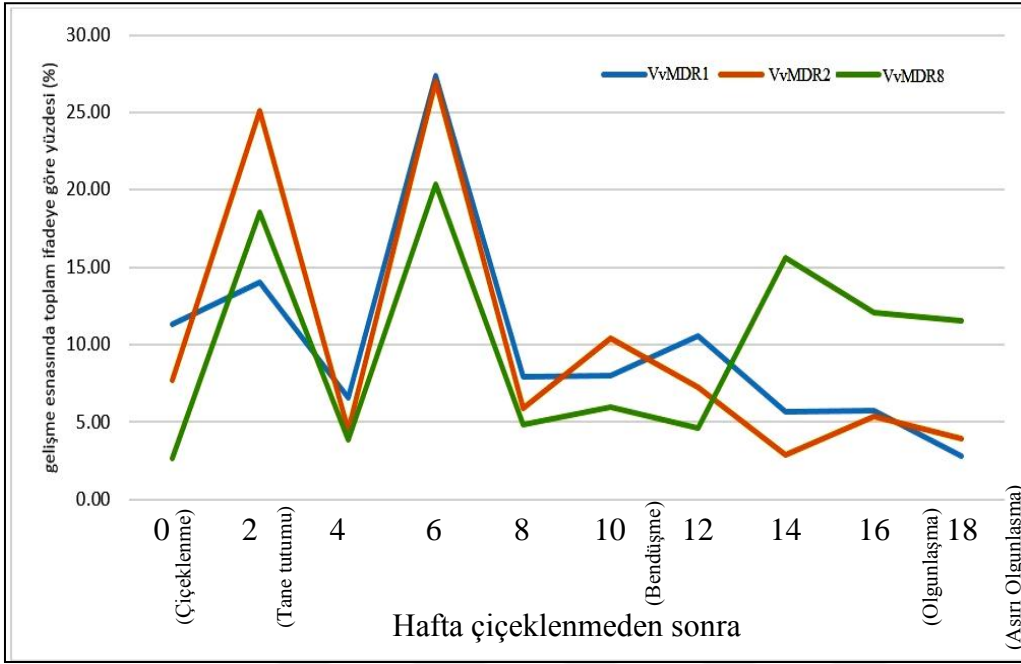
Üzüm taneleri gelişimlerinin erken evrelerinde yüksek miktarda oksin içerirler. Ancak oksin seviyeleri ben düşme ile düşük seviyelere iner ve olgunlaşma boyunca düşük kalır (Cawthon ve Morris 1982). Çilek (Archbold ve Dennis., 1984) ve Üzüm (Symons GM et al. 2012) gibi non-klimakterik meyvelerde olgunlaşma öncesi ve sırasında oksin konsantrasyonları genel olarak düşük bulunmuştur. Arabidopsiste *ABCB1*, *ABCB4* ve *ABCB19* birer oksin taşıyıcıları olarak karakterize edilmiştir (Titapiwatanakun B, Murphy AS., 2009). Ancak son çalışmalarda *ABCB14* ve *ABCB15* gibi diğer *ABCB* proteinlerinin de polar oksin taşınımı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Kaneda M, et al., 2011). Bu bulgular diğer *ABCB* proteinlerinin de oksin taşınımına dahil olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, *VvMDR3*, *VvMDR12*, *VvMDR13*, *VvMDR14*, *VvMDR16* ve *VvMDR17* genleri tane gelişimi boyunca benzer bir gen ifadesine sahiptir. Bu genler çiçeklenmeden 4-6 hafta sonra artış göstermiş ve ben düşme dönemine doğru bu genlerin ifadesi azalmıştır. Olgunlaşma döneminde ise bu genlerin ifadesinin arttığı ve aşırı olgunlaşma döneminde ise azaldığı gözlemlenmiştir. *Arabidopsis thaliana* da *ABCB1*, *ABCB4* ve *ABCB19* genlerinin oksin taşıyıcılarını kodladığı kanıtlanmıştır (Titapiwatanakun B et al. 2009). Bu gen ifadelerinin tane tutumundan itibaren yüksek olması, benzer şekilde oksin hormonu taşınımında etkili rol oynayabileceklerini ve hücre bölünmesi ve büyümesi ile ilişkili olabileceklerini düşündürmektedir. Ayrıca olgunlaşma döneminde *VvMDR3*'ün yüksek ifade profili ABA taşınımında rol oynayabileceği hipotezini öne sürmemize neden olmuştur



Şekil 4.2 *VvMDR7*, *VvMDR10*, *VvMDR11* ve *VvMDR15* Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerine Göre İfade Profilleri: *VvMDR7*, *VvMDR10*, *VvMDR11* ve *VvMDR15* genleri ifadeleri bazı gelişme dönemlerinde benzer ifade profili göstermiştir.

VvMDR7, *VvMDR10*, *VvMDR11* ve *VvMDR15* genlerinin ifadeleri çiçeklenme, tane tutumu ve ben düşmeden önce ve sonra yüksek düzeyde seyretmiş, ancak olgunlaşma ve ben düşme döneminde ise minimum düzeydedir. Çiçeklenme döneminde ifade artışı tanelerdeki oksin hormonu birikimi ile doğru orantılı olduğundan bu genler oksin taşınımında rol oynayabilir.



Şekil 4.3 VvMDR1, VvMDR2, VvMDR8 Genlerinin Tane Gelişim Dönemlerine Göre İfade Profilleri: VvMDR1, VvMDR2, VvMDR8 genleri ifadeleri bazı gelişme dönemlerinde benzer ifade profili göstermiştir.

VvMDR1, VvMDR2, VvMDR8 genlerinin ifadesi tane tutumunda ve bendüşmeden önce yüksek çıkmıştır. Bu genlerin ifadeleri olgunlaşma döneminde azalmıştır.

SONUÇ

Tez çalışması analiz sonuçlarına göre *Vitis vinifera* L. *ABCB/MDR* ailesine ait olarak belirlenen 19 üyesinin gen ifadeleri; meyve tanesinin 10 farklı gelişim döneminde Real-time PCR yöntemi ile incelenmiştir.

Vitis vinifera L. *ABCB/MDR* genlerinin ifade grafiklerine dayanarak bazı *MDR* genlerinin benzer ekspresyon profili gösterdikleri görülmüştür. *MDR1* geninin oksin taşınımında rol oynadığı gösterilmiştir. *VvMDR2* ve *VvMDR8* genlerinin *MDR1* genine benzer ifadeye sahip olması, *VvMDR2* ve *VvMDR8* genlerinin oksin taşınımında rol oynadıklarını düşündürmektedir. Ayrıca *MDR14* genin oksin taşınmasında görevli olduğu saptanmış olması ve *VvMDR3*, *VvMDR12*, *VvMDR13*, *VvMDR16* ve *VvMDR17* genleri ile benzer bir ifadeye sahip olması bu genlerin de oksin taşınımında rol oynadıklarını düşündürmektedir.

Tanede incelenen tüm *VvMDR* genlerinin ifadeleri olgunlaşma ve aşırı olgunlaşma dönemlerinde azalmıştır. *VvMDR3*, geninin ifadesi ise bundan farklı olarak olgunlaşma döneminde artmıştır.

Sonuç olarak, tane gelişim dönemi boyunca olan mRNA ifade analizlerinin sonuçları *ABCB/MDR* proteinlerinin gelişim dönemlerinde rolleri ve yer aldıkları fizyolojik olayların belirlenmesi açısından bir ön bilgi sağlamaktadır. Bu genlerin fitohormon taşınımında etkili rol oynayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.,** 2007, Membrane Structure, p. 459-481, *Molecular Biology of the Cell*, Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (Eds.), Garland Science, New York.
- Altındışli, A.,** 2003, An Overview on Turkish Sultana Production and Recent Developments, *International Dries Grapes Producing Countries Conference*, p.
- Anonim,** 1990, "Standart Üzüm Çeşitleri Kataloğu," T.C: Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Yayın Dairesi Başkanlığı.
- Archbold DD, Dennis FG Jr.** 1984. Quantification of free ABA and free and conjugated IAA in strawberry achene and receptacle tissue during fruit development. *J Am Soc Hort Sci*, 109:330–335.
- Benjamins, R., and Scheres, B.** (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 443–465.
- Bird, D., F. Beisson, A. Brigham, J. Shin, S. Greer, R. Jetter, L. Kunst, X. Wu, A. Yephremov, L. Samuels.** 2007. Characterization of Arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion. *The Plant Journal* 52(3): 485-498.
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, et al.** 2007, Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19:131- 47; PMID:17237354; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.106.040782>.
- Blattner FR, et al.** 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277:1453–1462. [PubMed: 9278503]
- Bodzioch, M., E. Orso, J. Kluchen, T. Langsman, A. Böttcher, W. Dietrich, W. Drobnik, S. Barlage, C. Büchler, M. Porsch-Özcürümez, K. J. Lackner, G. Schmitz.** 1999, The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics* 22: 347-351.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Böttcher C, Davies C.** 2012, Hormonal control of grape berry development and ripening. In *The Biochemistry of the Grape Berry*, vol. 1. Edited by Gerós H, Chaves MM, Delrot S. Sharjah: Bentham Science: 194–217.
- Busch W, Saier MHJ.** The transporter classification (TC) system. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2002;27:287–337. [PubMed: 12449427]
- Cabrito TR, Teixeira MC, Singh A, Prasad R, Sa-Correia I.** 2011, The yeast ABC transporter Pdr18 (ORF YNR070w) controls plasma membrane sterol composition, playing a role in multidrug resistance. *Biochem J*, 440:195-202; PMID: 21831043; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20110876>.
- Cawthon, D.L. and Morris, J.R.** 1982, Relationship of seed number and maturity to berry development, fruit maturation, hormonal changes, and uneven ripening of ‘Concord’ (*Vitis labrusca* L.) grapes. *Journal of the American Society of Horticultural Science* 107, 1097–1104.
- Chapman, D.,** 1988, Biomembranes: Structure of Biomembranes and Their Models, p. 13-20, *Biotechnological Applications of Lipid Microstructures*, Gaber, B., Schnur, J. and Chapman, D. (Eds.), Springer US.
- Cho M, Lee SH, Cho H-T.** 2007; P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, 19:3930-43; PMID:18156217; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.054288>.
- Cho, M., & Cho, H.** 2013, The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant signaling & behavior*, 8(2), 642-54.
- Ducos, E., A. S. Fraysse, M. Boutry.** 2005, NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Letters* 579(30): 6791-6795.
- Dudler, R. and C. Hertig** 1992, Structure of an mdr-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. *Journal of Biological Chemistry* 267(9): 5882-5888.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fath, M. J. and R. Kolter** 1993, ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiological Reviews* 57(4): 995-1017.
- Figueiredo-González, M., Martínez-Carballo, E., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., Martínez, M. C., & Simal-Gándara, J.** 2012, Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chemistry*, 130(1), 9–19. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.006>.
- Fraige, K., Pereira-Filho, E. R., & Carrilho, E.** 2014, Fingerprinting of anthocyanins from grapes produced in Brazil using HPLC-DAD-MS and exploratory analysis by principal component analysis. *Food Chemistry*, 145, 395–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.066>.
- Gadsby, D. C., Vergani, P., and Csanady, L.,** 2006, The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis, *Nature* 440, p. 477-483.
- Gaedeke, N., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Forestier, C., Muller, A., Ansoerge, M., Becker, D., Mammun, Y., Kuchler, K., Schulz, B., Mueller-Roeber, B., and Martinoia, E.,** 2001, The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement, *Embo j* 20, p. 1875-87.
- Ganguly A, Lee SH, Cho M, Lee OR, Yoo H, Cho H-T.** 2010, Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Physiol*, 153:1046-61; PMID:20439545; <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.156505>.
- Garcia, O., P. Bouige, U. Kolukisaoglu, C. Forestier, A. Müller, M. Ansoerge, D. Becker, Y. Mammun, K. Kuchler, B. Schulz, B. Mueller-Roeber, E. Martinoia.** 2004, Inventory and Comparative Analysis of Rice and *Arabidopsis* ATP-binding Cassette (ABC) Systems. *Journal of Molecular Biology* 343(1): 249-265.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Geisler M, Blakeslee JJ, Bouchard R, Lee OR, Vincenzetti V, Bandyopadhyay A, et al.** 2005, Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/ PGP transporter AtPGP1. *Plant J*, 44:179-94; PMID: 16212599; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02519.x>.
- Gennis, R. B.,** 1989, "Biomembranes: molecular structure and function," Springer-Verlag New York.
- Gómez Gallego, M. A., Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., Hermosín-Gutiérrez, I., & González Viñas, M. A.** 2011, Study of phenolic composition and sensory properties of red grape varieties in danger of extinction from the Spanish region of Castilla-La Mancha. *European Food Research and Technology*, 234(2), 295–303. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-011-1636-0>.
- Goto N, Starke M, Kranz AR.** 1987, Effect of gibberellins on flower development of the pin-formed mutant of Arabidopsis thaliana. *Arabidopsis Information Service* 23: 66–71.
- Higgins, C. F.** 1992, ABC Transporters: From Microorganisms to Man. *Annual Review of Cell Biology* 8(1): 67-113.
- Higgins, C. F. and K. J. Linton** 2003, ABC Transporters: An Introduction and Overview, In ABC Proteins (I. B. Holland, P. C. C. Susan, K. Karl, S. P. C. C. K. K. Christopher F. Higgins I. Barry Holland and F. H. Christopher eds). Academic Press, pp. xvii-xxiii London.
- İlter, E., and Altındışli, A.,** 2007, Türk Sultanları-Çekirdeksiz Kuru Üzüm, *Ege Kuru Meyve ve Mamülleri İhracatçıları Birliği*, p. 3-48.
- Ivanova, V., Stefova, M., Vojnoski, B., Dörnyei, Á., Márk, L., Dimovska, V., et al.** 2011, Identification of polyphenolic compounds in red and white grape varieties grown in R. Macedonia and changes of their content during ripening. *Food Research International*, 44(9), 2851–2860. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.046>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jones, P. M., M. L. O'Mara, A. M. George.** 2009, ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences* 34(10): 520-531.
- Kaneda M, Schuetz M, Lin BS, Chanis C, Hamberger B, Western TL, et al.** 2011, ABC transporters coordinately expressed during lignification of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J Exp Bot*, 62:2063-77; PMID:21239383; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/erq416>.
- Keller, M.,** 2010, *Botany and Anatomy*, p. 1-47, *The Science of Grapevines*, Keller, M. (Ed.), Academic Press, San Diego.
- Lee SH, Cho H-T.** 2009, Auxin and the Root Hair Morphogenesis. *In* *Root Hairs*, AM Emons and T Ketelaar (ed.) Springer Publishers, Berlin.
- Lee, M., K. Lee, J. Lee, E. W. Noh, Y. Lee.** 2005, AtPDR12 Contributes to Lead Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138(2): 827-836.
- Lewis DR, Miller ND, Splitt BL, Wu G, Spalding EP.** 2007, Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell*, 19:1838- 50; PMID: 17557805; <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.051599>.
- Li Y, Prinz WA.** 2004, ATP-binding cassette (ABC) transporters mediate nonvesicular, raft-modulated sterol movement from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 279:45226-34; PMID: 15316012; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M407600200>.
- Liang, Z., Owens, C. L., Zhong, G.-Y., & Cheng, L.** 2011, Polyphenolic profiles detected in the ripe berries of *Vitis vinifera* germplasm. *Food Chemistry*, 129(3), 940–950. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.050>.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Licht, A. and E. Schneider** 2011, ATP binding cassette systems: structures, mechanisms, and functions. *Central European Journal of Biology* 6(5): 785-801.
- Linton, K. J., M. F. Rosenberg, I. D. Kerr, C. F. Higgins.** 2003, Structure of ABC Transporters, In *ABC Proteins* (I. B. Holland, P. C. C. Susan, K. Karl, S. P. C. C. K. K. Christopher F. Higgins I. Barry Holland and F. H. Christopher eds). Academic Press pp. 65-80, London.
- Liu, G., Sanchez-Fernandez, R., Li, Z. S., and Rea, P. A.,** 2001, Enhanced multispecificity of arabidopsis vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, *AtMRP2*, *J Biol Chem* 276, p. 8648-56.
- Locher, K. P.** 2004, Structure and mechanism of ABC transporters. *Current Opinion in Structural Biology* 14(4): 426-431.
- Lodish, H., A. Berk, P. Matsudaira, C. Kaiser, M. Krieger, M. Schott, L. Zipursky, J. Darnell.** 2003, *Biomembranes and Cell Architecture*, In *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company pp. 147-196 New York.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., Amon, A., and Scott, M. P.,** 2013, *Biomembrane Structure*, p. 464-472, *Molecular Cell Biology*, W. H. Freeman, New York.
- Mentewab, A. and C. N. Stewart** 2005, Overexpression of an Arabidopsis thaliana ABC transporter confers kanamycin resistance to transgenic plants. *Nat Biotech* 23(9): 1177-1180.
- Monod, J.** 1942, *Recherches sur la croissance des culture bactériennes*. Hermann, Editeurs des Sciences et des Arts; Paris,
- Moons, A.** 2003, Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Letters* 553(3): 370-376.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Neijsel, OM.; Teixeira de Mattos, MJ.; Tempest, DW.** 1996, *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, FC., editor. ASM Press; Washington, D.C. p. 1283-1692.
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP.** 2001, Multidrug resistance- like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. Plant Cell, 13:2441-54; PMID:11701880.
- Okada K, Ueda J, Komaki MK, Bell CJ, Shimura Y.** 1991, Requirement of the auxin polar transport system in the early stages of Arabidopsis floral bud formation. Plant Cell 3: 677–684.
- Oswald, C., I. Holland, L. Schmitt.** 2006, The motor domains of ABC-transporters. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 372(6): 385-399.
- Otsu, C. T., I. da Silva, J. B. de Molfetta, L. R. da Silva, J. de Almeida-Engler, G. Engler, P. C. Torraca, G. H. Goldman, M. H. Goldman,** 2004, NtWBC1, an ABC transporter gene specifically expressed in tobacco reproductive organs. Journal of Experimental Botany 55(403): 1643-1654.
- Petrasek J, Friml J.** 2009, Auxin transport routes in plant development. Development, 136:2675-88; PMID:19633168; <http://dx.doi.org/10.1242/dev.030353>.
- Phillips R, Quake SR.** 2006, The biological frontier of physics. Physics Today, 59:38–43.
- Purves, W., D. Sadava, G. Orians, C. Heller.** 2000, Cellular Membranes. Life: The Science of Biology. W. H. Freeman pp. 74-94 Virginia.
- Rea, P. A.** 2007, Plant ATP-Binding Cassette Transporters. Annual Review of Plant Biology 58(1): 347-375.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rea, P. A., R. Sanchez-Fernandez, S. Chen, M. Peng, M. Klein, M. Geisler, E. Martinoia,** 2003, The Plant ABC Transporter Superfamily: The Functions of a Few and Identities of Many, In ABC Proteins (I. B. Holland, P. C. C. Susan, K. Karl, S. P. C. C. K. K. Christopher F. Higgins I. Barry Holland and F. H. Christopher eds.), Academic Press pp. 335-355 London.
- Rees, D. C., E. Johnson, O. Lewinson.** 2009, ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(3): 218-227.
- Robinson, S. P., & DAVIES, C.** 2000. Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 175-188.
- Rojas-Pierce M, Titapiwatanakun B, Sohn EJ, Fang F, Larive CK, Blakeslee J, Cheng Y, Cutler SR, PeerWA, Murphy AS, Raikhel NV.** 2007, Arabidopsis P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Chem Biol* 14: 1366–1376.
- Sadava, D., Hillis, D., Heller, H. C., and Berenbaum, M.,** 2011a, Cell Membranes, p. 105-127, *Life - The Science of Biology*, W. H. Freeman and Company.
- Sanchez-Fernandez, R., T. G. E. Davies, J. O. D. Coleman, P. A. Rea.** 2001, The Arabidopsis thaliana ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *Journal of Biological Chemistry* 276(32): 30231-30244.
- Sarmiento, C., Nigul, L., Kazantseva, J., Buschmann, M., and Truve, E.,** 2006, AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing, *Plant Mol Biol* 61, p. 153-63.
- Schulz, B. and H. U. Kolukisaoglu** 2006, Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS Letters* 580(4): 1010-1016.
- Skou JC.** 1998, The identification of the sodium-potassium pump (Nobel Lecture). *Angew Chem Intl Ed* ;37:2321–2328.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Smart, C. C. and A. J. Fleming** 1996, Hormonal and Environmental Regulation of a Plant PDR5-like ABC Transporter. *Journal of Biological Chemistry* 271(32): 19351-19357.
- Stouthamer AH.** 1979, The search for correlation between theoretical and experimental growth yields. *Int Rev Biochem*, 21:1-47.
- Stukkens, Y., A. Bultreys, S. Grec, T. Trombik, D. Vanham and M. Boutry,** 2005, NpPDR1, a Pleiotropic Drug Resistance-Type ATP-Binding Cassette Transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, Plays a Major Role in Plant Pathogen Defense. *Plant Physiology* 139(1): 341-352.
- Symons GM, Chua Y-J, Ross JJ, Quittenden LJ, Davies NW, Reid JB.** 2012, Hormonal changes during non-climacteric ripening in strawberry. *J Exp Bot*, 63(13):4741-4750
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., 2007, *Membrane Structure*, p. 459-481, *Molecular Biology of the Cell*, Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. (Eds.), Garland Science, New York.
- Theodoulou, F. L.** 2000, Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1465(1,2): 79-103.
- Theodoulou, F. L.** 2000, Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 79-103.
- Titapiwatanakun B, Murphy AS.** 2009, Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J Exp Bot*, 60:1093-107; PMID:18824505; <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ern240>.
- Varadi, A., G. E. Tusnady, B. Sarkadi.** 2003, Membrane Topology of the Human ABC Transporter Proteins, In *ABC Proteins* (I. B. Holland, P. C. C. Susan, K. Karl, S. P. C. C. K. K. Christopher F. Higgins I. Barry Holland and F. H. Christopher eds). Academic Press, London, 37-46pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Verrier, P. J., D. Bird, B. Burla, E. Dassa, C. Forestier, M. Geisler, M. Klein, U. Kolukisaoglu, Y. Lee, E. Martinoia, A. Murphy, P. A. Rea, L. Samuels, B. Schulz, P. E. Spalding, K. Yazaki, F. L. Theodoulou.** 2008, Plant ABC proteins: a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13(4): 151-159.
- Vivier, M. A., & Pretorius, I. S.** 2002, Genetically tailored grapevines for the wine industry. *Trends in Biotechnology*, 20(11), 472–478.
- Xu, X. M. and S. G. Möller** 2004, AtNAP7 is a plastidic SufC-like ATP-binding cassette/ATPase essential for Arabidopsis embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(24): 9143-9148.
- Yazaki, K.** 2005, Transporters of secondary metabolites. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 301–307.
- Yazaki, K., N. Shitan, A. Sugiyama, K. Takanashi.** 2009, Cell and Molecular Biology of ATP-Binding Cassette Proteins in Plants. *International Review of Cell and Molecular Biology*. W. J. Kwang, Academic Press. Volume 276: 263-299.
- Zazimalova E, Murphy AS, Yang H, Hoyerova K, Hosek P.** 2010, Auxin transporters--why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a001552; PMID:20300209; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001552>.
- Zazimalova E, Murphy AS, Yang H, Hoyerova K, Hosek P.** 2010, Auxin transporters--why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a001552; PMID:20300209; <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a001552>.
- Zhu, Y.-Q., K.-X. Xu, B. Luo, J.-W. Wang, X.-Y. Chen.** 2003, An ATP-Binding Cassette Transporter GhWBC1 from Elongating Cotton Fibers. *Plant Physiology* 133(2): 580-588.

ÖZGEÇMİŞ

19 Mart 1989'da Urmia / İran'da doğdu, 2007 yılında başladığı Urmia Üniversitesi Ziraat fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünden 2011 yılında mezun oldu. 2013 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı. Yüksek lisans eğitimi sırasında "2014-ZRF-001" no'lu proje kapsamında Bahçe Bitkileri Bölümü'nde laboratuvar çalışmalarını gerçekleştirdi.

