

Birsen ÇAKIR

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri
Bölümü, 35100 Bornova, İzmir,
e-posta: birsencakir@hotmail.com

Asmada (*Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz) Bax İnhibitor-1 Geninin İzolasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu

Isolation and molecular characterization of Bax İnhibitor-1
Gene from Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Sultanina)

Alınış (Received):11.04.2012

Kabul tarihi (Accepted): 03.09.2012

Anahtar Sözcükler:

Programlanmış hücre ölümü, Bax inhibitör-1, *Vitis vinifera*

Key Words:

Programmed cell death, Bax İnhibitor-1, *Vitis vinifera*

ÖZET

Programlanmış hücre ölümü (PCD) canlılarda, gelişmede ve çevresel stres faktörlerinin etkisi ile zarar görmüş hücrelerin elimine edilmesinde önemli bir fizyolojik olaydır. Bax inhibitör-1 (BI-1) proteininin hücre ölümünü engellediği ve ökaryotlarda yüksek oranda korunduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, *Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz çeşidinin üzüm tanelerinden gen izole edilmiş ve *VvBI-1* olarak adlandırılarak gen bankasına kayıt altına alınmıştır. Olası *VvBI-1* geninin protein kodlayan kısmı 747 bp uzunluğundadır ve protein büyüklüğü de 248 aa olarak bulunmuştur. *VvBI-1* protein dizisinin 27,290 kDa büyüklüğünde olduğu ve olası izoelektrik noktasının da 8,62 olduğu öngörülmüştür. Farklı gelişme dönemlerinde hasat edilmiş üzüm tanelerinden semi quantitative RT-PCR analizi ile *VvBI-1* geninin ifade profili çıkarılmış ve *VvBI-1* ifadesinin yüksek oranda ve tüm gelişme dönemlerinde var olduğu gözlemlenmiştir.

ABSTRACT

Programmed cell death (PCD) is a physiological process important during development and elimination of damaged cells upon environmental stresses in living organism. It has been demonstrated that Bax inhibitor-1 (BI-1) is a cell death suppressor, and conserved in eukaryotes. In this study, a cDNA encoding BI-1 from *Vitis vinifera* cv. Sultanina berries was isolated and submitted to the NCBI GenBank as *VvBI-1*. This gene contains an open reading frame of 747 bp. The ORF of the gene encodes 248 aa with an estimated molecular mass of 27,290 kDa and isoelectric point of 8.62. The expression profile of the *VvBI-1* was investigated by semi quantitative RT-PCR in different developmental stages of berries. The transcript of *VvBI-1* was highly detected at all stages of development.

GİRİŞ

Programlanmış hücre ölümü (Programmed Cell Death/PCD) hücrelerin içsel ve dışsal etkilere bağlı olarak, genetik olarak kontrollü bir şekilde kendilerini öldürmeleri şeklinde tanımlanır (Pennell and Lamb 1997; Hückelhoven 2004; Reape et al., 2008; Kacprzyk et al., 2011). Bu süreç çok hücreli canlıların gelişiminde iş görerek gelişime bağlı olarak belirli dokuların oluşması ve belirli dokuların elimine edilmesi şeklinde görülebileceği gibi zarar gören veya patojen istilasına uğramış hücrelerin öldürülmesi şeklinde de görülebilir (Pennell and Lamb 1997; Kacprzyk et al. 2011). PCD

genel ifade ile genetik olarak sıkı bir şekilde kontrol edilen apoptozu (Tip I) ve otofajiyi (Tip II) tanımlarken hücrenin ozmotik regülasyon yeteneğini kaybederek ölmesi olayı nekrosizi (Tip III) tanımlamaz (Lockshin and Zakeri 2004; Bras et al., 2005).

Apoptoz içsel ve dışsal etkiler tarafından tetiklenerek hücre içinde ki caspase (Cysteine-dependent ASPartate-directed proteASES) proteinlerinin aktive edilmesi ile meydana gelir. Caspase hücre içerisinde inaktif olarak bulunurlar ve aktive edilerek diğer proteinlerin kesilerek parçalanması ile hücre ölümünü gerçekleştirirler (Pecorino 2008). Hayvan

hücrelerinde apoptoz genel olarak hücrelerin büzüşmesi, çekirdeğin parçalanması ve sonuçta hücrenin küçük yapılar bölünerek fagositoz yolu ile ortadan kaldırılması adımlarından oluşur (Pecorino 2008; Kacprzyk et al., 2011).

Apoptozun içsel etkiler ile kontrolü BCL-2 adı verilen protein ailesi tarafından kontrol edilir. Bu protein ailesinin bireyleri apoptoz öncülü ve karşıtı olmak üzere iki farklı görev üstlenen alt ailelere ayrılmaktadır (Lockshin and Zakeri 2004; Pecorino 2008). Bu proteinlerden BCL-2 ve BCL-XL apoptozu durdurma yönünde görev alırken Bax ve Bak ise apoptozu destekleme yönünde görev alırlar (Hückelhoven 2004; Lockshin and Zakeri 2004; Pecorino 2008; Henke et al., 2011).

Bitkilerde ise apoptoz benzer bir mekanizma (apoptotic-like PCD) ile kontrol edilir fakat hücre duvarının varlığından dolayı küçük yapıların oluşumu ve fagositoz adımı görülmez (Danon et al., 2000; Hückelhoven 2004). Ayrıca apoptozun kontrol edilmesinde bitkilerde BCL-2 ailesi evrimsel olarak korunmamıştır (Hückelhoven 2004). Diğer taraftan BCL-2 ailesi içerisinde yer alan ve apoptozun durdurulmasında görev alan Bak proteininin inhibitörü olan Bax inhibitörü (BI-1) bitkilerde bulunmaktadır ve memeli analogları ile yüksek derecede benzerlik göstermektedir (Kawai et al., 1999; Hückelhoven 2004; Henke et al., 2011; Kacprzyk et al., 2011).

BI-1 hem yapısal hem de aldığı görevlere bağlı evrimsel yönden oldukça korunmuş bir proteindir. BI-1 apoptozda salınan Ca^{++} miktarını düzenleyerek apoptozu baskılamada görev alır. Bu görevi Bax ve BCL-XL proteinlerinin aktivitelerini baskılayarak yapar (Kawai et al., 1999; Henke et al., 2011). Örneğin *Arabidopsis thaliana* BI-1 geninin mayada endoplazmik retikulumla bağlı apoptozun baskılanmasında görev aldığı gösterilmiştir (Watanabe and Lam 2008). Diğer taraftan *Capsicum annuum* BI-1 proteininin transgenik tütünde ifade edilmesi bitkinin sıcaklık ve kuraklık gibi abiyotik streslere direnç geliştirdiğini ve bu stresler doğrultusunda BI-1'in kontrol edildiği gösterilmiştir (İsbat et al., 2009). Bununla beraber birçok bitkide BI-1 proteininin hücre canlılığını artırdığı ve apoptozu durdurduğu gösterilmiştir (Bolduc and Brisson 2002; Coupe et al., 2004).

Bu çalışmada *Vitis vinifera* cv. Sultanina çeşidinden BI-1 geninin izolasyonu ve üzüm tanelerinde tane tutumundan aşırı olgunlaşma dönemine kadar geçen farklı evrelerdeki *VvBI-1* geninin ifade profili

çkarılmıştır. Ayrıca *VvBI-1* geni ve olası protein dizisinin biyoinformatik analizleri de yapılmıştır.

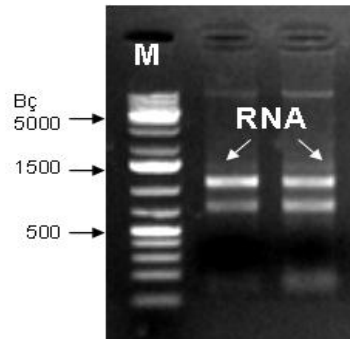
MATERYAL VE YÖNTEM

Bitki Materyali

Üzüm taneleri Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Menemen Araştırma ve Uygulama Çiftliği bağ alanında bulunan *Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz çeşidinden 2008 yılında 26 Mayıs - 17 Eylül tarihleri arasında 2 hafta aralıklarla hasat edilmiş ve derhal sıvı azota daldırılıp laboratuvara getirilerek, RNA izolasyonuna kadar -80 °C de saklanmıştır.

Primer Tasarımı ve *VvBI-1* Geninin İzolasyonu

VvBI-1 geninin cDNA'sının üretimi için gerekli primerler "CAN77748.1" NCBI GenBank numaralı protein dizisi ve bu proteinin kodlanması için gerekli cDNA bilgisini içeren "AM487249.2" NCBI GenBank numaralı tüm genom shotgun DNA dizisi içerisinde tasarlanmıştır (Velasco et al., 2007). Tasarlanan *VvBI-1F* (5'/TCAATGGAGGCGTTCTCTGCGTTT/3') ve *VvBI-1R* (5'/TCAATTTCTCTTTTCTTCTTCTT/3') primerleri kullanılarak *Vitis vinifera* cv. Sultani Çekirdeksiz'den izole edilen toplam RNA'dan olası *VvBI-1* protein kodlama dizisinin cDNA'sı elde edilmiştir. cDNA üretimi için PCR şartları 94°C'de 2 dakika ilk adım ve sonrasında 25 döngü olacak şekilde 94 °C'de 45 saniye, 62°C'de 30 saniye ve 72°C'de 2 dakika, son adımda da 72°C'de 10 dakika olacak şekilde kullanılmıştır. Üretilen PCR ürünü agaroz jelden saflaştırılarak pGEMT-Easy klonlama vektörüne klonlanmıştır. Klonlanan parçanın dizi analizi Refgen Merkezi (Ankara, Türkiye) tarafından yapılmış ve dizi bilgisinin benzerlik analizleri NCBI Blast aracı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) kullanılarak yapılmıştır.



Şekil 1. Üzüm tanelerinden elde edilen toplam RNA'nın agaroz jel görüntüsü. M: markör (Fermentas 1 kb plus) 1 ve 2: 06.08.2008 tarihinde hasat edilmiş üzümlerden elde edilen toplam RNAlar.

Figure 1. Visualization of total RNA isolated from grape berries on agarose gel. M: Marker (Fermentas 1 kb plus) 1 and 2: Total RNA isolated from berries harvested at 06.08.2008.

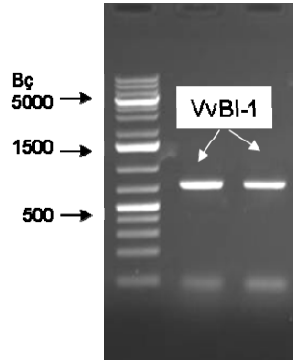
RNA İzolasyonu ve Semi Quantitative RT-PCR

Toplam RNA izolasyonu Davies ve Robinson (1996) tarafından tanımlanan metot kullanılarak, 2M LiCl ile 16 saat çöktürme adımı eklenerek yapılmıştır (Davies and Robinson 1996). İzole edilen toplam RNA "RNase free DNaseI (Fermentas, USA)" ile muamele edilerek olası DNA kirliliği uzaklaştırılmış ve devamında "RNeasy Purification Kit (Qiagen, Germany)" kullanılarak RNA saflaştırılmıştır. 20 µl son hacimde 2 µg saf RNA'dan "The RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, USA)" kullanılarak cDNA sentezi yapılmıştır.

RT reaksiyonu sonucu sentezlenen cDNA 5 kat seyreltilerek PCR'da kalıp olarak kullanılmıştır. *VvBI-1* için ve PCR içsel kontrolü için kullanılan primerler şu şekildedir: *VvBI-1* ileri yönlü primeri *VvBI-1F* 5'/TCAATGGAGGCGTTCTCTGCGTTT/3' ve geri yönlü primeri *VvBI-1R* 5'/TCAATTTCTCC TTTTCTTCT TCTT/3'; Aktin ileri yönlü primeri *VvActinF* 5'/GGCACATTCTACAATGAGCTTCG/3' ve geri yönlü primeri *VvActinR* 5'/AGAGGACTTCTGGACAACGG/3'. PCR 25 µl son hacimde kalıp olarak 1 µl cDNA (5 kat seyreltilmiş), ileri ve geri yönlü primerlerden 0,2 µl, 0,2 µl "Dream Taq" DNA polimeraz enzimi, 2,5 µl 10X "Dream Taq" PCR tamponu olacak şekilde kurulmuştur. PCR şartları ise ilk adımda 94 °C 3 dakika, sonrasında 18 döngü olacak şekilde 95 °C'de 20 saniye, 62 °C'de 45 saniye ve 72 °C'de 2 dakika ve son adımda 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Üzüm tanelerindeki *VvBI-1* ve *VvAktin* transkriptlerinin varlığı 18 döngü sonucunda lineer çoğalma tespiti edilmiştir. PCR sonuçları %1'lik agaroz jelde ayrılmıştır. Oluşan ürün bantlarının yoğunluğu Bio1D (Vilber Lourmat) programı ile belirlenmiştir. Birbirinden bağımsız üç deneyde de benzer sonuçlar alınmıştır.

Motif Analizleri

Motif analizleri Prosite (<http://prosite.expasy.org/>) veri tabanında *VvBI-1* geninin kodladığı olası protein dizisi kullanılarak analiz edilmiştir. Analizde yüksek olasılıkla rastlanan motifler seçeneği de seçilerek tüm motiflerin analizi yapılmıştır. Ortolog analizi varsayılan ayarlar kullanılarak PHOG 1.1 (<http://makana.berkeley.edu/phog/>) veri tabanı kullanılarak yapılmıştır (Datta et al., 2009). Dikey hiza analizinde karakterize edilmiş farklı bitkilere ait BI-1 genlerinin protein dizileri kullanılmıştır.



Şekil 2. *VvBI-1* genine ait RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.
Figure 2. Visualization of RT-PCR products of *VvBI-1* gene on agarose gel

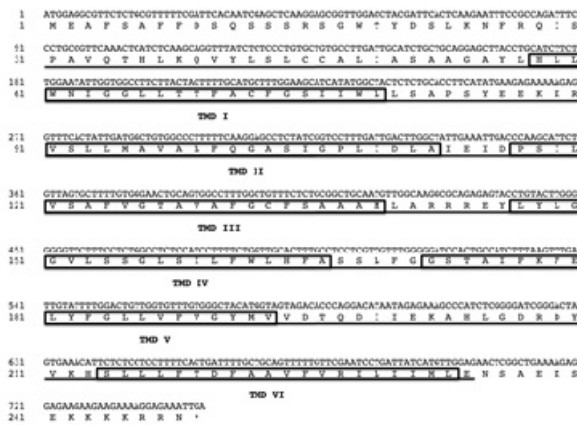
BULGULAR VE TARTIŞMA

İyi kalitede saflaştırılmış RNA'nın elde edilmesi, RT-PCR, Northern Blot ve RACE-PCR gibi moleküler uygulamalar için önemli bir aşamadır. Üzüm taneleri RNA saflığını olumsuz yönde etkileyen polisakkarit ve fenolik bileşikler içerirler. Bu çalışmada iyi kalitede RNA'nın elde edilmesinde Davies ve ark. (1996) geliştirmiş olduğu teknik (Davies and Robinson 1996) değiştirilerek kullanılmıştır (Şekil 1). Şekil 1 de görüldüğü gibi 28S ve 18S RNA bantlarının düzgün ve temiz bir şekilde olduğu ve 28S/18S oranının yaklaşık 2:1 olduğu saptanmıştır. Elde edilen toplam RNA RT-PCR analizinde kullanılmak üzere cDNA sentezinde kullanılmıştır.

Bax'ın neden olduğu hücre ölümünü durduran "Bax inhibitör-1" geni ilk olarak memeli proteinlerinin mayada pozitif seleksiyon yöntemiyle taranması ile aktivitesi gösterilerek Xu ve Reed (1998) tarafından izole edilmiştir (Xu and Reed 1998). Sonuç olarak BI-1 homologları farklı bitki türlerinden klonlanmış ve karakterize edilmişlerdir (Bolduc et al., 2003; Coupe, et al., 2004; Isbat et al., 2009). Asmada BI-1 geni *Vitis vinifera* 8X genomu (Genoscope) taranarak olası gen dizileri çıkarılmıştır. Olası *VvBI-1* geninin nükleotid dizisi gene özgül primerler tasarlanarak RT-PCR analizinde kullanılmış ve yaklaşık olarak 750 bp uzunluğunda bir bant elde edilmiştir (Şekil 2). Bant jelden kesilerek "Qiagen Gel Extraction Kit" ile saflaştırılmış, "pGEMT Easy" klonlama vektörüne aktarılmış ve dizi analizi ile analiz edilmiştir. DNA dizi analizi sonucuna göre BI-1 geninin açık okuma çerçevesi 747 bp olarak bulunmuştur (Şekil 3). BLAST ile analizi yapılan dizinin bitki Bax inhibitörü proteinleri ile benzerliği görülmüş ve NCBI GenBank

database BankIt1526151 Seq1 JQ863362 numarası altında kayıtlanmış ve *VvBI-1* olarak adlandırılmıştır.

Olası *VvBI-1* geninin protein kodlayan kısmı 747 bp uzunluğundadır ve protein büyüklüğü de 248 aa olarak bulunmuştur (Şekil 3). *VvBI-1* protein dizisinin *in silico* analizine göre proteinin 27,290 kDa büyüklüğünde olduğu ve olası izoelektrik noktasının da 8,62 olduğu öngörülmüştür. BI-1 25-27 kDa büyüklüğe sahip, 6 veya 7 transmembran bölge içeren küçük bir protein olup çoğunlukla ER membranına lokalize olur (Xu and Reed 1998; Bolduc et al., 2003; Eichmann et al., 2004; Kawai-Yamada et al., 2004). *VvBI-1* 27,29 kDa molekül ağırlığı ile BI-1 proteinlerinin karakteristiğini taşımaktadır.

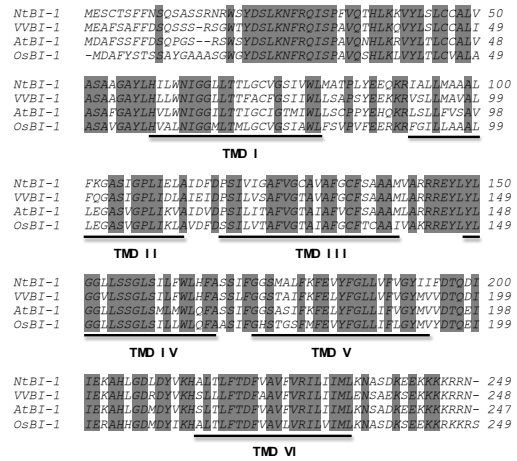


Şekil 3. *VvBI-1* genine ait nükleotid ve olası amino asit dizisi. TMD I, II, III, IV, V, VI transmembran bölgeleri işaret etmektedir. BI-1 protein imzası 31-236 amino asit arasında bulunup altı çizili bir şekilde gösterilmiştir.

Figure 3. Nucleotide and amino acid deduced sequence of *VvBI-1*. TMD I, II, III, IV, V, VI indicate transmembrane domains. The BI-1 domain between 31-236 amino acids is underlined.

VvBI-1 proteininin birincil yapısı diğer bitkilerden elde edilen BI-1 proteinlerin birincil yapıları dikey hiza analizi ile karşılaştırılmış ve yüksek oranda korunmuş bölgeler işaretlenmiştir (Şekil 4). *VvBI-1* protein dizisinin BLASTp ile analizi sonucunda, *VvBI-1*'in *Arabidopsis thaliana* BI-1 proteini (AED95473.1) ile olan benzerliği % 78, *Oryza sativa* BI-1 proteini (BAA89540.3) ile olan benzerliği % 65 ve *Nicotiana tabacum* BI-1 proteini (AAK73102.1) ile olan dizi benzerliği ise % 79 olarak bulunmuştur. TMHMM veri tabanında yapılan analize göre (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) olası *VvBI-1* proteininin 6 adet transmembran bölge içerdiği gösterilmiştir (Şekil 3). Şekil 4'te de görüldüğü gibi

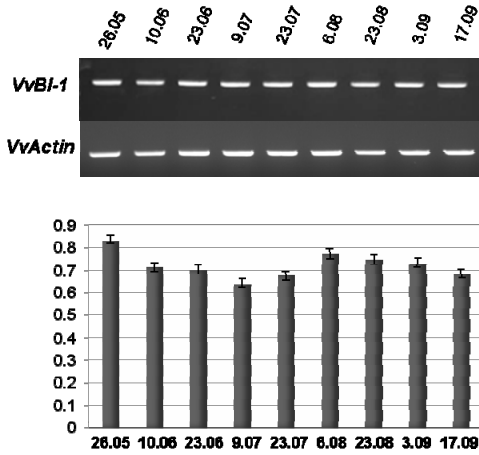
transmembran bölgelerin farklı bitki türlerinin BI-1 proteinlerinde de korunduğu görülmüştür. AtBI-1 proteini 6 veya 7 transmembran bölgesi içermekte ve hücre ölümünü engellediği gösterilmiş C-terminal bölgesinin calmodilin bağlanma bölgesini bulundurduğu kanıtlanmıştır (Ihara-Ohori et al., 2007). *VvBI-1* proteininin C-terminal bölgesi diğer BI-1 ve AtBI-1 proteinleriyle karşılaştırıldığında yüksek oranda korunduğu görülmüştür (Şekil 4). Amino asit dizilerindeki benzerliğin C-terminal bölgede de korunmuş olması benzer fonksiyonlara sahip olduklarını düşündürmektedir.



Şekil 4. *VvBI-1* ve diğer bitki BI-1 proteinlerinin dikey hizası. Korunmuş bölgeler gri olarak gösterilmiştir. Transmembran bölgeler altı çizilerek roma rakamlarıyla işaret edilmiştir. *Arabidopsis thaliana*, AtBI-1 (AED95473.1); *Oryza sativa*, OsBI-1 (BAA89540.3); *Nicotiana tabacum*, NtBI-1 (AAK73102.1)
Figure 4. The deduced amino acid sequences of *VvBI-1* was aligned with BI-1 proteins from other plants. Conserved domains are shown in gray. Transmembrane domains are underlined and indicated by roman numerals. *Arabidopsis thaliana*, AtBI-1 (AED95473.1); *Oryza sativa*, OsBI-1 (BAA89540.3); *Nicotiana tabacum*, NtBI-1 (AAK73102.1)

Bitkilerden izole edilen BI-1 genleri farklı dokularda ifade edilirler, biyotik/abiyotik stres ve yaşlanma etkisi ile de ifadelerini artırır (Sanchez et al., 2000; Bolduc, Ouellet et al., 2003; Matsumura et al., 2003; Hüchelhoven 2004). BI-1 geninin aşırı ifade olması maya, memeli ve bitki hücrelerinde strese bağlı ölümü engellemesi, fonksiyonel olarak BI-1 geninin ökaryotlarda korunduğunu göstermektedir (Bolduc et al., 2003; Chae et al., 2003; Kawai-Yamada et al., 2004). Üzüm tanelerinde *VvBI-1* geninin ifade düzeylerini belirlemek için farklı gelişme dönemlerinde hasat edilmiş üzüm tanelerinden toplam RNA izole edilmiş ve elde edilen toplam RNA cDNA sentezinde

kullanılmıştır. RT-PCR analizi ile *VvBI-1* gen ifade profili çıkarılmıştır (Şekil 5). İçsel kontrol olarak ise *VvActin* geni kullanılmıştır. Şekil 5'te de görüldüğü gibi *VvBI-1* ifadesi yüksek oranda ve tüm gelişim dönemlerinde var olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 5. *Vitis vinifera* cv. Sultani çekirdeksiz'e ait farklı gelişim süreçlerindeki üzüm tanelerinde *VvBI-1* geninin semi quantitative RT-PCR analizi. Toplam RNA 2008 yılının 26 Mayıs ila 17 Eylül tarihleri arasında iki hafta ara ile toplanmış üzüm tanelerinden izole edilmiştir. 26 Mayıs=meyve tutumu, 6 Ağustos=ben düşme, 3 Eylül=olgunlaşma, 17 Eylül=aşırı olgunlaşma. *VvBI-1*'in göreceli ifade olma seviyesi *VvActin* bantlarına göre Bio1D (Vilber Lourmat) programı kullanılarak düzenlenmiştir. Sonuçlar üç farklı tekrar ile analiz edilmiştir ve standart sapma hata barları ile gösterilmiştir.

Figure 5. Semi quantitative RT-PCR analysis of *VvBI-1* at different stages of berries from *V. vinifera* cv. Sultanina. Total RNA was extracted from berries between 26th may and 17th september at two weeks interval in 2008 growing season. 26th may= fruit set, 6th july= veraison, 3th september= ripening, 17th september= overripening. The relative expression level of the *VvBI-1* was normalized with respect to the *VvActin* using Bio1D software (Vilber Lourmat). The data were analyzed by independent in triplicates and the Standard deviations were shown with error bars.

KAYNAKLAR

- Bolduc, N., and L. F. Brisson, 2002. Antisense down regulation of NtBI-1 in tobacco BY-2 cells induces accelerated cell death upon carbon starvation. *FEBS Letters* 532(1,2): 111-114.
- Bolduc, N., M. Ouellet, F. Pitre, and L. Brisson, 2003. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells. *Planta* 216(3): 377-386.
- Bras, M., B. Queenan and S.A. Susin, 2005. Programmed Cell Death via Mitochondria: Different Modes of Dying. *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 231-239.
- Chae, H.-J., N. Ke, H.-R. Kim, S. Chen, A. Godzig, M. Dickman and J.C. Reed, 2003. Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* 323(0): 101-113.

Programlanmış hücre ölümü (PCD) spesifik hücrelerin ölümünden sorumlu olup çok hücreli canlılarda büyüme ve gelişmenin önemli bir parçasını oluşturur (Ellis and Horvitz 1986; Hengartner et al., 1992). Bitkilerde trake hücreleri, kök ucu bölgesi hücrelerinin gelişiminde (Kawai et al., 1998; Samarajeewa et al., 1999), üreme organlarının oluşumunda, karpellerin ve yaprakların yaşlanmasında, patojenlere karşı dayanımda PCD en önemli karakteristiği oluşturur (Pennell and Lamb 1997). Memelilerde ve *C. elegans* ta PCD yi engelleyen *dad1* geninin (Nakashima et al., 1993) bitki homoloğunun bezelyede yaşlı yapraklarda ifade düzeyi azalmıştır (Orzaez and Granell 1997). Ayrıca Lacomme ve Santa Cruz memelilerde hücre ölümünü sağlayan Bax'ın bitkilerde ifadesi ile hücre ölümünün meydana geldiğini göstermiştir (Lacomme and Santa Cruz 1999). Bu bulgular bitkilerde ve hayvan hücrelerinde benzer PCD mekanizmalarının olabileceğini düşündürmektedir.

Abiyotik stres bitki üretimini sınırlandıran en önemli faktör olup, PCD'nin abiyotik stres altındaki bitkilerde rolü incelenmiştir (Isbat et al., 2009). *BI-1* geninin ektopik ifadesinin çeşitli abiyotik stres altındaki bitkilerdeki PCD yi önlemesi (Chae et al., 2003; Watanabe and Lam 2006) bu gen ailesinin önemini vurgulamaktadır.

Bu çalışma ile ilk kez asmanın genomu taranarak bitki BI-1 genleriyle yüksek oranda benzerlik gösteren *VvBI-1* geni izole edilmiş ve biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Asmada *BI-1* genlerinin fonksiyonel analizlerini gerçekleştirebilmek için *VvBI-1* geninin izolasyonu önemli bir adımı oluşturmaktadır.

- Coupe, S. A., L. M. Watson, D.J. Ryan, T.T. Pinkley and J.R. Eason, 2004. Molecular analysis of programmed cell death during senescence in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea*: cloning broccoli LSD1, Bax inhibitor and serine palmitoyltransferase homologues. *Journal of Experimental Botany* 55(394): 59-68.
- Danon, A., V. Delorme, N. Mailhac and P. Gallois, 2000. Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* 38(9): 647-655.
- Datta, R. S., C. Meacham, B. Samad, C. Neyer and K. Sjalander, 2009. Berkeley PHOG: PhyloFacts orthology group prediction web server. *Nucleic Acids Research* 37(suppl 2): W84-W89.
- Davies, C. and S.P. Robinson, 1996. Sugar Accumulation in Grape Berries (Cloning of Two Putative Vacuolar Invertase cDNAs and Their Expression in Grapevine Tissues). *Plant Physiology* 111(1): 275-283.

- Eichmann, R., H. Schultheiss, K.H. Kogel and R. Hükelhoven, 2004. The Barley Apoptosis Suppressor Homologue Bax Inhibitor-1 Compromises Nonhost Penetration Resistance of Barley to the Inappropriate Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(5): 484-490.
- Ellis, H. M. and H. R. Horvitz, 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44(6): 817-829.
- Hengartner, M. O., R. Ellis and R. Horvitz, 1992. *Caenorhabditis elegans* gene *ced-9* protects cells from programmed cell death. *Nature* 356(6369): 494-499.
- Henke, N., D. A. Lisak, L. Schneider, J. Habicht, M. Pergande and A. Methner, 2011. The ancient cell death suppressor BAX inhibitor-1. *Cell Calcium* 50(3): 251-260.
- Hükelhoven, R., 2004. BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives. *Apoptosis* 9(3): 299-307.
- Ihara-Ohori, Y., M. Nagano, S. Muto, H. Uchimiya and M. Kawai-Yamada, 2007. Cell Death Suppressor Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Is Associated with Calmodulin Binding and Ion Homeostasis. *Plant Physiology* 143(2): 650-660.
- Isbat, M., N. Zeba, S.R. Kim and C.B. Hong, 2009. A BAX inhibitor-1 gene in *Capsicum annuum* is induced under various abiotic stresses and endows multi-tolerance in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 166(15): 1685-1693.
- Kacprzyk, J., C. T. Daly and P.F. McCabe, 2011. The Botanical Dance of Death: Programmed Cell Death in Plants. *Advances in Botanical Research*. K. Jean-Claude and D. Michel, Academic Press. Volume 60: 69-261.
- Kawai, M., L. Pan, J.C. Reed and H. Uchimia, 1999. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax Inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Letters* 464(3): 143-147.
- Kawai, M., P. K. Samarajeewa, R.A. Barrero, M. Nishiguchi and H. Uchimiya, 1998. Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots. *Planta* 204(3): 277-287.
- Kawai-Yamada, M., Y. Ohori and H. Uchimiya, 2004. Dissection of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 Suppressing Bax "Hydrogen Peroxide and Salicylic Acid" Induced Cell Death. *The Plant Cell Online* 16(1): 21-32.
- Lacomme, C. and S. Santa Cruz, 1999. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(14): 7956-7961.
- Lockshin, R. A. and Z. Zakeri, 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36(12): 2405-2419.
- Matsumura, H., S. Nirasawa, A. Kiba, N. Urasaki, H. Saitoh, M. Ito, M. Kawai-Yamada, H. Uchimiya and R. Terauchi, 2003. Overexpression of Bax inhibitor suppresses the fungal elicitor-induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) cells. *The Plant Journal* 33(3): 425-434.
- Nakashima, T., T. Sekiguchi, A. Kuraoka, K. Fukushima, Y. Shibata, S. Komiyama and T. Nishimoto, 1993. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DADI, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology* 13(10): 6367-6374.
- Orzaez, D. and A. Granell, 1997. The plant homologue of the defender against apoptotic death gene is down-regulated during senescence of flower petals. *FEBS Letters* 404(2,3): 275-278.
- Pecorino, L., 2008. Apoptosis. *Molecular Biology of Cancer - Mechanisms Targets and Therapeutics*. London, Oxford: 137-160.
- Pennell, R. and C. Lamb, 1997. Programmed Cell Death in Plants. *The Plant Cell* 9: 1157-1168.
- Reape, T. J., E. M. Molony and P.F. McCabe, 2008. Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* 59(3): 435-444.
- Samarajeewa, P. K., R. A. Barrero, C. Umeda-Hara, M. Kawai and H. Uchimiya, 1999. Cortical cell death, cell proliferation, macromolecular movements and Tip1; expression pattern in roots of rice (*Oryza sativa*; L.) under NaCl stress. *Planta* 207(3): 354-361.
- Sanchez, P., M. De Torres Zabala and M. Grant, 2000. AtBI-1, a plant homologue of Bax Inhibitor-1, suppresses Bax-induced cell death in yeast and is rapidly upregulated during wounding and pathogen challenge. *The Plant Journal* 21(4): 393-399.
- Velasco, R., A. Zharkikh, M. Troggio, D.A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss, M. Pindo, L.M. Fitzgerald, S. Vezzulli, J. Leid, G. Malacarne, D. Iliev, G. Coppola, B. Wardell, D. Micheletti, T. Macalma, M. Facci, J.T. Mitchell, M. Perazzolli, G. Eldredge, P. Gatto, R. Oyzerski, M. Moretto, N. Gutin, M. Stefanini, Y. Chen, C. Segala, C. Davenport, L. Dematti, A. Mraz, J. Battilana, K. Stormo, F. Costa, Q. Tao, A. Si-Ammour, T. Harkins, A. Lackey, C. Perbost, B. Taillon, A. Stella, V. Solovyev, J.A. Fawcett, L. Sterck, K. Vandepoele, S.M. Grando, S. Toppo, C. Moser, J. Lanchbury, R. Bogden, M. Skolnick, V. Sgaramella, S.K. Bhatnagar, P. Fontana, A. Gutin, Y. Van de Peer, F. Salamini and R. Viola, 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *PLoS ONE* 2(12): e1326.
- Watanabe, N. and E. Lam, 2006. Arabidopsis Bax inhibitor-1 functions as an attenuator of biotic and abiotic types of cell death. *The Plant Journal* 45(6): 884-894.
- Watanabe, N. and E. Lam, 2008. Arabidopsis bax inhibitor-1: A rheostat for ER stress-induced programmed cell death. *Plant Signaling & Behavior* 3(8): 564-566.
- Xu, Q. and J. C. Reed, 1998. Bax Inhibitor-1, a Mammalian Apoptosis Suppressor Identified by Functional Screening in Yeast. *Molecular Cell* 1(3): 337-346.