

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

***ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH TÜRÜNDE**
TUZ STRESİNİN
GEN ANLATIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Öznur TANRIVERDİ
Biyoloji Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: **08/02/2010**

Tez Danışmanı:
Doç. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

ÖZNUR TANRIVERDİ tarafından DOÇ. DR. CÜNEYT AKI yönetiminde hazırlanan “*ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH TÜRÜNDE TUZ STRESİNİN GEN ANLATIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Cüneyt AKI

Yönetici

Doç. Dr. Hakan TURHAN

Jüri Üyesi

Yard. Doç. Dr. Kemal Melik TAŞKIN

Jüri Üyesi

Sıra No:.....

Tez Savunma Tarihi: 08/02/2010

Prof. Dr. Ahmet ERDEM

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI

Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Adı Soyadı: Öznur TANRIVERDİ

TEŞEKKÜR

Yolumu açarak bana bu konuda çalışma fırsatı sağlayan, fikirleriyle beni aydınlatan ve her zaman desteğini yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam; Moleküler Biyoloji Anabilimdalı Baőkanı Doç. Dr. Cüneyt AKI'ya saygımı ve teőekkürümü sunarım. Yüksek lisans projemin ilerlemesinde katkısı ve yardımını bulunan sayın Doktor Konstantinos E. VLACHONASIOS'a teőekkürü bir borç bilirim. Yardımlarını ve manevi desteklerini benden esirgemeyen değerli hocalarım, Arő. Gör. Nurően ÇÖRDÜK, Arő. Gör. Sibel YILMAZ, Doęan İLHAN ve sevgili arkadaşlarım Meltem TEZCAN, Damla ERDEN ve Yakup GÜNER'e teşekkür ederim.

Erasmus İkili Anlaőması kapsamında Yüksek lisans tez projemin desteklendiği Aristotle University of Thessaloniki School of Biology'ye ve bu üniversiteye ait Biyoloji laboratuvarında dostça iletişim ve yardımları için Athanasios KALDIS'e teşekkür ederim.

Her zaman sevgilerini yanımda hissettiğim, babam İbrahim TANRIVERDİ, annem Gülsen TANRIVERDİ, ablam Özlem TANRIVERDİ, kardeőim Arif Övünç TANRIVERDİ'e ve dayım Kazım ÖZTÜRK'e bana her konuda destek oldukları, inandıkları ve güvendikleri için teşekkür ederim.

Öznur TANRIVERDİ

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ark	Arkadaşları
bç	Baz çifti
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribo Nükleaz
dNTP	Deoksiribo Nükleotid Trifosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
gr	Gram
Kb	Kilobaz
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
°C	Derece Santigrat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNaz	Ribonükleik Asit
Rpm	Rotation per Minute (Dakika/Devir)
SDS	Sodyum Dodesil
TAE	Tris EDTA Asetat
UV	Ultraviyole
<i>ABRE</i>	<i>Abscisic acid response element</i>
<i>DRE</i>	<i>Dehydration-responsive Element</i>
<i>COR15A</i>	<i>Cold-regulated 15A</i>
<i>COR47</i>	<i>Cold-regulated 47</i>
<i>RD29B</i>	<i>Responsive to dessication 29b</i>

<i>DREB1</i>	<i>Dehydration responsive element binding protein 1</i>
<i>SGF29</i>	<i>SAGA-associated factor</i>
<i>RAB18</i>	<i>Responsive ABA 18</i>
<i>Ws</i>	<i>wasilewskia</i>
O.D	Optik Densite
<i>REF2</i>	<i>Reduced Epidermal Fluorescence 2</i>
<i>XERICO</i>	<i>Protein Binding/zinc ion binding</i>
<i>GOLS3</i>	<i>Galactinol synthase3</i>

ÖZET

***ARABIDOPSIS THALIANA* L. (HEYNH) TÜRÜNDE TUZ STRESİNİN GEN ANLATIMI ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

Öznur TANRIVERDİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Cüneyt Akı

08.02.2010, 48

Bu çalışmada bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh bitkisinde *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutantlarının tuza tolerans yanıtlarının anlaşılması ve gen ekspresyonlarındaki rollerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmada öncelikle, T-DNA mutanı olan *sgf29a*, *ada2b-1*, çift mutant *sgf29a;ada2b-1* tohumları kullanılmıştır. Kontrol olarak yabani form olan *Wasilewskia* (Ws) ekotipi kullanılmıştır. Çalışmada gen ifade analizleri için, in vitro bitkilere 100 mM NaCl uygulanmıştır. Tuz stresinin ardından, RNA izolasyon kiti kullanılarak *sgf29a*, *ada2b* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarından RNA ekstrakte edilmiştir. PCR reaksiyonları *RD29B*, *RD22*, *COR47*, *COR78*, *COR6.6*, *COR15A*, *RAB18*, *GOLS3* ve *XERICO* spesifik primerleri kullanılarak uygulanmıştır. Böylece mutantlarda bu genlerin ifade oluşları Gelpro32 programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon analizlerine ek olarak, 0mM, 50mM, 75mM, 100mM NaCl uygulamaları sonucunda mutant bitkilerin kök gelişimlerinin kontrol bitki ile karşılaştırılmaları gerçekleştirilmiştir. 4 gün boyunca kök uzamaları ImageJ programı ile ölçülmüş ve kayıt edilmiştir.

Sonuçlar *ada2b-1* mutantının tuz toleransına hassas olduğunu gösterirken, *sgf29a* bitkisinin yabani tip bitkiden dirençli olduğu gözlenmiştir. Kök gelişim analizlerinde çift mutant *sgf29a;ada2b-1* tuz stresine *ada2b-1* mutantından daha az hassasiyet göstermiştir.. Tuz yanıt genlerinin PCR sonuçlarına göre, *COR15A*, *RAB18* ve *RD29B* gen ifadesinde *ada2b-1* transkript seviyesinin yabani tip bitki ile karşılaştırıldığında azaldığı gözlenmiştir. Aksine *XERICO* gen ifadesinde *ada2b-1* transkript seviyesi artmıştır

Anahtar sözcükler: *Arabidopsis thaliana*, *sgf29a*, *ada2b-1*, gen ekspresyonu, SAGA kompleksi

ABSTRACT

THE EFFECT OF SALT STRESS CONDITIONS ON THE GENE EXPRESSION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* L. (HEYNH)

Öznur TANRIVERDİ

Canakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Science and Engineering

Chair for Biology Thesis of Master of Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Cüneyt AKI

08.02.2010, 48

In this study, it is aimed to understand salt tolerance respond of *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutants and investigate roles of these genes on gene expressions in *Arabidopsis thaliana* as a modal organism.

In this study *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, T-DNA mutant lines *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* seeds were used. *Wasilewskia* (Ws) seeds were used as control plant. In this study, 100 mM NaCl was treated on in vitro plants. Then, total RNA was extracted from *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* seedlings according to manufacturer's instruction using Nucleospin kit. PCR reactions were performed by using the gene specific primers such as *RD29B*, *RD22*, *COR47*, *COR78*, *COR6.6*, *COR15A*, *RAB18*, *GOLS3*, *XERICO*. Thus, these gene expressions in mutants were evaluated. In addition to gene expression analyzes, root development analyzes of *ws*, *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a; ada2b-1* were carried out under the different NaCl concentrations (0, 50, 75 ve 100 mM). During 4 days, root length was measured and recorded with Gelpro32 programme. Root development and gene expression analyzes were compared for understand salt tolerance of mutants and their roles in gene expression.

Our results indicated that *ada2b-1* mutant is more sensitive to salt treatment, (Most notably in 50 mM NaCl) whereas the root growth of *sgf29a* plants was more resistant than wild type plants. Double mutants *sgf29a;ada2b-1* displayed lower sensitivity to salt stress than *ada2b-1* in root growth assays.

In PCR results of salt-responsive genes, *COR15A*, *RD29B* and *RAB18* gene expression, *ada2b* transcript level was reduced as compared wild type transcript level. On the contrary, *ada2b* transcript level was increased in *XERICO* gene expression as compared wild type.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, *sgf29a*, *ada2b-1*, gene expression, SAGA complex

İÇERİK

	Sayfa
TEZ SINAVI SONUÇ BELGESİ.....	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	viii
BÖLÜM 1- GİRİŞ.....	1
1.1. Model Organizmalar ve Genetik Araştırmalardaki Önemi.....	1
1.2. Bitkilerde Stres Faktörleri Tarafından Gen İfadesinin Düzenlenmesi.....	2
1.2.1. Bitkilerde Transkripsiyon Faktörleri.....	3
1.2.2. Epigenetik Modifikasyonlar.....	4
1.3. SAGA Faktörü <i>SGF29</i> Geni ve <i>ADA2B-1</i> Geni.....	5
BÖLÜM 2- ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
BÖLÜM 3- MATERYAL VE METOD.....	14
3.1. Bitkisel Materyal ve Tohumların Petrilere aktarılması.....	14
3.2. Tuz Stresi Uygulaması.....	15
3.3. RNA İzolasyonu.....	16
3.4. RT-PCR Uygulaması ve Kullanılan bileşenler.....	16
3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	17
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	19
3.6.1. Elektrofrezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması.....	20
3.7. <i>sgf29a</i> , <i>ada2b</i> , <i>sgf29a;ada2b</i> Tohumlarının Fizyolojik Karakterizasyonu.....	19
3.7.1. ws (yabani tip) ve <i>sgf29a</i> , <i>ada2b</i> , <i>sgf29a;ada2b</i> Mutant Tohumlarının Petrilere Aktarılması.....	19
BÖLÜM 4- ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	21
4.1. Araştırma Bulguları.....	21
4.1.1. Bitkisel Materyal ile İlgili Bulgular.....	21
4.1.2. Tuz Stres Uygulamasına Ait Bulgular.....	21
4.1.3. RT-PCR’da Kullanılmak Üzere Hesaplanmış RNA Konsantrasyonu Analiz Bulguları.....	22
4.1.4. RT-PCR Analiz Bulguları.....	24

4.1.5. Fizyolojik Karakterizasyon Bulguları.....	33
4.2. Tartışma.....	41
BÖLÜM 5- SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
KAYNAKLAR.....	44
Ekler.....	I
Çizelgeler.....	II
Şekiller.....	III
Özgeçmiş.....	IV

BÖLÜM 1 GİRİŞ

1.1. Model Organizmalar ve Genetik Araştırmalardaki Önemi

Moleküler biyoloji ve genetik bilimi, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de son yıllarda ön plana çıkmış ve bu alana büyük kaynakların aktarılmasıyla genetik mühendisliği ve biyoteknoloji gibi hayat standartlarımızı ve hayat kalitemizi yükseltmeye yönelik uygulamalarda yeni ufuklar açmıştır. Bunun sonucu olarak Moleküler biyoloji ve genetik uygulamaları tıp, ilaç, gıda, tarım, biyomedikal gibi sektörlerden adli bilimlere kadar çok geniş bir alana yayılmıştır. Moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan araştırmalar ve sonuçlarının toplum üzerindeki etkileri son 15 yılda toplum yaşantısına biçim vermeye başlamıştır ve bunun kaçınılmaz bir sonucu olarak dünya genelinde bu bilim dalında büyük gelişmeler olmuştur. Moleküler biyoloji ve genetik temel olarak hücreleri oluşturan sistemleri, sistemler arası etkileşimleri ve bu etkileşimlerde rol oynayan molekülleri, bunların bir sonraki kuşağa ne şekilde aktarıldığını araştırır.

Son 20 yılda pek çok organizmanın genomu hakkında ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Bu bilgiler ışığında canlıların moleküler filogenetik açıdan karşılaştırılmaları, kökenleri, genetik tedavi yöntemleri, birbirleri arasında gen aktararak ıslah amacı ile kullanılabilirleri hususunda pek çok bilimsel araştırmaya imza atılmıştır. Özellikle bazı canlı grupları moleküler karakterizasyon ve genetik çalışmalar için oldukça avantajlı bir durum oluşturmaktadır. Bu gruptaki canlılar genomlarının küçük olması, kolay yetiştirilebilmesi, fazla sayıda nesil oluşturması, mutantlarının fenotipik olarak rahatlıkla ayrılabilmesi nedeni ile model organizma olarak seçilmektedir. Araştırmamızda kullanılan model organizma ise *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. türüdür. *A. thaliana* ilk kez on altıncı yüzyılda Johannes Thal tarafından tarif edilmiştir. Bu bitkiyi Almanya'da Harz Sıradağları bölgesinde bularak "*Pilosella siliquosa*" adını vermiştir. O zamandan bu yana bitkinin adı çok kez değişmiştir. Son olarak Carl von Linne'nin verdiği şu anki adı ile kullanılmaktadır (http://tr.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana).

A. thaliana *Brassicaceae* familyasında, ticari önemi olmayan bir bitkidir, fakat uzun yıllardan bu yana genetik çalışmalar için avantajlı bir model bitki olarak seçilmiştir. Model bitki olarak seçilmesindeki önemli özellikleri arasında, bitki boyunun 20-25 cm uzunluğunda olması, yaşam döngüsünün hızlı olması, tohumdan tohuma yaşam döngüsünün sadece 6 hafta sürmesi, otogam bir bitki olması, bitki başına 10.000 ile 50.000 tohum üretmesi, yetiştiriciliğinin kolay olması gelmektedir. Genomik olarak ise toplam 5

kromozomunda 25000 geni bulunan, 125 Mb'lık küçük bir genoma sahiptir. *A.thaliana* (thale cress) 2000 yılının sonunda genom sekansı belirlenen ilk bitkidir (Theologis ve ark., 2000).

Doğal koşullar altında strese adaptasyon bazı ekolojik avantajlara sahip olmasına rağmen, üründe kayıplar nedeni ile tarımsal açıdan bazı sınırlamalar getirmektedir. Bu nedenle, tarımsal bitkilerde abiyotik stres toleransının geliştirilmesi geleneksel ve moleküler ıslah çalışmalarının birleştirilmesi ile gerçekleştirilebilir (Wang ve ark., 2001).

1.2. Bitkilerde Stres Faktörleri Tarafından Gen İfadesinin Düzenlenmesi

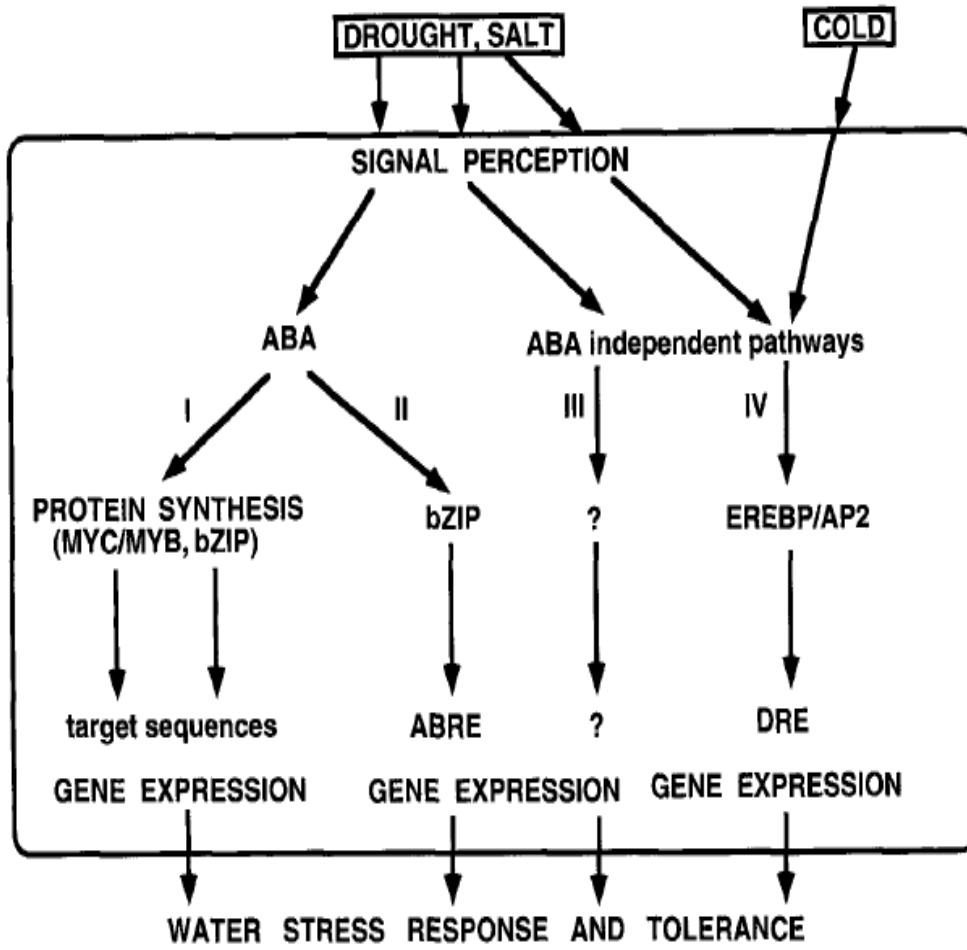
Bitkiler yaşamları sürecinde birçok stres faktörü ile karşılaşmaktadırlar. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres faktörleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. Biyotik (patojen, diğer organizmalarla rekabet vb.) ve abiyotik (kuraklık, tuzluluk, radyasyon, yüksek sıcaklık veya don vb.) stresler ekonomik önemi olan ürünler dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır. Tüm bu stresler bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltır, normal fonksiyonlarını değiştirir ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilir (Lichtenhaler, 1996).

Arabidopsis thaliana'da tuz ve osmotik stres indükleyici genlerin düzenlenmesinde en az dört düzenleyici sistem bulunmaktadır. Bunlardan ikisi ABA'ya bağlı yolda düzenleyici olarak görev alırken, diğer ikisi ise ABA'dan bağımsız olarak görev almaktadır (Şekil 1.1.). (Shinozaki ve Yamaguchi-Shinozaki, 1997, 2000). Tuzluluk indükleyici genlerin çoğu absisik asite bağlı pathway içerisinde düzenlenmesine rağmen, bazıları sinyalizasyon için ABA'ya bağlı değildir (Shinozaki ve ark., 2003).

DRE/CRT olarak adlandırılmış cis-acting elementi, ABA'dan bağımsız stres indükleyici gen ifadesinde işlevini yerine getirmektedir (Yamaguchi-Shinozaki ve Shinozaki, 1994).

ABA'ya bağlı pathway'de, ABRE (ABA-yanıt elementi) strese bağlı gen ifadesinde önemli bir cis-elementidir (Bonetta ve McCourt, 1998; Grill ve Himmelbach, 1998; Shinozaki ve ark., 2003).

MYB ve MYC transkripsiyon faktörleri de ABA'ya bağlı stres indükleyici gen ifadesinde işlevini yerine getirmektedir (Iwasaki ve ark., 1995).



Şekil 1.1. Gen ifadesi ve su stres sinyali arasındaki ilişkinin sinyal iletim yolu (Shinozaki ve Yamaguchi Shinozaki, 1997'den uyarlanmıştır).

1.2.1. Bitkilerde Transkripsiyon Faktörleri

Gen ifadesinin transkripsiyon faktörleri aracılığıyla düzenlenmesi organizmalar arasında oldukça yaygın bir mekanizma olup sekans (dizi)-spesifik olarak DNA'ya bağlanan proteinler ile ilgili genlerin promotör ve etki artırıcı (enhansır) bölgelerinde yerleşmiş cis-elementler (aynı etkili elementler) arasındaki etkileşimlere dayanmaktadır. Bitkiler; düşük sıcaklık, yüksek tuz konsantrasyonları ve kuraklık gibi olumsuz çevre koşullarına, strese adaptasyonda rol oynayan çeşitli genlerin indüklenmesi de dahil olmak üzere birçok biyokimyasal ve fizyolojik değişiklikler yoluyla tepki vermektedirler (Busk ve Pages, 1998).

Birçok gen, daha sonra strese cevapta yer alan genlerin ifadesini düzenleyecek olan bZIP ve AP2/EREBP regülatör faktör üyelerini kodlamaktadır. Bitkilerdeki birçok transkripsiyon faktör ailesi içinde AP2/EREBP ailesi oldukça yeni ve yalnızca bitkilere

özgüdür (Thomashow, 1994). Bu proteinlerin yaygın özelliği, DNA'ya bağlanan bölge olarak fonksiyon yapan ve AP2 bölgesi olarak adlandırılan yaklaşık 70 amino asitten oluşmuş korunmuş bölgelerdir (Okamura ve ark., 1997). bZIP (basic leucine zipper) ailesi ise yedi sıralı bir lösin tekrarı ile takip edilen, temel amino asitler bakımından zengin bir bölge ile karakterize edilir. Lösin tekrarları bZIP faktörlerinin dimerizasyonunu ve DNA ile etkileşimlerini sağlarken, temel bölge sekans-spesifik olarak DNA'ya bağlanır (Vinson ve ark., 1989).

1.2.2. Epigenetik Modifikasyonlar

Genomun bilgi içeriği (DNA sekansı) ve ifadesi strese yanıt da genotipe uyumu için çok önemlidir. Genomun ifadesi epigenetik düzenlenme ile ilişkisi olan süreçler ile (histon değişkenleri, histon translasyonel sonrası değişimler ve DNA metilasyonu gibi) kontrol edilen kromatin yapısından etkilenmektedir. Gelişimsel ve çevresel sinyaller genomda epigenetik modifikasyonları teşvik edebilir. Böylece bitki hücrelerinde tek genom gelişimsel ve çevresel işaretlere yanıtta çoklu epigenomlara yol açabilmektedir (Zhu JK, 2008).

İlk olarak, 1950'lerde Conrad Waddington tarafından önerilen *Epigenetik* terimi günümüzde "DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler" olarak tanımlanmaktadır. Son on yılda yapılan araştırmalar sonucu, epigenetik olayların, özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır. Epigenetik fenomen, özellikle canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Epigenetik fenomenin üzerinde en çok çalışma yapılmış olan iki tipi, *DNA metillenmesi* ve *histon modifikasyonları* olmuştur. Bu iki olayın birbiriyle bağlı ve geri dönüşümlü olduğu düşünülmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, gelişim sürecinde çekirdeğin epigenetik özelliklerinde bir dizi değişimin gerçekleştiği ve hücre potansiyelinin kaybı ile geri dönüşümsüz gen (ör: embriyonik) susturulmasının arasında önemli bir ilişkinin varlığı saptanmıştır (Jenuwein ve ark., 2001)

İnsan genomunda bulunan yaklaşık 23.000 gen, belirli hücrelerde ve belirli zamanlarda ifade edilmektedir. Hücreler gen ifadesindeki bu kontrolü sağlayabilmek için DNA'larını globüler histon protein oktetleri etrafına sararak oluşturdukları nükleozom yapılarını

kullanırlar. DNA ve histon proteinlerinden oluşan bu nükleozomlar kromatin olarak organize edilirler. Kromatin yapısındaki değişiklikler gen ifadesini kontrol eder: kromatin yapı sıkılaşıp yoğunlaştığında (sessiz) genler inaktive olur, kromatin yapısı gevşeyerek açıldığında (aktif) ise genler aktive olarak ifade edilir. Kromatin yapısındaki bu dinamik durum ise, geri dönüştürülebilir olan ve DNA metilasyonu ya da histon modifikasyonları ile sağlanan epigenetik paternler ile gerçekleştirilir. Bu işlemlerde görevli alan enzimler arasında, DNA metiltransferazlar (DNMT), histon deasetilazlar (HDAC), histon asetilazlar, histon metiltransferazlar ve methyl-binding protein MECP2 sayılabilir (Berger, 2002).

Bir gen lokusunun epigenetik durumunun belirlenmesinde (1) gen ifadesinin ölçümü, (2) histon modifikasyonlarının ve histon bileşiminin belirlenmesi, (3) promotör DNA metilasyonunun incelenmesi, olmak üzere üç temel yaklaşım uygulanmaktadır. Bu yöntemler arasında en güvenilir olarak görüleni CpG adacıklarındaki hipermetilasyonun ölçülmesidir (Rodenhiser ve ark., 2006).

1.3. SAGA Faktörü *SGF29* ve *ADA2B* Geni

Saccoromyces cerevisea proteini SAGA (Spt-Ada-Gcn5-Acetyltransferaz) kompleksi promotörler'de RNA polimeraz II'ye bağlı transkripsiyon düzenlenmesinde rol almaktadır (Grant ve ark., 1998b, Lee ve ark., 2000). SAGA, bazal transkripsiyon mekanizmasının iyileştirilmesi için gereklidir. SAGA transkripsiyon faktörlerinin birkaç farklı sınıfını içerir. Bu sınıflar içerisinde bulunan Spt proteinlerinin alt kümesi, Ada proteinleri, *GCN5* ve histon asetiltransferaz (HAT), TAF faktörleri ile ortak TATA bağlayıcı proteinin alt kümesi ve TRA1 proteini aracılığı ile RNA polimeraz II transkripsiyonel aktivitesini etkiler (Roth ve ark., 2001).

Arabidopsis genomu, % 91 amino asit sekans benzerliği gösteren *SGF29*'un iki ortoloğunu (*SGF29a* ve *SGF29b*) şifreler (Vlachonassios ve ark., 2008). *Sgf29* (SAGA-associated factor 29) transkripsiyon düzenleyici histon asetilasyon (HAT) kompleksleri SAGA ve SLIK'in bileşeni olarak işlevini yerine getirmektedir.

Çalışmamızda *sgf29a* için T-DNA hattı FLAG_351H10 kullanılmıştır. Bu gene ait kullanılmış primerler; KB93 (Forward): agg caa cga aca gaa gag aaa g

KB94 (Reverse): gaa tgg cac tgt tct ttg agg

Bu primerler kullanılarak genomik DNA PCR ürünlerinin uzunluğu 1100 baz çifti olarak elde edilmiştir. mRNA uzunluğu ise 480 baz çiftidir.

Aynı zamanda çalışmamızda *A. thaliana* bitkisinde *ada2b-1* mutantının tuz stresi altında belirli genler ile gen ekspresyon analizleri ve fizyolojik karakterizasyonu araştırılmıştır.

Saccoromyces cerevisea'da bulunan transkripsiyonel koaktivator *ada2b-1* geninin oksin ve sitokin konsantrasyonlarında değişimlere yanıt da hücre çoğalmasından hücre farklılaşmasına kadar olan gelişimsel rollere sahip olduğu tanımlanmıştır (<http://www.arabidopsis.org/tair>).

Çalışmamızın amacı, genetik çalışmalarda avantajlı bir model organizma olan *Arabidopsis thaliana* bitkisine uygulanacak olan farklı oranlarda tuz uygulamalarının, yabani tip ve mutant tiplerin (*sgf29a*, *ada2b*, *sgf29a;ada2b-1*) , kök oluşumuna etkisini araştırmaktır. Çalışmada ayrıca bu mutant tiplerin oluşumuna yol açan genetik düzeydeki değişikliklerin PCR sonucunda elde edilen veriler yolu ile gen ekspresyonu düzeyindeki etkilerini bazı gen grupları içinde değerlendirmektir.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Horiuchi ve ark. (1997) tarafından yapılmış araştırmada, *ADA1* geni ve ADA/GCN5 kompleksinin rolleri üzerinde durulmuştur. *ADA* genlerinin transkripsiyonel koaktivatörler olarak işlevini yerine getiren öğeleri şifrelediği belirtilmiştir. Araştırmada orijinal *ADA* geni, *ADA1*'in başlama karakterizasyonunu, dizilime ve klonlamasını tanımlamışlardır. Önceden izole edilmiş *ada* mutantlarına benzer olarak, *ada1* mutantlarının çeşitli reporter bölgelerden dolayı transkripsiyonda azalmalar gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, *ADA1* geni immunoprecipitation deneyleri ve kompleksin kısmi purifikasyon analizlerinde ıspatlandığı gibi ADA/GCN5 kompleksinin diğer ADA genleri ile etkileşim içerisinde olduğu bildirilmiştir. İnositol auxotrophy ve Spt fenotipleri tesiri altında kalmış promotörlere göre, *ada1* mutantlarının *ada5* mutantlarına benzer şekilde kusurlar gösterdiği ve *ada2*, *ada3* ve *gcn5* mutantlarından ise farklı kusurlar gösterdiği belirlenmiştir. Southern blot analizleri ile sonuçlar doğrulanmıştır. Sonuç olarak ADA/GCN5 kompleksi içerisinde iki ayrı işleve sahip, ADA genlerinin *ADA1* ve *ADA5* sınıfı, *ADA2*, *ADA3* ve *GCN5* sınıfı şeklinde iki sınıfa ayrıldığı düşünülmüştür. Ek olarak Marcus ve ark., 1996 tarafından yapılmış olan çalışmada, *ada5* mutantlarının diğer *ada* gen mutantlarından daha şiddetli fenotipik kusurlar gösterdiği ıspatlanmıştır.

Sterner ve ark. (2002), Maya SAGA kompleksi vasıtasıyla histonların normal asetilasyonu için gerekli olan SANT domaini *ada2*'nin üzerinde durmuşlardır. SANT domainin DNA bağlayıcı domain c-myc'nin homolojisine dayandırılarak tespit edilmiş ökaryotik transkripsiyonel düzenleyici proteinlerin miktarında yeni bulunmuş motif olduğu bildirilmiştir. Histon asetil transferaz *Gcn5*'i içeren maya SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase) kompleksi içerisinde iki ek domainin benzer işleve sahip olduğunu bulmuşlardır ve SAGA içerisinde birbiri ile etkileşim içinde olan protein *Ada2* ve *Gcn5* içerisinde ekleme ve çıkarma mutasyonları ile analiz etmişlerdir. Ayrıca kendi katalitik işlevinden ayrı olarak *Gcn5*'in histon asetil transferaz domain bölgeleri ve *ada2* SANT domaini içerisinde substrat tanıma işlevlerini belirlemişlerdir.

Vlachonasis ve ark., (2003), tarafından yapılmış çalışmada *Arabidopsis* cinsine ait bitkide *ADA2b* ve *GCN5* mutasyonlarının bitki gelişim ve büyümesi üzerindeki ve gen ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. T-DNA insersiyon mutanı *Ada2b* ve *Gcn5*'de

bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde, bodur bitki, anormal kök gelişimi ve çiçeklerde kısa stamen ve petalleri içeren pleiotropik etkilere sahip olduğu belirlenmiştir. *ADA2B* ve *GCN5-1*'in gen ifadesi ve ayrı biyolojik aktiviteler ile hem ortak hem de ayrı komplekslerin bileşeni olabildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca *ada2b-1*, *gcn5-1* ve yabancı tip bitkilere düşük sıcaklık muamelesinde *COR* gen ifadesinin indüksiyonunu karşılaştırmışlardır. Bu durumda *ada2-1* ve *gcn5-1* bitkilerinde *COR* gene transkriptlerinin düşük sıcaklığa yanıtında biriktiğini, fakat indüklenme oranının daha yavaş ve transkriptlerin final safhalarının yabancı tip bitkilerden daha az olduğunu belirtmişlerdir. *COR6.6* transkript düzeyleri yaklaşık üç kat azalırken, *COR15a*, *COR47* ve *COR78* için transkript düzeyleri yaklaşık iki kat azaldığını göstermişlerdir. Sonuç olarak *ADA2b* ve *GCN5*'in soğuk iklime alıştırmaya süresince *COR* gen indüklemesi için gerekli olmadığını bildirmişlerdir. Fakat *COR* ifadesinin düzeyini artıran yardımcı role sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Araştırmada gösterilen *CBF* geninin transkript düzey sonuçlarında ise, yabancı tip ve mutant bitkilerde soğuk muamelesinin ilk saatinde uyarıldığını gözlemlemişlerdir. Yabancı tip bitkilerde *CBF* transkript düzeylerinin, 12 ve 24 saat aralığında azalana kadar değişmeden kaldığını gözlemlemişlerdir. Tam zıttı olarak *ada2b-1* ve *gcn5-1* mutant bitkilerinde *CBF* ifadesi, 8. saate ulaşana kadar çok hızlı azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu durum doğrultusunda, ilk *CBF* transkripsiyonunun *ada2b-1* ve *gcn5* mutantlarında zarar görmemesine yol açan sinyal iletim pathway'ini sonucuna varmışlardır.

Pandey ve ark. (2005), *A. thaliana* türünde ABA yanıtının baskılayıcısı olarak işlev gören APETELA2-Domain transkripsiyon faktörü *ABR1* geni üzerinde yapılan çalışmada, ABA düzenlenmiş gen ifadesinin çalışması boyunca ABA yanıtının negatif düzenleyicisi olarak işlev gören ve ABA'ya güçlü yanıt olan ABA repressor 1 (*ABR1*), AP2 domain proteini ortaya koyulmuştur. *ABR1* geninin ABA sinyal yolu arası CBL9-CIPK3 tarafından düzenlenmiş olabileceğinden şüphelenmişlerdir. Önceki çalışmalarda calcineurin B-like protein (CBL9) ve calcineurin interacting kinase (CIPK3) ABA yanıtlarının düzenleyicileri olarak belirlenmiştir. Çalışmada yapılan analizler *ABR1* geninin bütün bitki organlarında muamele edilip ve bütün gelişimsel safhalarında ifade edilmiştir. ABA muamelesinden sonra, *ABR1* transkriptinin en güçlü birikiminin üçüncü saatten sonra gerçekleştiğini RT-PCR analizi ile gözlemlemişlerdir. RT-PCR oluşumu sonuçlarında ABA tarafından oluşumun diğer stres koşulları ile karşılaştırıldığında daha hızlı olduğunu göstermişlerdir. *ABR1* geninin abiyotik stres sinyalleri ve ABA tarafından düzenlenmiş olabildiği gibi *ABR1*'in bitki ve strese yanıtta bitkininde işlevi olabileceği üzerinde durmuşlardır.

Böylece yapılan analizlerde, uygun abiyotik stres koşulları altında çimlenme deneylerinde mutant tohumların, yabancı tip tohumlarla karşılaştırıldığında ABA' ya hassas olduğunu belirtmişlerdir. Bu sonuç doğrultusunda tohum çimlenmesinin ABA baskılanmasında *ABR1* için negatif rolünün, bu yanıtta CBL9 ve CIPK3 tarafından oynanmış işlevsel rol ile ilişkili olabileceğini ortaya koymuşlardır.

Tiryaki (2007), *A. thaliana* türünde yaptığı çalışmada oksin sinyal geni *axr1*'in tuz stresi ve jasmonik asit ile uyarılabilen gen ekspresyonundaki rolünü araştırmışlardır. Temel kök gelişiminde tuz stresi üzerinde *ax1-24* oksin direnç mutantının yanıtı tuz konsantrasyonunun çeşitliliği üzerinde test edilmiştir ve sonuçlar yabancı tipe karşılaştırılmıştır. *ax1-24*'ün 128mM NaCl dışında tuz konsantrasyonlarının herhangi baskılayıcı etkisine yabancı tipten daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Oksin duyarsız mutant *ax1-24*'ün tuz stresine olan tepkisi farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren kök büyüme ortamlarında test ederek sonuçları yabancı form olan kontrol bitkileri ile karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak *ax1-24*'ün 128 mM NaCl tuz konsantrasyonu hariç kök büyümesini engelleyen diğer NaCl konsantrasyonlarına karşı çok daha dayanıklı olduğunu göstermişlerdir. 64 mM NaCl içeren kök büyüme ortamında kök büyüme uzunluğunda meydana gelen toplam engelleme oranının *ax1-24* ve yabancı tip için sırasıyla %62 ve %70 seviyesinde olduğunu belirtmişlerdir. Dışarıdan uygulanan salisilik asit ve 1-aminosiklopropan-1-karboksik asit, jasmonik asit ile uyarılabilen allene oksin sentez (AOS) enzimini kodlayan genin ifadesinde önemli artışa neden olduğunu, *ax1-24* fidelerinde SA muamelesinden 24 saat sonra büyük bir azalma meydana geldiğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda oksin ile tuz stresi ve SA ile JA sinyalizasyonu arasında *AXR1* aracılığı ile meydana gelen bir ilişkinin olduğunu ortaya koymuşlardır.

Chinnusamy ve Zhu (2009), bitkilerde stres yanıtlarının epigenetik düzenlenmesi araştırmasında stres altında bitki gelişimi ve gen ifadesinde DNA ve histon modifikasyonlarının anahtar rol oynadığını göstermişlerdir. Stres yanıt epigenomları üzerinde karşılaştırmalı çalışmalar ve transkriptomlar bitkilerin stres adaptasyonlarının anlaşılmasını kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Genomun ifadesinin DNA metilasyonu, histon translasyonel sonrası değişimler, histon varyantları gibi epigenetik düzenlemeler ile ilişkili olan süreçler tarafından kontrol edilen kromatin yapısı ile etkilendiği belirtilmiştir. Stres düzenleyen siRNA'ların DNA metilasyonlarında ve histon değişimlerinde değişikliklere yol açmış olabileceğini de öne sürmüşlerdir. Histon asetil transferazların

(HATs) transkripsiyon faktörleri ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir ve *GCN5*'in transkripsiyonel adaptor ADA ve Spt-Ada-Gcn5 asetiltransferaz SAGA'nın katalitik alt ünitesi olduğunu belirtmişlerdir.

Doherty ve ark. (2009), soğuk toleransı ve buna uygun olan düzenlenmiş gen ifadesinde *A. thaliana* CAMTA transkripsiyon faktörlerinin rolleri üzerinde durmuşlardır. CBF (C-Repeat/Dre Binding Factor 1) soğuk yanıt yolunun soğuk ortama alıştırmada en iyi düzenleyici yolu kapsadığını bildirmişlerdir. *A.thaliana* türünde bulunan CBF genlerinden sırasıyla DREB1b, DREB1c ve DREB1a transkripsiyon faktörleri olarak bilinen *CBF1*, *CBF2* ve *CBF3*'ün düşük sıcaklık uygulaması yapılan bitkilerde 15 dakika içerisinde indüklendiği belirtilmiştir.

CBF2 promotörlerinde mevcut olan CM1'den CM7'ye kadar yedi korunmuş DNA motifini belirlemişlerdir. CBF2 promotöründe CM4 ve CM6'nın negatif düzenleyici etkilere sahip olduğu, CM2'nin ise hem negatif hem de pozitif aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Soğuk ortama alıştırma denemesinde hedef olarak, soğuk toleransı artan bitkilerin düşük sıcaklığa tepkisinin nasıl olduğunu ve gen ifadesindeki değişiklikler sırasında bu sürecin nasıl ortaya konduğunu göstermişlerdir. Çalışmada, upstream (yukarıgiden) CBF2'nin işlevini yerine getiren transkripsiyon faktörleri ve DNA düzenleyici elementlerin belirlenmesi üzerine odaklanmışlardır. Bu sonuçlardan yola çıkarak CAMTA proteinlerinin stres yanıtlarının yaygın tamamlayıcısı olabildiğini belirtmişlerdir. Soğuk toleransında azaltılmış *camta1-camta3* çift mutant bitkileri ve CBF2 ifadesinin pozitif düzenleyicisi olan CAMTA3'ün, CM2 motifine bağlı transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyon aktivator ailesine (CAMTA3) bağlı olan calmodulin'in üyeleri olduğunu belirtmişlerdir.

Kamei ve ark. (2005), *A. thaliana* türünde tuz stresine aşırı hassas *sos-2* ve *sos-3* mutantlarının gen ifade profillerini incelemişlerdir. Çalışmada transkriptleri sos (salt overly sensitive) sinyal yolları tarafından düzenlenen tuz stres yanıtı genlerinin analizi için, 22K agilent oligoarray ve kantitatif RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. Tuz stres yanıtı genleri analizi için transkriptler sos sinyal yolu tarafından düzenlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda *SOS3/SOS2* sinyalizasyon yollarının *MYC/MYB* ve *DRE/CRT*, ABRE yollarından bağımsız olduğunu ortaya çıkarmıştır. *RD29A/COR78* ve *RD17/COR47* benzeri başlıca stres tetikleyebilen genlerin up-regülasyonu *sos-2* ve *sos-3* mutantlarında güçlü biçimde etkileyici olmadığını belirlemişlerdir. Tuz stresi muamelesi altında, *sos2*

mutantının gen ifade profilleri yabancı tip ile farklılık gösterirken *sos3* mutanlığı gen ifade profili yabancı tip ile benzerlik gösterdiğini belirlemişlerdir. Bu gözlemlerin aşağı akış (downstream) *SOS2*'nin yukarı akış (upstream) *SOS3*'den daha güçlü olarak stres yanıt genlerinin düzenlenmesini etkilediğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre *sos-2*'yi aktif hale getiren ve stres uyarıcı genlerin transkript düzeylerini etkileyen *sos-3* bağımsız düzenleme faktörlerinin varlığını ileri sürmüşlerdir.

Hark ve ark. (2008), *A. thaliana* türünde transkripsiyonel koaktivator *ADA2*'nin iki *A. thaliana* ortoloğunun ayrı biyolojik işlevlere sahip olduğunu bildirmişlerdir. *A. thaliana* türünde yaklaşık olarak %45 aminoasit dizi benzerliğini paylaşan ve maya *ADA2*'ye benzeyen proteinleri şifrelediğini belirtmişlerdir. Araştırmada *ada2a* ve *ada2b*'nin hücrel rollerinin araştırmasını ilerletmek için, abiyotik stres'e göre transkripsiyonel kofaktörün yanıtı üzerinde durmuşlardır. *ada2b* fideciklerinin absisik asit, tuza karşı ve değişen düşük sıcaklık yanıtlarına karşı aşırı hassasiyet göstermesine karşın, *ada2a* fideciklerinin abiyotik strese karşı yanıtları genellikle yabancı tip bitkiler ile paralel olduğu sonucuna varmışlardır. *ada2a;ada2b* çift mutant bitkileri, *A.thaliana* türünde genom işlevini etkilemesine karşın, *ada2a* ve *ada2b* genlerinin her birinin *GCN5* ile bağımsız olarak çalıştığını ileri süren *gcn5* benzeri fenotip ile ortaklık yaptığını göstermişlerdir. Sonuç olarak genellikle *ada2a* mutantları bütün durumlarda yabancı tip bitkilerle karşılaştırılabilir yanıt gösterirken, *ada2b-1*'in değişken yanıtlar gösterdiğini belirlemişlerdir. Boyutsal ve geçici gen ifadeleri dışında, *ada2* proteinlerinin biyokimyasal aktivitelerinde de doğal olarak farklılık gösterdiği sonucuna varmışlardır.

Vlachonasios ve ark. (2008), tarafından *A. thaliana* türünde SAGA faktör 29 (*SGF29*) mutasyonlarının moleküler karakterizasyonu çalışılmıştır. *A. thaliana* türünde onların biyolojik rollerini incelemek için, SALK koleksiyonundan T-DNA ilaveli mutantların izole edildiğini bildirmişlerdir. Homozigot mutasyonlarının her iki gende de belirlendiğini, T-DNA insersiyonu ile birinin *SGF29a*'nın 7.ekzonunda, diğeri ise *SGF29b*'nin 5'UTR'sinde olduğunu belirtmişlerdir. Homozigot *SGF29a* bitkilerinin RT-PCR analizi ile tam boy *SGF29a* transkriptinin varlığını doğrularken, *sgf29b* transkriptinin azalan miktarının *sgf29b* mutantlarında gözlemlendiğini belirtmişlerdir. *SGF29b* bitkileri yabancı tip bitkilerden ayırt edilememesine karşın, *sgf29a* bitkilerinin kısa günde geç çiçeklenme, daha az ve daha küçük rozet yapraklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada *sgf29a* mutantlarının tohum çimlenmesi ve kök gelişim analizlerinde dirençli

olduğunu belirtmişlerdir. Bu sebeple *SGF29a*'nın tuz stresine yanıt ve kısa günde çiçeklenme zamanının düzenlenmesini kapsayabileceğini düşünmüşlerdir. Çift mutant *sgf29a;ada2b-1*'in sentetik öldürücülüğü olmadığını işaret eden *ada2b-1* fenotipini gösterdiğini bildirmişlerdir. Çift mutant *sgf29a;ada2b-1* (-/+) hattında kısa stamenler, küçük silikua ve artan çiçeklenme miktarı gözlemlenmiştir. Bu doğrultuda *ADA2B* geninin *SGF29* geninin işlevini gerektirdiği düşünülmüştür.

Wu ve ark. (2004), *Saccharomyces cerevisiae* SAGA kompleksinin moleküler yapısı üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* SAGA kompleksinin RNA polimeraz II ile transkripsiyonu düzenleyen çoklu işlevsel koaktivator olduğu belirtilmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemlerde SAGA'nın üç boyutlu yapısının 5 modüler domain ve onların alt birim bileşenlerinden oluştuğu gösterilmiştir. SAGA alt biriminin bazılarının pozisyonunun mutant komplekslerinin analizi için immün işaretleme yöntemi kullanılmıştır. TFII ile paylaşılmış Taf alt birimleri (TBP birleşmiş faktör) SAGA'da merkezi bölge işgal ettiğini ve her ikisinin de kompleks de benzer yapı şekillendirdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca *S.cerevisiae* TFIID'nin yapısının 3 ana lobtan meydana geldiği ve bir moleküler kümeye benzediğini belirtmişlerdir. İmmün etiketleme deneylerinden TAF'ların histon katlanma bölgelerinin 2 farklı konumu içerdiği ve birincil karakterize edilmiş heterodimer çiftlerinin doğal yapıda olduklarını doğrulamışlardır. SAGA'nın birçok Taf içerdiğini göz önüne alınarak, alt ünitelerinin sitokiometrilerinin korunup korunmadığını ve TFIID ve SAGA'nın belli başlı organizasyonunun paylaşılıp paylaşılmadığını, Tafs alt yapısına dayandırılarak belirlenmesi gerektiğini düşünmüşlerdir.

Qieng ve ark. (2000), bitkilerde nem, tuz ve soğuk toleransında DREB transkripsiyon faktörlerinin düzenleyici rolünü araştırmışlardır. Nem, yüksek sıcaklık ve stres altında reporter genin ifadesini kontrol eden ve belirli biçimde DRE elementine bağlı DREB transkripsiyon faktörlerini şifreleyen 5cDNAs (DREB1A C ve DREB2A B) *RD29A* promotor bölgesinin DRE elementi ve tek hibrit görüntüleme metodu ile izole edildiğini bildirmişlerdir. DREB transkripsiyon faktörleri ve DRE elementinin nem, yüksek sıcaklık ve soğuk stresinin sinyal iletiminde görev aldıklarını bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada *Arabidopsis sp.* türünün transgenik bitkileri içinde DREB1A genini kullanmak için güçlü 35S karnabahar mozaik virüsünü teşkil eden promotor'u kullanmışlardır. Gösterilen analiz sonuçlarında DREB1A, *rd29a*, *rd17*, *kin1*, *cor6.6* ve *cor15a* genlerinin normal şartlar altında yabancı tipte ifade edilmediğini belirtmişlerdir. Buna rağmen DREB1A transgenik

bitkilerinde DREB1A'nın aşırı ifadesi normal koşullar altında sadece *rd29a*, *kin1A*, *cor6.6*, *cor15A* ve *erd10* genlerinin ifadesini aktive etmeyip, ilaveten yabancı tip ile karşılaştırıldığında soğuk ve nem şartları altında *rd29a*, *rd17*, *kin1*, *cor6.6*, *cor15A* ve *erd10*'nun ifadesini artırdığını göstermişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda, transgenik bitkilerin DREB1A transkripsiyon faktörünün belirli biçimde DRE elementleri ile işbirliği altında olduğunu ve bu stres tolerans genlerinin ifadesini indüklediğini ileri sürmüşlerdir. Deneylerin karşılığında ise promotör bölgelerinde DRE elementini içermeyen bazı nem indükleyebilir genlerin (*P5C5*, *erd10*, *rd22* ve *rd29A*) transgenik bitkilerinde DREB1A aşırı ekspresyonu ile indüklenmediğini göstermiştir. Kasuga ve ark., 1999, tarafından yapılan bir çalışmada transkripsiyon faktörü (DREB1A)'nın indüklenabilir ifadesi nem, tuz ve soğuk kapsayan birçok stres şartlarına karşı gelişmiş toleransla sonuçlanmıştır.

BÖLÜM 3

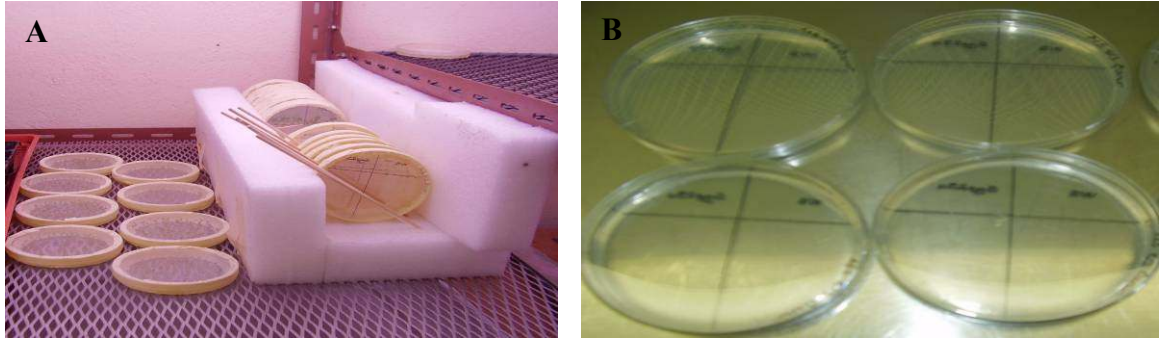
MATERYAL VE METOD

3.1. Bitkisel Materyal ve Tohumların Petrilere aktarılması

Çalışmada *Arabidopsis thaliana* türüne ait T-DNA mutanları *sgf29a* (-/-), *ada2b-1* (-/+) ve çift mutant *sgf29a* (-/-) ; *ada2b* (-/+) olarak elde edilmiş tohumlar kullanılmıştır. Yabani tip olarak *A. thaliana* ekotipi *wassilewskija* (Ws) kullanılmıştır. Tohumlar mutant olarak (Salk Enstitüsü, Kaliforniya)'dan temin edilmiştir.

Tohumların sterilizasyon işlemi için ependorf tüpleri içerisinde bulunan tohumlara %30'luk sodyum hipoklorit ilave edilerek 13,2 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Süre sonunda tohumların dibe çökmesi sağlanmıştır. Süpernatant kısım mikropipet yardımı ile alınmıştır. Daha sonra tohumlar saf steril su ilave edilerek yıkanmıştır.

Tohumların petrilere ekilmesi için % 0,8 agar ve % 1 sükröz içeren Murashige Skoog (1962) ortamı hazırlanmıştır. Steril şartlar altında Laminar kabin içerisinde MS besi ortamı içeren petrilere kapak kısmı kenardan hafifçe açılarak ependorf tüpünden çekilen tohumlar düzenli ve sıralı biçimde petri kaplarına ekilmiştir. Petri kapları üzerinde karanlık ortamın sağlanması için alüminyum folyo ile kaplanmış ve 2 gün süresince +4°C' de bekletilmiştir. Bu süreçte tohumların dormansisi ortadan kaldırılarak çimlenmeye teşvik edilmiştir. Steril Ws (yabani tip) ve *sgf29a* (-/-) mutanına ait tohumlar 6 petri kabına ekilmiştir. Her bir petriye 10 adet Ws tohumu ve 10 adet *sgf29a* (-/-) tohumu ekilmiştir. *ada2b* mutanları ve *sgf29a;ada2b* çift mutant bitkilerine ait tohumlardan ise 10 adet olacak şekilde 4 petriye aktarımı gerçekleştirilmiştir. Ekim işleminden 5-10 dk sonra petrilerin kenarları parafilm ile kontaminasyonun önlenmesi için kapatılmıştır. Petriler iki bölümlü olarak kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Heterozigot ve homozigot tohumları bir arada içeren *ada2b* (-/+) ve *sgf29a* (-/-); *ada2b* (-/+) tohumlarına ait petri kapları ise öncelikle yatay olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir. Ardından bitki büyüme ortamında çimlenen ve ardından büyüyen fideciklerden kök boyları uzun ve yaprak renkleri koyu yeşil olan homozigot fidecikler seçilmiştir. Homozigot tohumları içeren petri kapları köklerin kolaylıkla uzaması için dikey olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir (Şekil 3.1.). Petri kapları uzun gün koşullarının sağlandığı (16 saat ışık + 8 saat karanlık), 25±2°C, 28.080 lux floresan ışık şiddetine ayarlanmış bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Bitki büyüme odasına bırakılan petriler. A) Yatay ve dikey olarak yetiştirmeye bırakılan petriler, B) Petriler iki kısımlı olarak kullanılmıştır.

3.2. Tuz Stresi Uygulaması

Murashige Skoog (MS) ortamında 14 günlük süre sonunda yetişen *ws*, *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* fidecikleri MS besisi ortamından dikkatlice alınarak yalnızca içerisinde 25 ml 100 mM NaCl bulunan petri kaplarına 0, 3, 12 saat aralıkları ile aktarılmıştır (Çizelge 3.1.). Her tuz solüsyonu bulunan petriye 8-10'ar tane fidecik, kökleri ile birlikte yapraklı şekilde aktarılmıştır. 0, 3 ve 12 saat aralıkları sonunda her fidecik sırasıyla tuz solüsyonlarının içerisinde alınarak ependorf tüpü içerisine bırakılmış ve bitki dokusunun korunması için tüpler hızlı bir şekilde sıvı nitrojen içerisine yerleştirilmiştir. Sıvı nitrojen içine alınan ependorflar, sonra poşet içine koyularak -20°C'de saklanmak üzere kaldırılmıştır.

Çizelge 3.1. Bitki örneklerinin genotipleri ve tuz solüsyonuna maruz bırakılma süresi

Örnek numarası	Genotip	(NaCl Uygulaması) Saat
1	Ws	0
2	Ws	3
3	Ws	12
4	<i>Sgf29a(-/-)</i>	0
5	<i>Sgf29a(-/-)</i>	3
6	<i>Sgf29a(-/-)</i>	12
7	Ada2b-1(-/-)	0
8	Ada2b-1(-/-)	3
9	Ada2b-1(-/-)	12
10	Sgf29a(-/-)/ ada2b-1 (-/-)	0
11	Sgf29a(-/-)/ ada2b-1 (-/-)	3
12	Sgf29a(-/-) / ada2b-1 (-/-)	12

3.3. RNA İzolasyonu

-20°C'den alınan ependorf tüpleri içerisinde bulunan bitki kısımlarının parçalanması için mikropastle'lar kullanılmıştır. Daha sonra bu dokulardan RNA ekstraksiyonu Nucleospin RNA plant (Macherey-Nagel) izolasyon kit prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. RT-PCR uygulaması ve kullanılan bileşenler

cDNA sentezi Nucleospin Reverse Transcription kit ile yapılmıştır. Reaksiyon bileşenleri ve kullanılan miktarlar Çizelge 3.2'de gösterilmiştir. Reaksiyon filtreli pipet uçları (RNase-DNase free) ve ince cidarlı 200 µl'lik PCR tüplerinde kurulmuştur. Kalıp RNA'lardaki ikincil dereceden katlanma, reaksiyon öncesinde 5 dakika 70°C'de denatüre edilerek açılmıştır. Tüpler, 37°C'de 60 dakika süreye ayarlı Thermal cycler cihazında (BIO-RAD) inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.2. cDNA reaksiyonu karışım 1 bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen (Karışım 1)	Miktar (µl)	Final (14 tüp)
10 mM dNTP mix	4	56 µl
10 µM Oligo-Dt primer	1	14 µl
RRNAsin	0,5	7 µl
RNase-free H ₂ O	4,5	63 µl
Toplam	10	140

Her yeni ependorf tüpü (12 adet) içerisine 10 µl karışım 1'den PCR tüplerine eklenmiştir, ardından sulandırılmış stok RNA örneklerinden 10 µl eklenmiştir. Programın ilk basamağında PCR örnekleri 70°C'de 5' lık PCR işlemi ile yoğun yapıdaki mRNA açılmış ve 4°C'de 5' buza bırakılarak bu yapının açık kalması sağlanmıştır. Ardından Karışım 2'den ependorf tüpleri içerisine eklenmiştir (Çizelge 3.3.). Programın bu basamağında ise; 20°C'de Oligo dt'ler poli A ve poli T'leri birbirine bağlayacak, 37°C'de AMV RT enzimi aktif hale geçerek uzatacak ve cDNA zincirini oluşturmuştur. Programın ilk basamağında Oligo_dt'ler primer olarak görev yapmaktadır. PCR programı tamamlanınca PCR tüplerine 40 µl H₂O ilave edilmiştir. Toplamda her PCR tüpü 80 µl RT-PCR ürünü içermiştir. RT reaksiyon ürünleri PCR'da kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırılmıştır.

Çizelge 3.3. Karışım 2 (HOT MIX)'in bileşenleri ve final konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final (14 tüp)
MgCl ₂	8,0	112 µl
10X buffer	4,0	56 µl
AMV rev. Transcriptase	0,2	2,8 µl
RNase-free H ₂ O	7,8	109,2 µl
Toplam	20	280

3.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR Takara firmasına ait PCR kitiyle (Katalog numarası: RR001A) gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. PCR bileşenleri kullanılarak elde edilen karışımdan her PCR tüpü için 10 µl eklenmiştir. 2,5 µl cDNA ürününden her tüp içerisine eklenmiştir. Tüm reaksiyonlar, enzimin 3'→5' ekzonükleaz proofreading aktivesi nedeni ile primer degradasyonuna sebep olmaması için buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. PCR uygulamalarında 11 gene ait primer kullanılmıştır. Tuz stresi uygulanmış *sgf29a*, *ada2b*, *sgf29a;ada2b* mutantlarında *Ref2*, *Cor6.6*, *Cor15a*, *Cor47*, *Cor78*, *RAB18*, *RD22*, *RD29b*, *GolS*, *Xerico*, *Rubisco* primerleri kullanılarak bu genlerin tuz stresi altında ifadeleri incelenmiştir. Bu genlere ait primerlerin baz dizilişleri Çizelge 3.5'de verilmiştir.

RT-PCR analizlerinde kontrol olarak *Ref2*-spesifik primerleri kullanılmıştır. Gen ekspresyon seviyelerinin ve oranlarının belirlenmesinde "Gelpro" adlı bilgisayar programı

kullanılmıştır. Oranlar Gen/*REF2* şeklinde hesaplanarak elde edilmiştir ve grafik oluşturulmuştur.

Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)	Final Konsantrasyon(µl)
10X Ex Taq PCR Buffer	1,25	17,5
2,5mM dNTP mix	1,00	14,0
Ex Taq enzyme	0,05	0,70
10pmol/µl reverse primer	0,50	7,00
10pmol/µl forward primer	0,50	7,00
Nuclease-free H ₂ O	6,70	93,8
Toplam hacim		140

Çizelge 3.5. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri

Gene	Primer	Baz Dizilişi (5’ to 3’)	Ürünlerin Uzunluğu	Annealing sıcaklığı	Döngü
<i>COR78</i>	KB39	F- gaa tgg tgc gac taa gat gtt tag gaa	280 bç	55 °C	28
	KB40	R- gta cag att cag tgg gtt tgg tgt aat			
<i>RD29b</i>	KB41	F- gtg aag atg act atc tcg gtg gtc	350 bç	51 °C	29
	KB194	R- tcc atc cca get ttt gat tc			
<i>RAB18</i>	KB45	F- atg acg agt acg gaa atc cga tgg	520 bç	51 °C	30
	KB46	R- tat gta tac acg att gtt cga agc			
<i>COR47</i>	KB47	F- atg gct gag gag tac aag aac aac gtt	390 bç	55 °C	25
	KB48	R- tct tct tct tct tct cct tct ttt cct			
<i>COR6.6</i>	KB101	F- gct ggc aaa gct gag gag aa	104 bç	55 °C	28
	KB102	R- ttc ccg cct gtt gcg cgg			
<i>Gols3</i>	KB248	F- gga gtg gtt ggt ctg gct aa	160 bç	53 °C	29
	KB249	R- ttg gtt atc cgg tgg gta aa			
<i>COR15a</i>	KB250	F- atg gct tct tct ttc cac agc	170 bç	53 °C	30
	KB251	R- gaa get ttc ttt gtg gcc tc			
<i>RD22</i>	KB43	F- gtg gct aag aag aac gca ccg atgc	550 bç	55 °C	32
	KB44	R- gtt ttg caa aaa cct ata ata aaa tta gag			
<i>XERICO</i>	KB366	F- atg ggt cta tca agt ctt cc	470 bç	48 °C	30
	KB367	R- gat ggt ctt ctg gca ca			

F: forward primer, R: reverse primer

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR ürünleri %0,8'lik Agaroz jel (Sigma) elektroforezi ile ayrılmış ve ethidium bromür ile ultraviyole transilluminator tablasında (UV) görüntülenmiştir (Agaroz jel 0,4 µl/100ml Ethidium Bromür içermektedir). Agaroz 1XTAE tampon içerisinde 120°C'de eritilmiştir. Ardından, oda sıcaklığına gelene kadar soğutulan jel katılaşmadan hemen önce içerisinde tarak bulunan jel tepsisine dökülmüştür. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılmış ve elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 7 µl her PCR ürünü 6X yükleme tamponu (Bromophenol Blue) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. 6X tamponunun hazırlanışı Ek 2'de verilmiştir.

3.6.1. Elektroforezde Kullanılan Tamponların Hazırlanması

1XTAE tamponu: 20 ml 50XTAE tamponu 980 ml dH₂O ile 11'ye tamamlanmıştır. Ethidium bromide stok çözeltisi: 0,1 g ethidium bromide 10 ml dH₂O içinde karıştırılarak çözdürülmüş ve 10 mg/ml'lik stok çözelti elde edilmiştir. Şişenin etrafı alüminyum folyo ile kaplanıp karanlıkta saklanmıştır.

6X yükleme tamponu: 12,1 mg tris base (10mM), 223,3 mg EDTA (60 mM) ve 3 mg bromophenol blue (%0,3), 4 ml DNase RNase free dH₂O içinde çözdürülmüştür. Ardından 6ml glycerol (%60) eklenmiştir ve 1 ml'lik hacimlere ayrılıp -20°C'de saklanmıştır.

Jel 100 Volt 95 miliamper akımda 40 dakika boyunca yürütülmüştür ve yürütme işlemi bittikten sonra UV ışığında gözlenmiş, fotoğrafları çekilmiştir.

3.7. *sgf29a*, *ada2b*, *sgf29a;ada2b* Tohumlarının Fizyolojik Karakterizasyonu

3.7.1. *Ws* (yabani tip) ve *sgf29a*, *ada2b*, *sgf29a;ada2b* Mutant Tohumlarının Petrilere Aktarılması

Öncelikle *Ws*, *sgf29a* (-/-), *ada2b* (-/+) ve çift mutant *sgf29a* (-/-);*ada2b*(-/+) tohumlarının sterilizasyon işlemleri yapıldıktan sonra %1 sükröz içeren Gamborg B5 ortamı ile çimlendirilmiştir. Yabani tip tohumlar için 4 petri kullanılmıştır ve her petriye 150 adet yabani tip tohum ekilmiştir. *sgf29a* tohumları için 2 petri kullanılmıştır ve aynı şekilde her petriye 150 adet tohum ekilmiştir. *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* tohumları için ayrı ayrı 8 petri kullanılmıştır ve her petriye 150 adet tohum ekilmiştir. Ekimi yapılan petrilere çimlendirilmek üzere (16 saat ışık + 8 saat karanlık), 25±2°C, 28.080 lux floresan ışık şiddetine ayarlanmış bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir.

5 günlük süre sonunda gelişen fidecikler farklı tuz konsantrasyonları (0, 50, 75, 100 mM) içeren % 0,8 agar ve % 3 sükröz içeren Gamborg B5 ortamına aktarılmıştır. Her fidecik dikkatli bir biçimde kökleri düz gelecek şekilde ortamlara aktarılmıştır. Heterozigot tohumları içerisinde bulunduran *ada2b* (-/+) ve çift mutant *sgf29a* (-/-);*ada2b* (-/+) fideciklerinin arasından, yaprak durumlarına ve kök yapılarına bakılarak homozigot yapıda olanlar seçilmeye çalışılmıştır. Gamborg B5 ortamı bileşenleri Ek 1'de verilmiştir. Petri kapları kalemle çizilerek iki eş bölmeye ayrılmıştır. Böylece her petrinin bir bölümü yabancı tip fideciği içermiştir. Her petriye 5 adet yabancı tip ve 5 adet *ada2b-1*, 5 adet *sgf29a*, 5 adet *sgf29a;ada2b-1* fidecikleri aktarılmıştır. Fideciklerin petrilere aktarımı yapılırken, bitki yapraklarının agara batmasının önlenmesi açısından, yaprakların bulunduğu besi ortamı kesilerek atılmıştır. Böylece, köklerin uygun şartlar altında uzaması sağlanmıştır.

Her NaCl konsantrasyonu (0, 50, 75, 100 mM) için *ws:sgf29a ws:ada2b-1*, *ws:sgf29a;ada2b-1* şeklinde yabancı tip ve mutant fidecikler yan yana düşecek şekilde ortamlara aktarılmıştır. Her muamale 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Toplamda 36 petri kullanılmıştır. Petriler dikey olarak bitki büyüme odasına (22-23°C, 16/8 fotoperiyod) yerleştirilmiştir ve köklerin en alt uç kısmı işaretlenmiştir. Kök uzaması her gün gözlenmiştir ve bu süreçlerin görüntüsü fotoğraflandırılmıştır. 5 gün boyunca, her gün için köklerin son uzama noktalarına kadar petri yüzeylerine işaret koyulmuştur. 5 günün sonunda her petrinin fotoğrafı çekilerek, ImageJ programı ile kök uzama boyları ölçülmüştür. 1.gün, 2.gün, 3.gün ve 4.gün için hesaplanan kök uzama değerlerinin toplamdaki bitki için ortalamaları, standart sapmaları alınarak, grafikler üzerinde kök uzama farklılıkları analiz edilmiştir.

BÖLÜM 4**ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA****4.1. Araştırma Bulguları****4.1.1. Bitkisel Materyal ile İlgili Bulgular**

Bu çalışmada, *A. thaliana* türünde SAGA faktör 29 (*SGF29A*) ve *ADA2b*'nin biyolojik rollerinin incelenmesi için, SALK koleksiyonundan T-DNA ilaveli mutant hatlar olarak kullanılmıştır. SAGA protein kompleksi üyesi olduğu bilinen *sgf29a* geninin moleküler işlevi tam olarak belirlenememiştir (Sanders ve ark., 2002; Rodriguez-Novarro ve ark., 2004). Bu sebeple bu çalışmada *sgf29a* geninin mutantlarında, belirlenen genlerin ekspresyon analizlerine bakılmıştır.

Heterozigot ve homozigot tohumların bir arada bulunduğu *ada2b(-/+)* ve *sgf29a(-/-)*; *ada2b(-/+)* çift mutant tohumlarını içeren petriyer yatay olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir. 10 gün süre sonunda yetişen tohumlar arasında homozigot görünümlü fidelikler yaprak durumları ve dikotillerinin durumlarına bakılarak seçilmiştir ve yeni petriyer aktarılmıştır. Homozigot bitkiciklerin seçimlerinin ardından petriyer kök uzamaları için dikey olarak bitki büyüme odasına yerleştirilmiştir.

Çalışmamızda homozigot yapıda olan fidelikler kullanılmıştır. Çünkü homozigot fidelikler kullanıldığında *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1*'in her iki allelide mutant olacağı için fonksiyonunu yerine getiremeyecek, böylece yabancı tipe göre mutantlarda nasıl bir farklılık olacağı ortaya çıkacaktır.

Arabidopsis genomu *SGF29*'un iki ortoloğunu şifrelemektedir. Amino asit sekansında % 91 benzerlik gösteren *SGF29a* ve *SGF29b* olarak dizayn edildiği bildirilmiştir.

(Vlachonasis ve ark., 2008). Çalışmamızda *sgf29a* mutant geni üzerinde durulmuştur.

4.1.2. Tuz Stres Uygulamasına Ait Bulgular

Çalışmada tuz stresi uygulanarak bitkilerde tuz teşvikini sağlayan bazı genlerin mutantlarda farklı saat aralıklarında (0, 3, 12) NaCl uygulaması sonunda tuz indükleyici genlerin mutantlarda ifade oluşunun araştırılması amaçlanmıştır.

Yaptığımız çalışmada tuz stresi uygulaması için, petriyerden kökleri ile birlikte yapraklı fidelikler alınmıştır. Alınan kontrol, *sgf29a*, *ada2b-1* ve çift mutant *sgf29a;ada2b-1* bitkileri 0, 3 ve 12 saat aralıkları ile 100 mM NaCl konsantrasyonunda muamele edilmiştir.

Sonuçta 3 saatlik sürede tuz induksiyonu (teşviki) belirlenecek, şayet böyle bir durum söz konusu ise 3 saatlik süredeki gen ekspresyon seviyeleri 0 saatlik süredeki gen ekspresyon seviyelerinden fazla olacaktır.

Abiyotik stres yanıtının anlaşılması ve kontrolü ile ilgili olarak pek çok farklı araştırma grubu çalışmalar yapmışlardır (Cushman and Bohnert, 2000; Hasegawa ve ark., 2000; Knight, 2000; Schroeder ve ark., 2001; Serrano and Rodriguez-Navarro, 2001; Thomashow, 2001; Zhu, 2001b, 2001a).

4.1.3. RT-PCR’da Kullanılmak Üzere Hesaplanmış RNA Konsantrasyonu Analiz Bulguları

Bu çalışmada kullanılan *A. thaliana*’da SAGA faktör 29 (*sgf29a*), *ada2b-1* ve çift mutant olarak elde edilmiş *sgf29a; ada2b-1* bitkilerinden RNA özütü eldesinden sonra, RT-PCR analizinde kullanılacak olan RNA konsantrasyonlarının miktarları "optikal densitometre" kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.1).

a. Optical Density

Her bir RNA örneğinin 25 kez dilüsyonu:

Yani epondorf tüplerinde; 20 µl RNA örneği + 480 µl H₂O (Optical densitometrede 260 nm’de ölçülen optikal density)

Her bir RNA örneğinin konsantrasyonu ise şu şekilde hesaplanmıştır;

$$C = O.D_{260nm} \cdot 40. \text{ Dilüsyon (seyreltme) faktörü } (\mu\text{g/ml})$$

$$C = O.D_{260nm} \cdot 40. 25 = O.D_{260nm} \cdot 1000 (\mu\text{g/ml})$$

$$C = O.D_{260nm} \cdot 1 (\mu\text{g/ } \mu\text{l})$$

b. RNA örneklerinin dilüsyonu

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$V_2 = C_1 \times V_1 / C_2$$

Her bir RNA örneğinden 10’ar µl alınmıştır. Böylelikle $V_1 = 10 \mu\text{l}$,

Örneğin konsantrasyonu C_1 , optical denstiy’e göre belirlenmiştir. Tüm örnekler için final (C_2) konsantrasyonu ise $0.0025 \mu\text{g/ } \mu\text{l}$ olması istenmiştir. (RNA’nın kısa olması çok miktarda c-DNA eldesine sebep olmaktadır) ve buradan

$$V_2 = C_1 \cdot 400 (\mu\text{l}) \text{ ifadesi bulunmuştur.}$$

Böylece her bir RNA örneğinden alınmış olan 10’ar µl’yi V_2 final hacmine eşitlemek için eklememiz gereken "RNase free H₂O" miktarı bulunmuştur (Şekil 4.2). Böylelikle RNA örneklerinin reverse transkriptaz reaksiyonunda kullanımı için RNase-free H₂O ile seyreltilmiştir

Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları

	Absorbans (260nm)	$C = O.D_{260} \times 40 \times \text{seyreltme faktörü} (\mu\text{g/ml})$ (seyreltme faktörü=25) $C = O.D_{260} \text{ nm.l} (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ $C_1 \times 10 = 0.025 \times V_2$ $V_2 = C_1 \times 400$
Ws 0h	0,346	$0,346 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	138,4 μl
Ws 3h	0,144	$0,144 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	57,6 μl
Ws 12h	0,258	$0,258 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	103,2 μl
<i>Sgf29a</i> 0h	0,236	$0,236 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	94 μl
<i>Sgf29a</i> 3h	0,285	$0,285 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	114 μl
<i>Sgf29a</i> 12 h	0,158	$0,158 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	63,2 μl
<i>ada2b-1</i> 0h	0,202	$0,202 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	80,8 μl
<i>ada2b-1</i> 3h	0,328	$0,328 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	131,2 μl
<i>ada2b-1</i> 12 h	0,237	$0,237 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	94,8 μl
<i>Sgf29a/ada2b-1</i> 0h	0,131	$0,131 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	52,4 μl
<i>Sgf29a/ada2b-1</i> 3h	0,186	$0,186 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	74,4 μl
<i>Sgf29a/ada2b-1</i> 12h	0,133	$0,133 \times 1 (\mu\text{g}/\mu\text{l})$	53,2 μl

Çizelge 4.2. Final Hacime'e göre RT-PCR'da kullanılmış H₂O miktarları

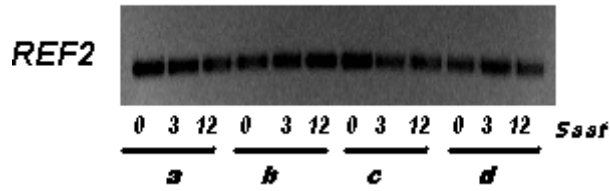
	V ₂ (µl)	H ₂ O(µl)	RNA(µl)
Ws 0h	138,4µl	128,4	10
Ws 3h	57,6 µl	47,6	10
Ws 12h	103,2µl	93,3	10
<i>Sgf29a</i> 0h	94 µl	84	10
<i>Sgf29a</i> 3h	114 µl	104	10
<i>Sgf29a</i> 12 h	63,2 µl	53	10
<i>Ada2b-1</i> 0h	80,8 µl	70,8	10
<i>Ada2b-1</i> 3h	131,2 µl	121,2	10
<i>Ada2b-1</i> 12 h	94,8 µl	84,8	10
<i>Sgf29a/ada2b-10h</i>	52,4 µl	42,4	10
<i>Sgf29a/ada2b-13h</i>	74,4 µl	64,4	10
<i>Sgf29a/ada2b-1</i> 12h	53,2 µl	43,2	10

4.1.4. RT-PCR Analiz Bulguları

Bu çalışmada *A. thaliana* bitkisine ait *sgf29a*, *ada2b-1* ve çift mutant *sgf29a; ada2b-1* mutant dokularından izole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA'lar Nucleospin Reverse Transcription kit ile sentezlenmiştir. Total RNA örneklerindeki rRNA'ları elemine etmek için özellikle poly- A kuyruklu mRNA'lara bağlanan oligo-dT primerler tercih edilmiştir. Ardından *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant hatlarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak *REF2*, *RD29B*, *RD22*, *COR15A*, *COR47*, *COR78*, *COR6.6*, *XERICO*, *RAB18*, *GOLS3* genleri ile bu genlere ait primerlerle RT-PCR gerçekleştirilmiştir. Böylece mutantların tuz stresi altında bu genler üzerinde ifade oluşları değerlendirilmiştir. Mutantların belirttiğimiz genler üzerinde açıkça ifade olduğu gözlenmiştir. Bu genlere ait bilgi TAIR (The Arabidopsis Information Resource) web sayfasından elde edilmiştir (<http://www.arabidopsis.org>) (Çizelge 4. 3).

Çizelge 4.3. RT-PCR’da primer olarak kullanılmış gen adları ve tanımları

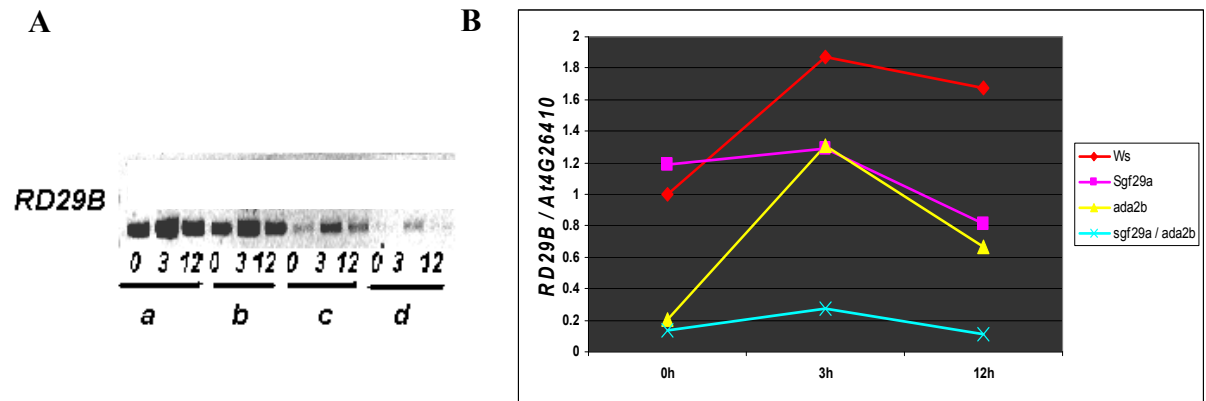
GEN ADI	GEN TANIMI
<i>REF2</i> (Reduced Epidermal Fluorescence 2)	Oksin dengesinin sağlanmasında görev alır.
<i>RD29B</i> (Responsive to dessication 29B)	Soğuk, yüksek tuz ve kuraklık benzeri su yoksunluğuna karşılık olarak ekspresyonda uyarılmış proteini şifreler. Yanıt absisik asit yolu ile gerçekleşir.
<i>RD22</i> (Responsive to dessication 22)	ABA tarafından aracılık yapan kuraklık 22’ye duyarlıdır.
<i>COR15A</i> (Cold Regulated 15A)	Soğuk düzenlenmiş gen (<i>COR15A</i>) in vivo kloroplastlarda ve in vitro protoplastlarda soğuk toleransını artırır.
<i>COR47</i> (Cold Regulated 47)	Soğuk düzenlenmiş gen, amino asit sekansı Grup II Lea proteinleri ile özdeşlik gösterir.
<i>COR78</i> (Cold Regulated 78)	<i>Cor78</i> ’in 5’ bölgesi soğuk düzenlenmiş gen ifadesini açıklayabilen cis-acting düzenleyici elementlerini içerir.
<i>COR6.6</i> (Cold-Responsive 6.6)	Absisik asit ve soğuk tarafından uyarılabilen geni şifreler. Soğuk iklime alıştırmaya ve tuz toleransında görev almaktadır.
<i>XERICO</i>	Gen ifadesi tuz ve osmotik stres ile indüklenmiştir. ABA metabolizması ile ilişkilidir.
<i>RAB18</i> (Responsive to ABA 18)	<i>RAB18</i> fosfolipid diacylglycerol pirofosfatın oluşumuna karşılık olarak ifade edilmiştir.
<i>GOLS3</i> (Galactinol synthase 3)	<i>A. thaliana</i> galactinol sentetaz 3 transferaz aktivitesi ve glikozil grup transferinde görev alır. Kök ve hipokotilde ifade olmuştur.



Şekil 4.1. Döngü sayısı 32 olan *REF2* geni PCR sonucu.

(a: ws, b: *sgf29a*, c: *ada2b*, d: *sgf29a; ada2b-1*)

REF2 geni için gen ekspresyon düzeyi *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarında sabit olduğundan kontrol olarak kullanılmıştır (Şekil 4.1). *REF2* (At4G26410) spesifik primerleri RT-PCR analizlerinde kullanılmıştır. *REF2* geni 81 baz çifti olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Döngü sayısı 28 olan *RD29B* geni PCR sonucu.

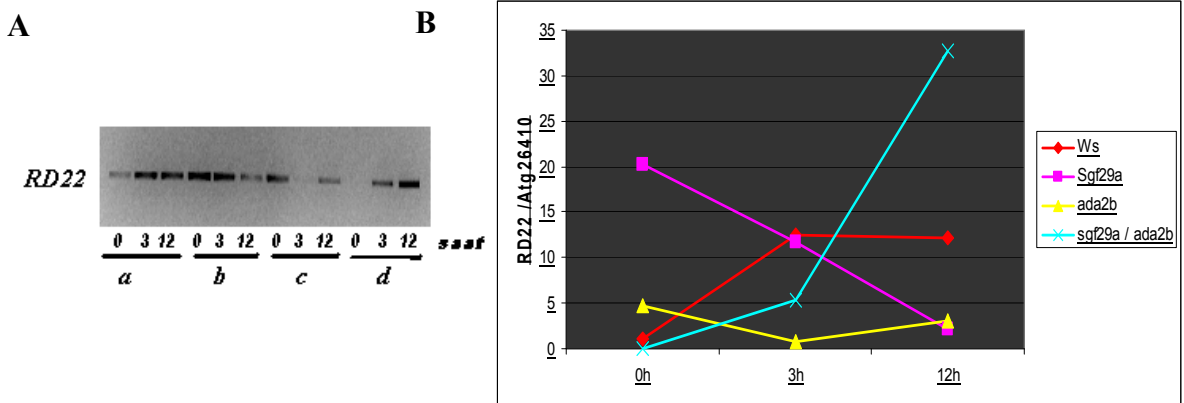
- (A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *RD29B* geninin ifadesi
- (B) *RD29B* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

NaCl muamesesi altında, *RD29B* geninde hem yabancı tip hem de *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant fidecikleri ifade olmuştur (Şekil 4.2). *RD29B* geninin ekspresyonunda, tuz stresine maruz bırakılmayan *sgf29a* mutantında yabancı tipe kıyasla ifadenin fazla değişmediği görülmüştür. Tuz stresine maruz bırakılmayan *ada2b-1* mutantında ise yabancı tipe göre gen ifadesinde 5 kat azalma gözlenmiştir. Aynı şekilde tuz stresine maruz bırakılmayan *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında, *ada2b-1* mutantına

benzer şekilde gen ifadesinin yabancı tipe kıyasla yaklaşık olarak 5 kat azaldığı gözlenmiştir. Tuz stresinin 3. saatinde, *sgf29a* mutantında, yabancı tipe kıyasla *RD29B* gen ifadesinin yaklaşık olarak 1,5 kat azaldığı gözlenmiştir. Aynı şekilde *ada2b-1* mutantında ise yabancı tipe göre gen ifadesinin yaklaşık 2 kat azaldığı görülmüştür. Fakat PCR jel görüntüsüne bakıldığında *ada2b-1* mutantında tuz stresinin 3. saatinde yabancı tipe kıyasla ifadenin daha düşük olduğu görülmüştür. *sgf29a;ada2b-1* mutantında ise yabancı tip bitkiye göre gen ifadesinin yaklaşık olarak 9 kat azaldığı gözlenmiştir. Tuz stresinin 12. saatinde *sgf29a* mutantında yabancı tipe göre gen ifadesinin 2 kat azaldığı belirtilmiştir. *ada2b-1* mutantında ise yabancı tipe göre gen ifadesinin düşmeye devam ettiği gözlenmiştir. Tuz stresinin 12. saatinde *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında ise yabancı tipe göre gen ifadesinin yaklaşık olarak 17 kat azaldığı grafikte gözlenmiştir.

Tuz stresinin 3. saatinde genin daha iyi ifade olduğunu göz önünde bulundurarak, 3. saatte *RD29B* geninin *sgf29a* mutantında yabancı tip bitkiye kıyasla hemen hemen aynı seviyede ifadeye sahip olduğu gözlenirken, *RD29B* geni *ada2b-1* mutantında yabancı tip bitkiye kıyasla daha düşük ifade olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak tuz stresi altında, *ada2b-1* mutantının *RD29b* geninin transkripsiyonunda pozitif düzenleyici role sahip olduğu düşünülmüştür. Aynı zamanda genin yabancı tip bitkiye göre *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında, *ada2b-1* mutantına kıyasla çok daha düşük ifade olduğu gözlenmiştir.



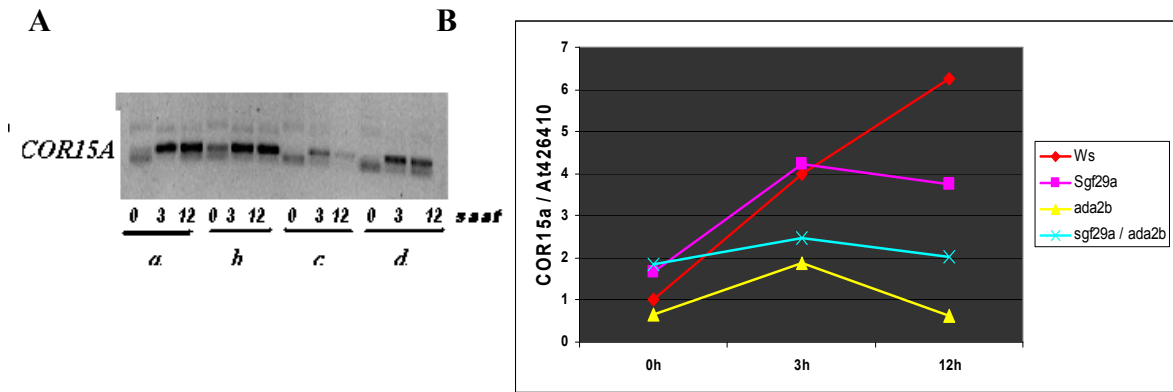
Şekil 4.3. Döngü sayısı 30 olan *RD22* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *RD22* geninin ifadesi.

(B) *RD22* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

Şekil 4.3’ de görüldüğü gibi, *RD22* geninin NaCl uygulamasının 3. saatinde *ada2b-1* mutantında belirgin şekilde ifade olmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde tuz stresi uygulanmamış *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında da genin ifade olmadığı görülmüştür. *sgf29a* mutantında yabancı tipe kıyasla genin yüksek ifade olduğu gözlenmiştir. *ada2b-1* mutantında ise yabancı tipe kıyasla 5 kat fazla ifade olduğu gözlenmiştir. Çift mutant *sgf29a;ada2b-1*’de ise genin ifade olmadığı gözlenmiştir. *RD22* geninin ekspresyonunda, tuz stresinin 3. saatinde *sgf29a* mutantında yabancı tip bitkiye kıyasla aynı seviyede ifade olduğu gözlenmiştir. *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında ise yabancı tipe kıyasla düşük ifadeye sahip olduğu gözlenmiştir. Tuz stresinin 12. saatinde ise genin ifadesine bakıldığında, *sgf29a* ve *ada2b-1* mutantında yabancı tipe kıyasla gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında ise yabancı tipe kıyasla *RD22* geninin yüksek seviyede ifade olduğu gözlenmiştir.

Tuz teşvikinin sağlandığı 3. saatte, yapılan değerlendirmelere göre *RD22* geninin ifadesinde mutantların rolü olmadığı düşünülmüştür. *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında yabancı tipe göre genin ifadesi azalmıştır. Fakat tuz stresinin 12.saatinde yabancı tip bitkiye göre gen ifadesi artış göstermiştir.

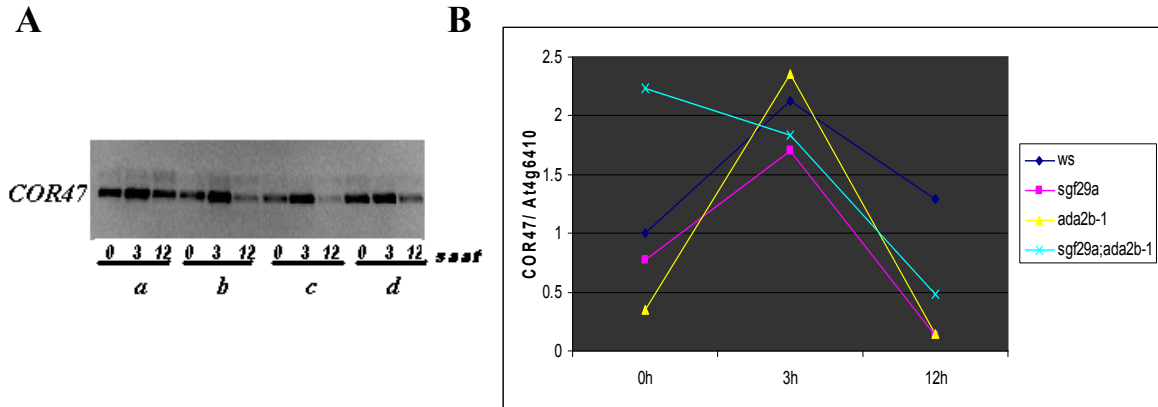


Şekil 4.4. Döngü sayısı 30 olan *COR15A* geni PCR sonucu.

- (A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *COR15A* geninin ifadesi
- (B) *COR15A* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur

Şekil 4.4.'de görüldüğü gibi, *COR15a* gen ifadesinin, tuz stresine maruz bırakılmayan *sgf29a* ve çift mutant *sgf29a;ada2b-1* mutantında yabani tipe kıyasla yaklaşık iki kat fazla olduğu gözlenmiştir. *ada2b-1* mutantında ise yabani tipe kıyasla gen ifadesinin düştüğü gözlenmiştir. Tuz stresinin 3. saatinde, *COR15a* gen ifadesinin *sgf29a* mutantında yabani tip bitki ile aynı seviyede olduğu gözlenmiştir. *ada2b-1* mutantında ise yabani tip bitkiye kıyasla gen ifadesinin 2 kat azaldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında yabani tipe kıyasla gen ifadesinin 1,5 kat azaldığı gözlenmiştir. Tuz stresinin 12. saatinde *sgf29a* mutantında yabani tipe göre gen ifadesinin 1,5 kat azaldığı gözlenirken, *ada2b-1* mutantında yabani tipe göre gen ifadesinin yaklaşık 9 kat azaldığı gözlenmiştir. *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında ise gen ifadesinin yabani tip bitkiye kıyasla 3 kat azaldığı gözlenmiştir.

Cor15a geninin ekspresyonunda, tuz stresinin 3. saatinde en düşük ifade seviyesinin *ada2b-1* mutantında olduğu gözlenmiştir. Bu durumda *ada2b-1* mutantının *Cor15a* geninin transkripsiyonunda pozitif düzenleyici role sahip olduğu düşünülmüştür.

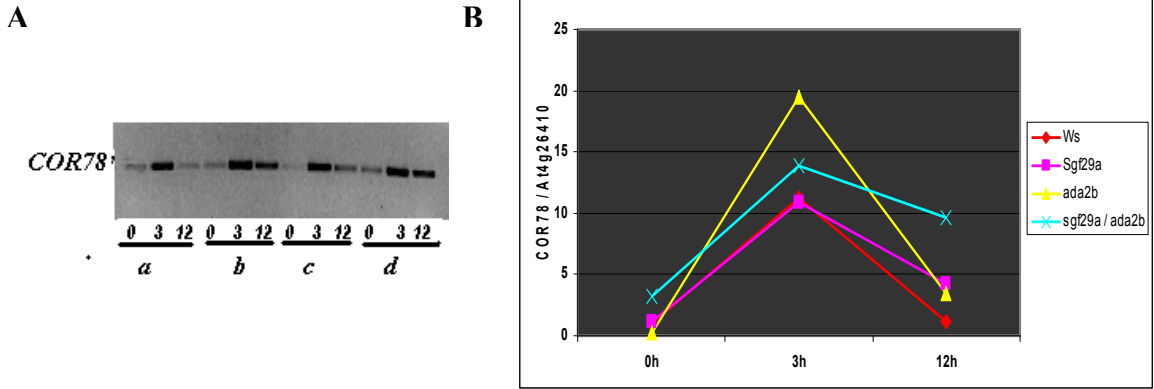


Şekil 4.5. Döngü sayısı 25 olan *COR47* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *COR47* geninin ifadesi

(B) *COR47* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

Şekil 4.5' da görüldüğü gibi, mutantlarda *COR47* geninin ifade olduğu gözlenmiştir. *COR47* geninin ifadesine bakıldığında, yabani tipe kıyasla tuz stresinin 3. saatinden itibaren *sgf29a*, *ada2b-1* mutantlarında devamlılık gösteren azalma veya artma gözlenmemiştir. Sonuç olarak *COR47* geninin *sgf29a*, *ada2b-1* mutant genleri tarafından düzenlenmediği düşünülmüştür.

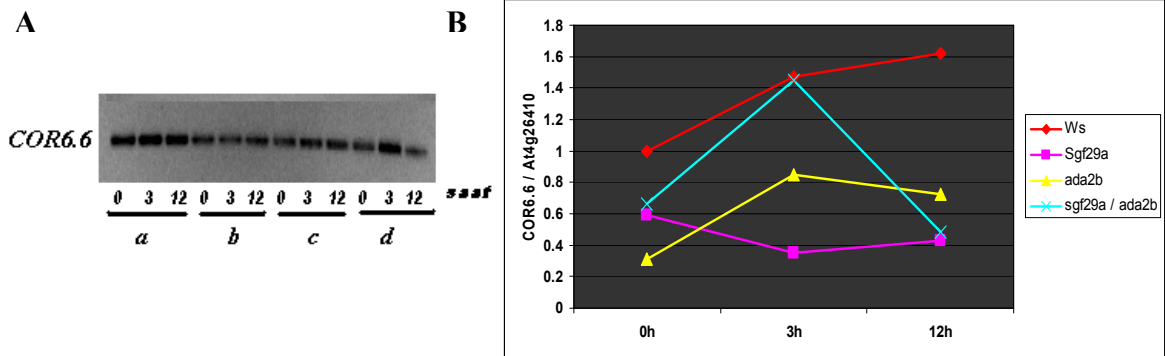


Şekil 4.6. Döngü sayısı 28 olan *COR78* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *COR78* geninin ifadesi

(B) *COR78* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur

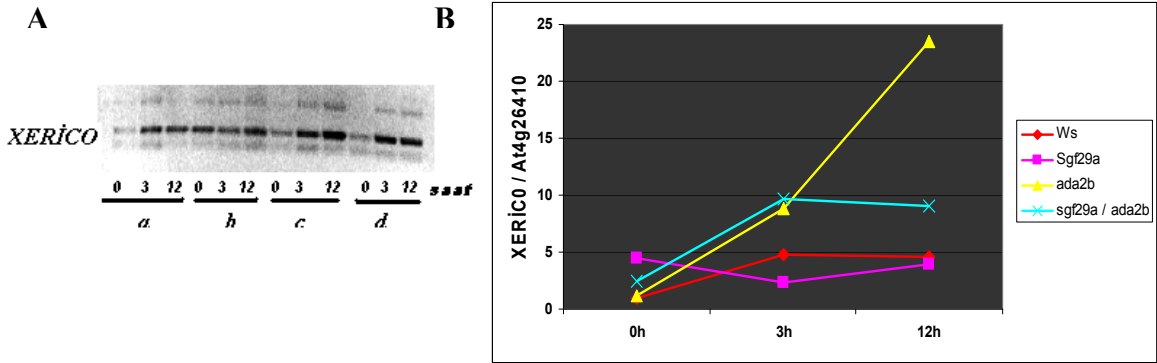
Şekil 4.6'de gösterildiği gibi *COR78* geninin ifadesinde, tuz stresinin 3. saatinden sonra *ada2b-1* mutantında yabancı tipe kıyasla ifadenin yaklaşık 2 kat arttığı gözlenmiştir. Tuz stresinin 12. saatinden sonra ise *ada2b-1* mutantında gen ifadesinin düştüğü gözlenmiştir. *sgf29a* mutantında ise yabancı tipe kıyasla gen ifadesinin değişmediği gözlenmiştir. Yabancı tipe kıyasla mutantlarda tuz stresinin 3. saatinden itibaren, gen ifadesinde devamlılık gösteren bir azalma veya artma gerçekleşmediğinden, *COR78* geninin *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutantları tarafından düzenlenmediği düşünülmüştür.



Şekil 4.7. Döngü sayısı 30 olan *COR6.6* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra *Ws* (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *COR6.6* geninin ifadesi

(B) *COR6.6* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur

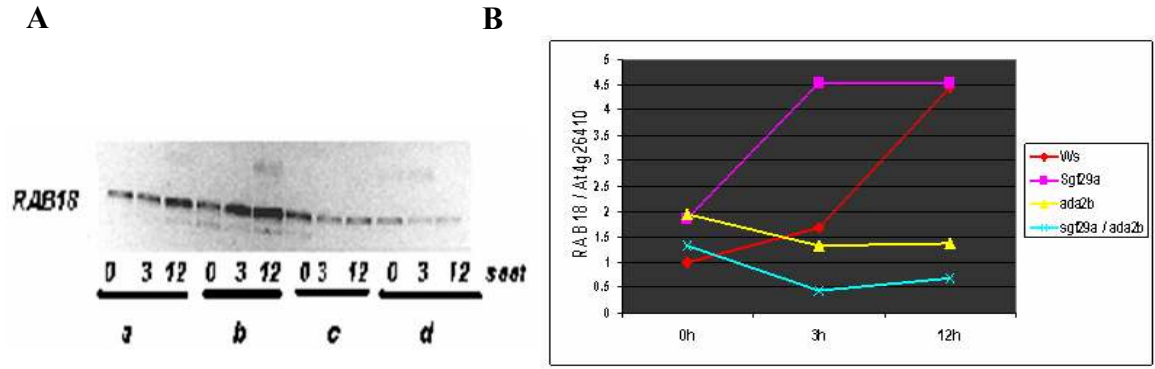


Şekil 4.8. Döngü sayısı 30 olan *XERICO* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra *Ws* (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *XERICO* geninin ifadesi.

(B) *XERICO* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

Şekil 4.8’de görüldüğü gibi *sgf29a* mutantında yabani tip bitkiye kıyasla tuz stresinin 3. saatinden sonra gen ifadesi azalmaya başlamıştır. Fakat tuz stresinin 12. saatinden sonra *sgf29a* mutantı ile yabani tip bitkinin gen ifade seviyesinin hemen hemen benzer olduğu gözlenmiştir. *XERICO* gen ifadesi *ada2b-1* mutantında tuz stresinin 3. saatinden sonra yabani tipe göre artış göstermiştir. Tuz stresinin 12. saatinden sonra ise gen ifadesi artmaya devam etmiştir. Tuz stresinin 3. saatinden sonra *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında gen ekspresyon seviyesi yabani tipe göre 2 kat fazladır. Tuz stresinin 12. saatinden sonra ise gen ekspresyon seviyesi aynı şekilde yabani tip bitkiden fazla olup, *ada2b-1* mutantından düşük ifade seviyesine sahip olduğu gözlenmiştir. Diğer gen ekspresyonları ile karşılaştırıldığında yalnızca *COR15A* ifade seviyesinin tuz stresinin 3. saatinden sonra ve 12. saatinden sonra *ada2b-1* mutantında yabani tipe kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir.



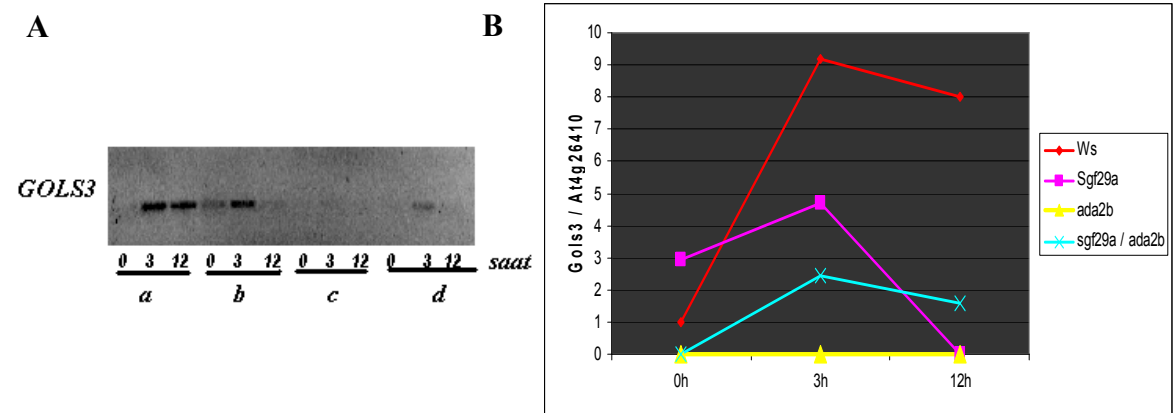
Şekil 4.9. Döngü sayısı 30 olan *RAB18* geni PCR sonucu.

(A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *RAB18* geninin ifadesi.

(B) *RAB18* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

Şekil 4.9'da *RAB18* geninin ifade seviyesinin tuz stresinin 3. saatinden sonra yabancı tip bitkiye kıyasla *ada2b-1* mutantında azaldığı gözlenmiştir. *sgf29a;ada2b-1* mutantında ise gen ifade seviyesinin *ada2b-1* mutantından daha düşük olduğu ortaya çıkmıştır. Aynı durum *RD29B* geninin ekspresyonunda da gözlenmiştir. Tuz stresinin 3. saatinden sonra *sgf29a* mutantında yabancı tip bitkiden daha yüksek gen ifadesi gerçekleşirken, tuz stresinin 12. saatinden sonra *sgf29a* mutantında gen ifade seviyesinin yabancı tip bitki ile benzer olduğu gözlenmiştir.

Tuz stresinin 3. saatinden sonra *ada2b-1* mutantında gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Benzer sonuç *RD29B* ve *COR15A* gen ifadesinde de gözlenmiştir.



Şekil 4.10. Döngü sayısı 29 olan *GOLS3* geni PCR sonucu.

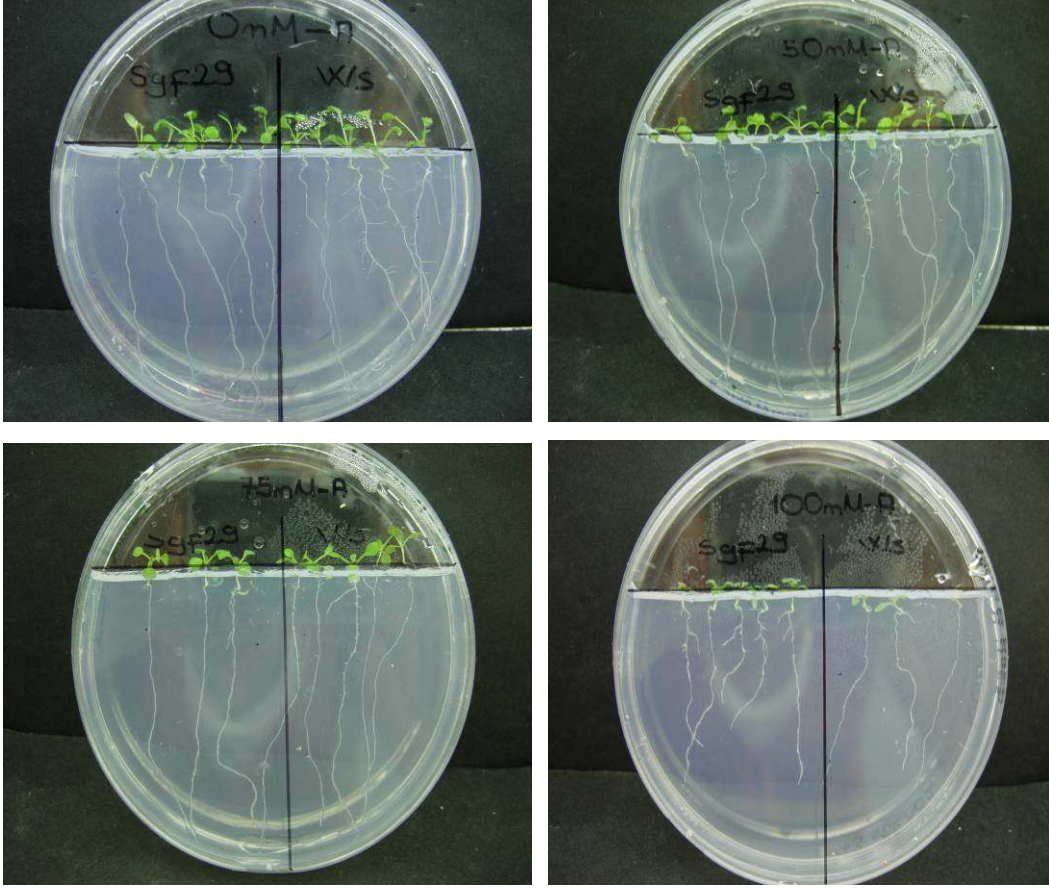
(A) NaCl muamelesinden sonra Ws (a) ve *sgf29a* (b), *ada2b-1* (c), *sgf29a;ada2b-1* (d) mutantlarında *GOLS3* geninin ifadesi.

(B) *GOLS3* gen ifadesine ait nicel değerler Gelpro32 programı ile hesaplanarak oluşturulmuştur.

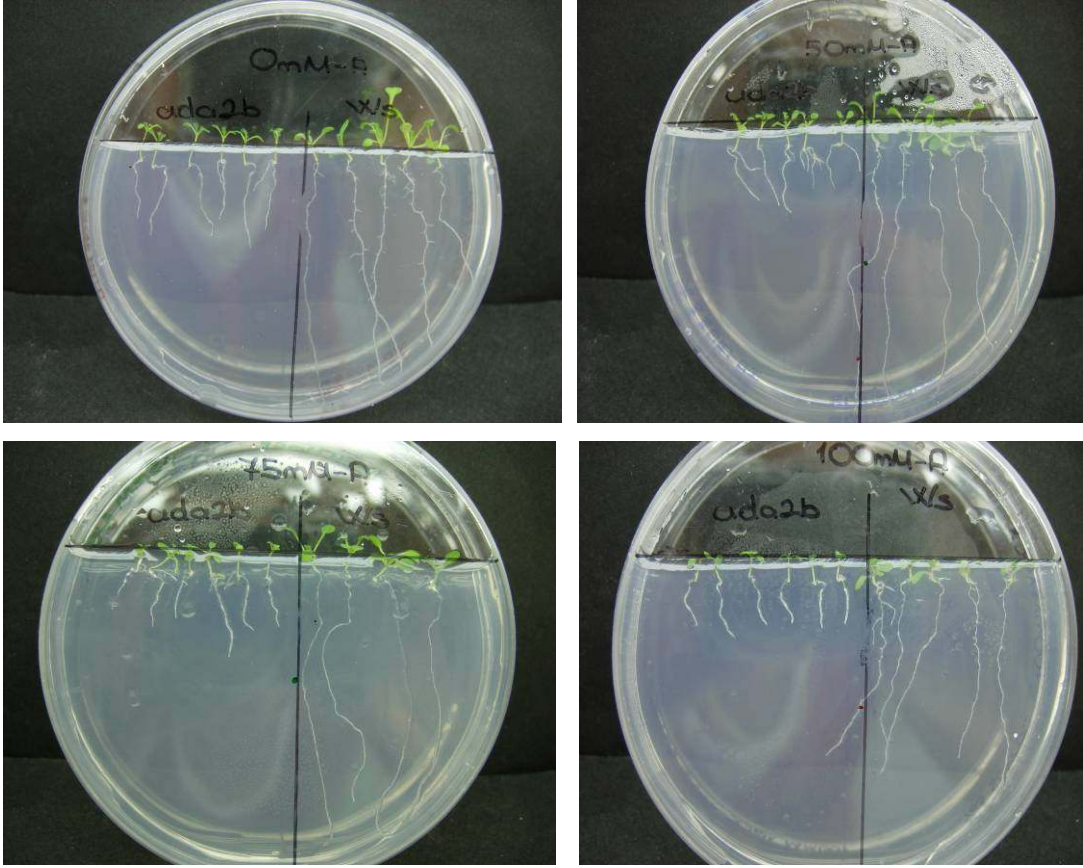
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi tuz stresine maruz bırakılmayan *sgf29a* mutantında yabancı tipe göre gen ifadesinin fazla olduğu gözlenmiştir. Tuz stresinin 3. saatinden sonra ise yabancı tipe kıyasla, *sgf29a* mutantında *GOLS3* gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. *Gols3* geninin *ada2b-1* mutantında ifade olmadığı gözlenmiştir. Tuz stresine maruz bırakılmayan *sgf29a;ada2b-1* çift mutantında ise genin ifade olmadığı gözlenirken, tuz stresinin 3. saatinden sonra çift mutantda yabancı tipe göre gen ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Döngü sayısının 27' ye düşürülerek PCR sonucunun değerlendirilmesi gerektiği düşünülmüştür.

4.1.5. Fizyolojik Karakterizasyon Bulguları

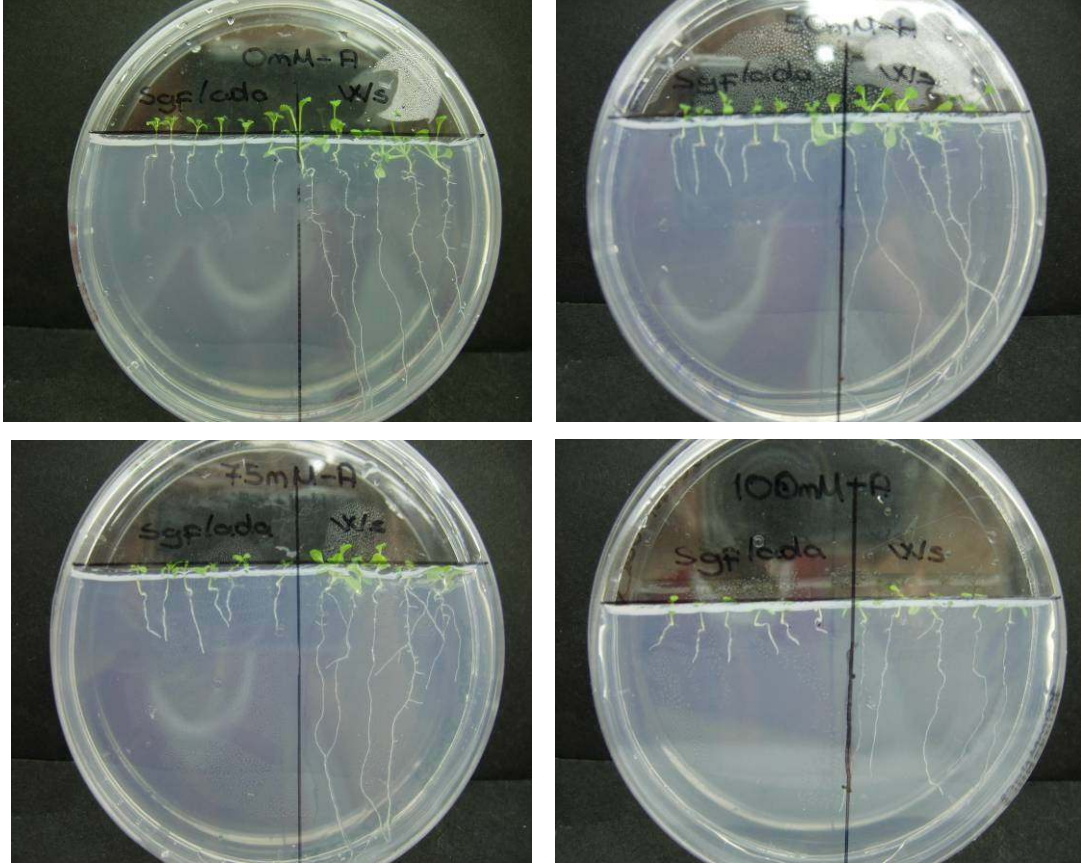
Farklı konsantrasyonlarda (0mM, 50mM, 75mM, 100mM) uygulanan NaCl muamesi ile yabancı tip, *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarında kök uzama farklılıkları tespit edilmiştir. Her NaCl konsantrasyonu 3 tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Mutantların kök boyları yabancı tip bitki ile karşılaştırılmıştır ve 4 günlük süre sonunda her gün için her fideciğin kök uzama boyları ImageJ programı ile ölçülerek değerler bulunmuştur ve ortalamaları ve standart hataları hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabanıl tip ve *sgf29a* mutant bitkilerinde kök uzama farklılıkları

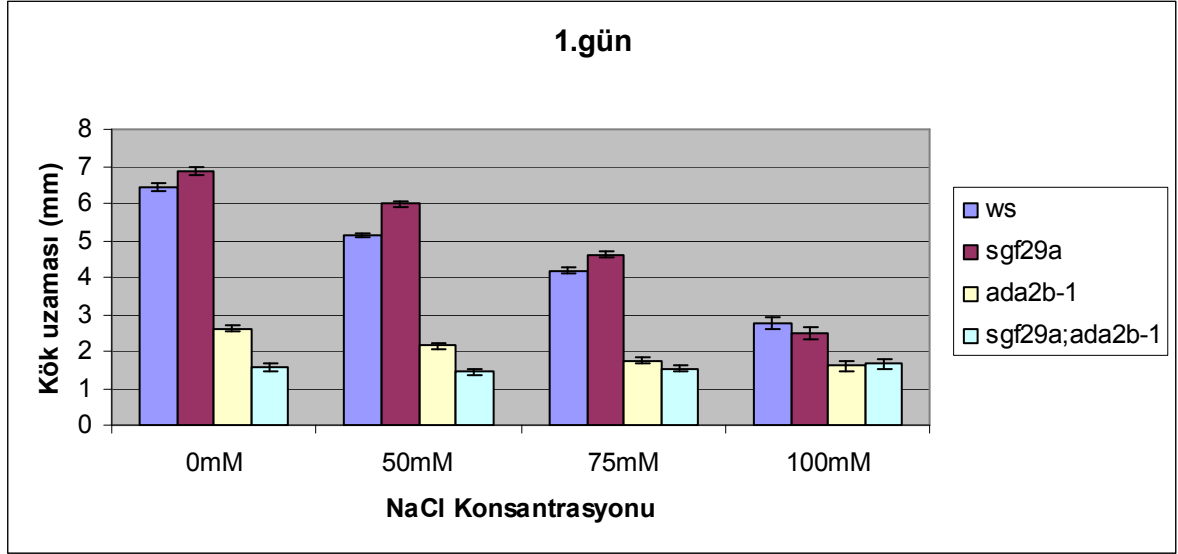


Şekil 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabani tip ve *ada2b-1* mutant bitkilerinde kök uzama farkları



Şekil 4.13. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabani tip ve *sgf29a;ada2b-1* mutant bitkilerinde kök uzama farklılıkları.

Kök gelişim analizleri ile transkripsiyonel koaktivatör mutantların tuz toleransı incelenmiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılmış mutantların 1. günün sonunda elde edilen kök uzama değerlerine ait grafik Şekil 4.15’de verilmiştir. Elde edilen her bir veri 3 tekrarın ortalaması olarak verilmiştir ve standart hata hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). 1. günün sonunda *sgf29a* kök uzamasının 0 mM, 50 mM ve 75 mM NaCl konsantrasyonlarında yabani tip bitkiye göre daha fazla direnç gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.14. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 1.günün sonunda tuz stresine yanıtı.

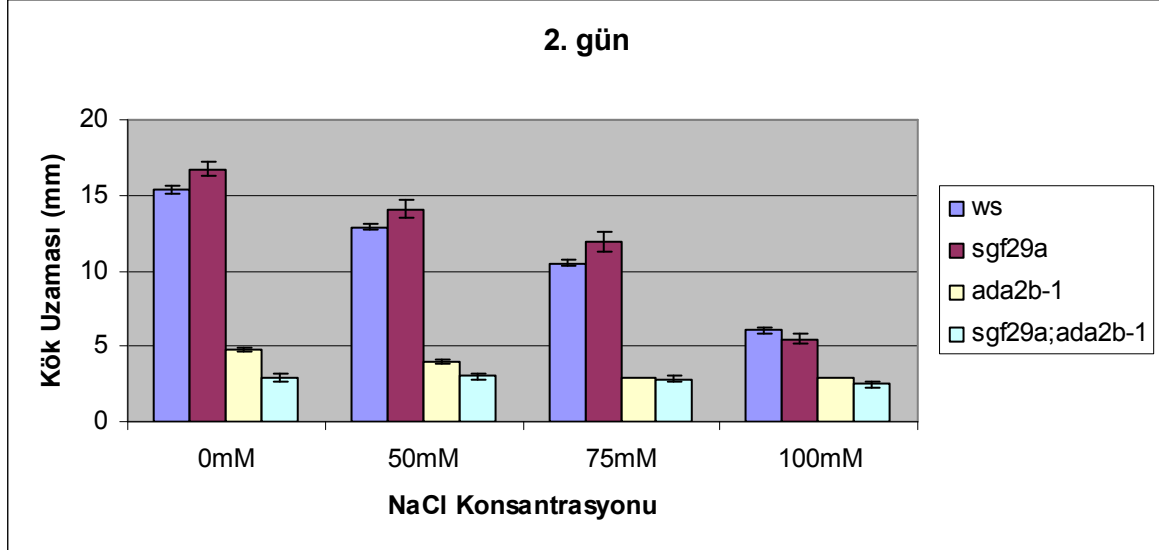
Çizelge 4.4. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen *Ws*, *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant bitkilerinin 1.günün sonunda elde edilen kök uzunlukları

	<i>Ws</i>	<i>sgf29a</i>	<i>ada2b-1</i>	<i>sgf29a ; ada2b-1</i>
0 mM	6,43±0,16	6,86±0,31	2,61±0,15	1,56±0,09
50 mM	5,15±0,13	5,98±0,37	2,14±0,16	1,45±0,07
75 mM	4,17±0,13	4,61±0,35	1,75±0,08	1,53±0,09
100 mM	2,76±0,13	2,49±0,16	1,61±0,06	1,67±0,13

Çizelgedeki her bir veri üç tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir.

Artan NaCl konsantrasyonlarına göre değerlendirildiğinde 2. günün sonunda *sgf29a* mutantının kök boyu uzamasının yabani tip bitkiye göre daha yavaş azaldığı gözlenmiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonu uygulanmış *ada2b-1* bitkisinin kök uzamasında azalma gerçekleşmiştir. *sgf29a;ada2b-1* mutantında ise 50 mM NaCl uygulamasına karşın kök uzamasında artış gözlenmiştir. Farklı NaCl konsantrasyonlarına maruz bırakılan mutant bitkilerin tuza toleranslarını anlamak amacıyla kök gelişim değerleri incelenmiştir (Şekil

4.16). 0 mM, 50 mM, 75 mM ve 100 mM NaCl konsantrasyonlarında yabani tip bitki ve *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarının 2. günün sonunda kök uzunluklarına ait ortalama değerleri Çizelge 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.15. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 2. günün sonunda tuz stresine yanıtı.

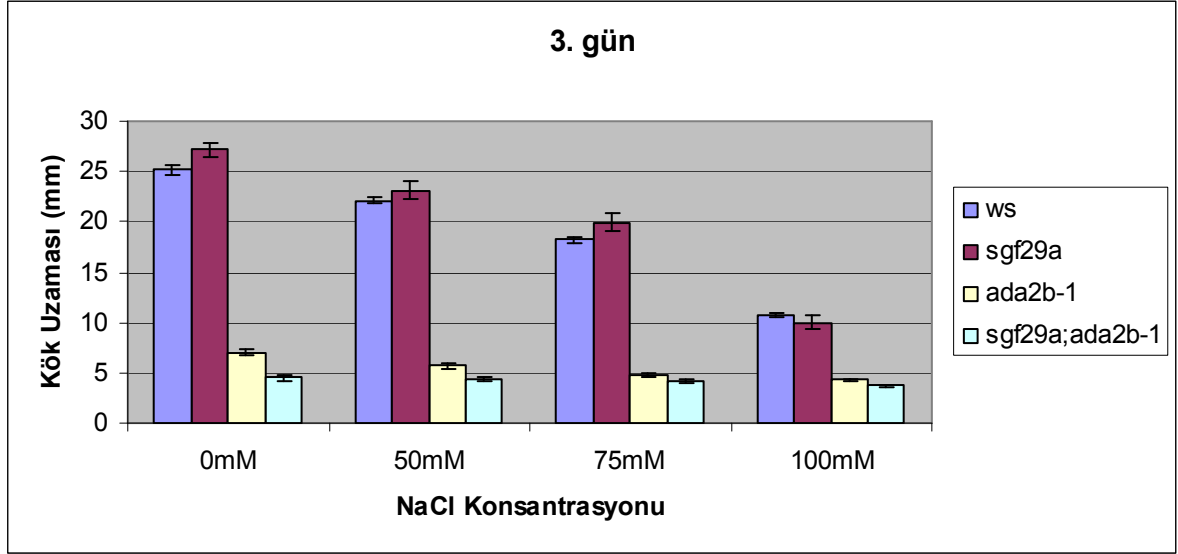
Çizelge 4.5. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen *Ws*, *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant bitkilerinin 2. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları

	<i>Ws</i>	<i>sgf29a</i>	<i>ada2b-1</i>	<i>sgf29a ;ada2b-1</i>
0 mM	15,34±0,26	16,73±0,45	4,82±0,22	2,94±0,13
50 mM	12,89±0,22	14,09±0,63	3,93±0,25	2,98±0,14
75 mM	4,17±0,13	11,96±0,65	2,88±0,12	2,83±0,14
100 mM	2,76±0,13	5,48±0,37	2,91±0,11	2,49±0,13

Çizelgedeki her bir veri üç tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda NaCl uygulanan *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutantlarında kök uzaması yabani tip bitki ile karşılaştırıldığında 3. günün sonunda *sgf29a* mutantının tuz stresine karşı direnç gösterdiği gözlenmiştir. Bu durum 100 mM NaCl konsantrasyonunda değişiklik göstermiştir. 50 mM, 75 mM NaCl konsantrasyonu dikkate alındığında *sgf29a* mutantının tuz stresine dirençli olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Bu

durum Şekil 4.17’de gösterilmiştir. Her mutantın farklı konsantrasyonlarda kök uzunluklarının ortalaması ve standart hata değerleri Çizelge 4.6’da verilmiştir. Her bir veri 3 tekrarın ortalaması şeklindedir. *ada2b-1* mutantına dikkat edildiğinde 50 mM NaCl konsantrasyonu uygulandığında kök uzamasında azalma gözlenmiştir. Bu durum 75 mM ve 100 mM NaCl konsantrasyonundada devam etmiştir. *sgf29a;ada2b-1* mutantında artan NaCl konsantrasyonlarına oranla kök uzamasında fazla miktarda azalma gözlenmemiştir.



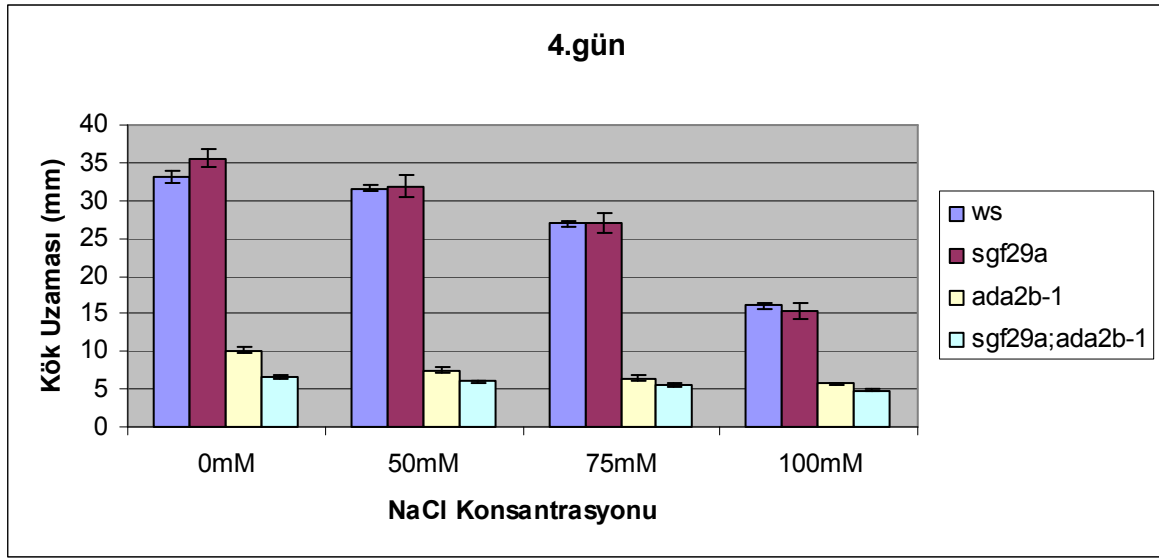
Şekil 4.16. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 3. günün sonunda tuz stresine yanıtı.

Çizelge 4.6. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen *Ws*, *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant bitkilerinin 3. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları

	<i>Ws</i>	<i>sgf29a</i>	<i>ada2b-1</i>	<i>sgf29a; ada2b-1</i>
0 mM	25,19±0,52	27,15±0,68	7,05±0,28	4,47±0,21
50 mM	22,05±0,30	22,17±0,93	5,68±0,28	4,37±0,21
75 mM	18,24±0,31	19,96±0,98	4,73±0,24	4,21±0,14
100 Mm	10,73±0,26	10,01±0,74	4,3±0,14	3,68±0,14

Çizelgedeki her bir veri üç tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir.

Şekil 4.18’de görüldüğü gibi *sgf29a* kök gelişimi yabancı tip bitkiye kıyasla tuz stresine daha fazla direnç göstermiştir. 50 mM NaCl konsantrasyonunda belirgin olarak *ada2b-1* mutantının tuz stresine hassas olduğu gözlenmiştir. *sgf29a;ada2b-1* çift mutantının ise tuz stresine karşı *ada2b-1* mutantından daha az hassaslık gösterdiği gözlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) uygulanan NaCl uygulaması ile yabancı tip, *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarında kök uzama farklılıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Kök gelişimine ait ortalama değerler ve standart hata değerleri Çizelge 4.7’de verilmiştir



Şekil 4.17. Transkripsiyonel koaktivatörlerin 4. günün sonunda tuz stresine yanıtı.

Çizelge 4.7. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen *Ws*, *sgf29a*, *ada2b-1*, *sgf29a;ada2b-1* mutant bitkilerinin 4. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları

	<i>Ws</i>	<i>Sgf29a</i>	<i>ada2b-1</i>	<i>sgf29a; ada2b-1</i>
0 mM	33,11±0,69	35,6±1,27	10,15±0,43	6,57±0,27
50 mM	31,54±0,41	31,57±1,38	7,45±0,37	5,96±0,23
75 mM	26,95±0,43	27,07±1,36	6,47±0,28	5,60±0,22
100 mM	16,07±0,32	15,33±1,1	5,71±0,20	4,88±0,18

Çizelgedeki her bir veri üç tekrarın ortalaması ± standart hata olarak verilmiştir

4.2. Tartışma

Bitki tuz toleransı çalışmaları ile *A. thaliana* genetiği uygulamaları bitkilerde yeni tolerans mekanizmalarının ortaya çıkmasına ışık tutmaktadır (Hasegawa ve ark., 1994). Bu bilgi doğrultusunda çalışmamızda kök gelişim analizlerinde transkripsiyonel aktivatörlerin tuz toleranslarına ilişkin verileri incelenmiştir. 4. günün sonunda farklı konsantrasyonlarda (0 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM) NaCl içeren kök büyüme ortamlarında test edilen *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* bitkileri yabani form ile karşılaştırıldığında, *ada2b-1* mutant bitkisinin tuz stresine hassas olduğu açıkça gözlenmiştir. Çalışmamıza paralel olarak, Hark ve ark. (2009) *Arabidopsis* cinsine ait bitkide, *ADA2B* geninin mutasyonlarının NaCl ve ABA stresine karşı hassasiyet gösterdiğini ve pleiotropik gelişimsel kusurlar gösterdiğini bildirmişlerdir.

SGF29 geni ökaryotik organizmalarda GCN5 kompleksinin yeni bileşeni olarak belirlenmiştir.

Vlachonassios ve ark. (2008), tarafından *A. thaliana* türünde SAGA faktör 29 (*SGF29*) mutasyonlarının moleküler karakterizasyonu çalışılmıştır. Homozigot *SGF29a* bitkilerinin RT-PCR analizi ile tam boy *SGF29a* transkriptinin varlığını doğrularken, *sgf29b* transkriptinin azalan miktarının *sgf29b* mutantlarında gözlemlendiğini belirtmişlerdir. *SGF29b* bitkileri yabani tip bitkilerden ayırt edilememesine karşın, *sgf29a* bitkilerinin kısa günde geç çiçeklenme, daha az ve daha küçük rozet yapraklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada *sgf29a* mutantlarının tohum çimlenmesi ve kök gelişim analizlerinde dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Bu sebeple *SGF29a*'nın tuz stresine yanıt ve kısa günde çiçeklenme zamanının düzenlenmesini kapsayabileceğini düşünmüşlerdir. Vlachonassios ve ark., 2008 tarafından yapılan çalışmaya paralel olarak araştırmamızda kök gelişim analizlerinde, 50mM ve 75mM NaCl konsantrasyonlarında, *sgf29a* bitkisinin yabani tip bitkilerden daha dirençli olduğu gözlenmiştir. Çift mutant *sgf29a;ada2b-1* bitkisinin ise kök gelişim analizlerinde ise *ada2b-1*'den daha az hassaslık gösterdiği belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde *sgf29a* ve *ada2b-1* geni ile yaptığımız araştırmaya paralel bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca *sgf29a* geninin moleküler işlevi henüz tam olarak bilinmemektedir. Bu sebeple çalışmamızda *sgf29a* mutant geninin *A.thaliana* bitkisinde stres mekanizmasında görev alan başka genlerle olan ilişkisi belirlenmeye çalışılmıştır.

Staswick ve ark. (1998), spesifik bitki hormonlarına yanıt da mutant bitkilerin kullanılmasının hormon işlevi analizi için iyi bir fırsat olabileceği üzerinde durmuşlardır.

Bu durum çalışmamızda tuz stresine bağlı olarak mutant bitkilerle çalışılma amacıyla paralellik göstermiştir.

Qiang ve ark. (2000) *A. thaliana* bitkisinde DREB1A transkripsiyon faktörü ile çalışmışlardır. DREB1A transkripsiyon faktörünün stres koşulları altında RD29A, COR6.6 ve COR15A genlerinin ifadesini artırdığını belirtmişlerdir. Ayrıca rd29A geninin promotör bölgesinde nem, soğuk stresi ve yüksek tuz stresi gibi çevresel stresleri yanıtları içerisine alan DRE-sis acting elementlerini belirlemişlerdir. Çalışmamızda da *RD29B* gen ifadesinin ve COR15A gen ifadesinin yabancı tip bitki ile karşılaştırıldığında, *ada2b* mutantında azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda *ada2b* geninin *RD29B* ve *COR15A* gen ifadesinde pozitif düzenleyici etkiye sahip olduğu düşünülmüştür. DREB transkripsiyon faktörünün DRE elementini içeren hedef genlerin ifadesini aktive edebildiği bilgisi çalışmamız ile paralellik göstermiştir. Bu durum *ada2b* geninin DRE-elementi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma *A. thaliana* (L.) Heynh türünde transkripsiyonel ko-aktivatör olan *SGF29a* ve *ADA2B* genlerinin tuz stresi altında rollerini incelemek amacı ile yapılmıştır. RT-PCR analizi ile belirlediğimiz birkaç stres yanıt geninin primerleri kullanılarak yabani tip, *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1* mutantlarında bu genlerin ifadeleri karşılaştırılmıştır. Ek olarak mutant *sgf29a*, *ada2b-1* ve *sgf29a;ada2b-1*'in tuz stresine olan tepkisi farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren kök büyüme ortamında test edilerek sonuçlar yabani form olan kontrol bitkileri ile karşılaştırılmıştır.

50 mM NaCl içeren kök büyüme ortamına bakıldığında, *ada2b-1* bitkisinin tuz stresine hassas olduğu bitkilerin kök uzunluklarına ait ortalama değerleri ile desteklenerek ortaya konmuştur. Ayrıca kök gelişim analizlerinde 50 mM, 75 mM tuz stresi altında (100 mM hariç), *sg29a-1* mutantının yabani tip bitkilere kıyasla daha fazla direnç gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca çift mutant *sgf29a;ada2b-1* bitkisinin tuz stresine *ada2b-1*'den daha az hassaslık gösterdiği gösterilmiştir.

PCR sonuçlarında ise *RD29B*, *COR15A* ve *RAB18* genlerinin ifadeleri tuz stresinin 3. saatinden itibaren transkripsiyon ko-aktivatörü olarak bilinen *ada2b-1* mutantında azalmıştır. Sonuç olarak *ada2b-1* mutantının bu genler üzerinde bir role sahip olduğu ve pozitif düzenleyici olarak görev aldığı düşünülmüştür. *XERICO* gen ifadesi ise *ada2b-1* mutantında tuz stresinin 3. saatinden itibaren artış göstermiştir. İlginç olarak, *RAB18* ve *RD29B* genlerinin ekspresyon düzeylerinin çift mutant *sgf29a;ada2b-1* mutantında, *ada2b-1* mutantından daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çift mutant *sgf29a;ada2b-1* (-/+) hattında kısa stamenler, küçük silikua ve artan çiçeklenme miktarı gözlenmiştir (Şekil ile gösterilmemiştir). Bu doğrultuda *ADA2B* geninin *SGF29A* geninin işlevini gerektirdiği sonucunu akla getirmiştir.

Sonuç olarak ADA2B'nin abiyotik strese yanıt da gen ifadesinde önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ADA2B'nin COR genlerinin promotörlerinde H₃, H₄ asetilasyon düzeylerinin kontrolü vasıtası ile tuz indükleyici bu genlerin pozitif düzenleyicisi olarak hareket ettiği sonucu elde edilmiştir.

SGF29A geni ile ilgili bilginin yetersiz olması sebebiyle, RT-PCR tekniği yerine real time PCR tekniğinin kullanılarak zamandan kazanılması ve mikroarray analizleri, blotlama teknikleri ile daha güvenilir sonuçlara gidilmesi önerilebilir.

KAYNAKLAR

- Blumwald E., 2000. Sodium transport and salt tolerance in plants. *Curr Opin Cell Biol* 12: 431-434
- Boyer L., Langer R.M., Crowley K., Tan S., Denu J. ve Peterson L.C. 2002. Essential Role For the SANT Domain in the Functioning of Multiple Chromatin Remodeling Enzymes. *Molecular Cell*, 10 (4): 935-942.
- Bohnert H.J ve Shevelevs E., 1998. Plant stress adaptations: making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1: 267-274
- Bonetta D. ve McCourt P., 1998. Genetic analysis of ABA signal transduction pathways. *Trends in Plant Science*, 3: 231–235.
- Bray E.A., Bailey-Serres J. ve Weretilnyk E., 2000. Response to abiyotic stresses. Chapter 22. In W Gruissem, B Buchannah, R Jones, Responses to abiyotic Stres. *American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD*, 1158-1249
- Busk P. ve Pagés M., 1998. Regulation of absisic acid-induced transcription, *Plant Mol. Biol.*, 37: 425-435.
- Chinnusamy V. ve Zhu J.K., 2009. Epigenetic Regulation of Stress Responses in Plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 12: 1-7
- Cushman J.C. ve Bohnert H.J., 2000. Genomic approaches to plant stres tolerance. *Curr Opin Plant Biol* 3: 117-124
- Doherty J.C., Van Buskirk A. H., Myers S. J. ve Thomashow M. F., 2009. Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription Factors in Cold Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance . *The Plant Cell*, 21: 972-984
- Grant P.A., Sterner D.E., Duggan L.J., Workman J.L. ve Berger S.L. 1998b. *The SAGA unfolds: Convergence of transcription regulators in chromatin-modifying complexes. Trends Cell Biol.* 8: 193–197
- Grill E. ve Himmelbach A., 1998. ABA signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology*, 1: 412–418.
- Hark A.T., Vlachonasios E.K., Pavangadkar A. K., Rao S., Gordon H., Adamakis D. I., Kaldis A., Thomashow F. M. ve Triezenberg J. S., 2008. Two *Arabidopsis* orthologs of the transcriptional coactivator *ADA2* have distinct biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 117-124.

- Horiuchi J., Silverman N., Pina B., Marcus G. ve Guarente L., 1997. ADA1, a Novel Component of the ADA/GCN5 Complex, Has Broader Effects than Gen5, Ada2, or ADA3. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (6): 3220-3228.
- Hasegawa P.M., Bressan , RA., Handa A.V., 1994. Cellular mechanisms of salinity tolerance. *Hort. Sci.*, 21: 1317-1324.
- Hasegawa PM., Bressan RA., Zhu JK. ve Bohnert HJ., 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 51: 463-499
- Iwasaki T., Yamaguchi-Shinozaki K. ve Shinozaki K., 1995. Identification of a cis-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 247:391–398.
- Jenuwein T. ve Allis C. D., 2001. Translating the histone code. *Science*, (293)1074–1080
- Kamei A., Seki M., Umezawa T., Ishida J., Sataou M., Akiyama K., Zhu J.K. ve Shinozaki K., 2005. Analyses of gene expression profiles in Arabidopsis salt overly sensitive mutants sos2-1 and sos3-1. *Plant, Cell and Environment*, 28: 1267-1275
- Kasuga M., Liu Q., Yamaguchi-Shinozaki K. ve Shinozaki K., 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-291
- Klug W.S., 1994. Genetic. *Prentice Hall*. 353-372.
- Knight H., 2000. Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int Rev Cytol* 195: 269-234
- Lee T.I., Causton H.C., Holstege F.C., Shen W.C., Hannett N., Jennings E.G., Winston F., Green M.R. ve Young R.A., 2000. Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. 121-124
- Lichtenhaler H.K., 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J.Plant Physiol.*, 148:4-14
- Marcus G., Horiuchi J., Silverman N. ve Guarente L., 1996. ADA5/SPT20 links the ADA and SPT genes, which are involved in yeast transcription *Mol. Cell. Biol*. 16: 3197-3205.
- Okamoto J., Szeto W., Lotys-Prass C. ve Jofuku D., 1997. Photo and hormonal control of meristem identity in the Arabidopsis flower mutants apetala2 and apetala1, *Plant Cell*, 9: 37-47.

- Pandey K.G., Grant J. J., Cheong H. G., Kim G. B., Li L., ve Luan S., 2005. ABR1, an APETELA2-Domain Transcription Factor That Functions as a Repressor of ABA Response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 139: 1185-1193
- Qiang L., Nanming Z., Yamuguch-Shinozaki K. ve Shinozaki K., 2000. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Science bulletin*. 15 (11): 970-975
- Rodenhiser D. ve Mann M., 2006. Epigenetics and human disease: *translating basic biology into clinical applications*, 174(3) 341-348.
- Rodriguez-Navarro S., Fischer T., Luo MJ., Antúnez O., Brettschneider S., Lechner J., Perez-Ortin JE., Reed R. ve Hurt E., 2004. Sus 1, a functional component of the SAGA histone acetylase complex and nuclear pore-associated mRNA export machinery. *Cell* 116, 75-86
- Roth S.Y., Denu J.M. ve Allis C.D., 2001. Histone acetyltransferase complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, 70:81–120.
- Sanders S.L., Jennings J., Canutescu A., Link A.J. Weil PA., 2002. Proteomics of the eukaryotic transcription machinery; identificaiton of proteins associated with components of yeast TFIID by multidimensional mass spectrometry. *Mol.Cell. Biol.*, 22: 4723-4278
- Schroeder JI., Kwak JM. ve Allen GJ., 2001. Guars cell abscisic acid signalling and engineering drought hardiness in plants. *Nature*, 410: 327-330
- Serrona R. ve Rodriquez-Navarro A., 2001. Ion homeostasis during salt stres in plants. *Curr Opin Biol.*, 13: 399-404
- Shinozaki K. ve Yamaguchi-Shinozaki K., 1996. Molecular responses to drought and cold stres. *Curr Opin Biotechnol* 7: 161-167
- Shinozaki K. ve Yamaguchi-Shinozaki K., 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*, 115, 327–334.
- Shinozaki K. ve Yamaguchi-Shinozaki K., 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 217–223.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. ve Seki M., 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stres responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 410–417.
- Smirnoff N., 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr Opin Biotechnol* 9: 214-219

- Staswick PE, Yuen GY. ve Lehman CC., 1998. Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.*, 15: 747-754.
- Sterner E.D., Wang X., Bloom H. M., Simon G. M., ve Berger L.S. 2002. The SANT domain of Ada2 Is Required for Normal Acetylation of Histones by the Yeast SAGA Complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (10): 8178-8186
- Theologis A., Ecker J.R., Palm C.J., Federspiel N.A. ve Kaul S., 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 14: 796-815.
- Thomashow MF., 1994. *Arabidopsis thaliana* as a model for studying mechanisms of plant cold tolerance. In E Meyrowitz, C Somerville, eds, *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Thomashow M.F., Gilmour S.J., Stockinger E.J., Jaglo-Ottosen K.R., Zarka, D. G. 2001. Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol. Plant.* 112:171-175.
- Tiryaki İ., 2007. The role of auxin –signaling gene *axr1* in salt stress and jasmonic acid inducible gene expression in *Arabidopsis thaliana*, 6 (2): 189-195.
- Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Urao S. ve Shinozaki K., 1993. An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *The Plant Cell*, 5: 1529-1539.
- Vinson C.R., Sigler P.B. ve MacKnight S.L., 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins, *Science*, 246: 911-916.
- Vlachonasis E. K., Thomashow F. M., ve Trizenberg J. S. 2003. Disruption mutations of ADA2b and GCN5 Transcriptional Adaptor Genes Dramatically Affect *Arabidopsis* Growth, Development, and Gene Expression. *The Plant Cell*, 15: 626-638
- Vlachonasis K., Kaldis A. ve Tsementzi D., 2008. Molecular Characterization of SAGA Factor 29 (SGF29) Mutations in *Arabidopsis*. 19th international conference on *Arabidopsis research*. ICAR 2008. Montreal, Canada.
- Wang N., Zhang N., Dowell F.E. ve Peterson, D.E., 2001. Design of an optical weed sensor using plant spectral characteristics. *Transactions of the ASAE* 44 (2): 409-419.
- Wang W.X., 2003. Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance, *Planta*, 218, 1-14.

Wu J.P., Ruhlmann C. ve Schultz P., 2004. Molecular Architecture of the *S. cerevisiae* SAGA kompleks. *Molecular Cell. Biol.* 15: 199-198.

Yamaguchi-Shinozaki K. ve Shinozaki K., 1994. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. *Plant Cell.*, 6, 251–264.

Zhu J.K. (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66–71.

Zhu JK., 2008. Epigenome sequencing comes of age. *Cell*, 133: 395-397.

http://tr.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana

<http://pfam.sanger.ac.uk/family/PF07039>)

EKLER

Ek.1. Gamborg B5 ortamının Hazırlanması

Kimyasal	Alınan Miktar
Gamborg B5	3,2 g
Sükroz	10,0 g
ddH ₂ O	900 ml
Phyto agar	8,0 g

Ek 5. Elektroforezde kullanılan 6X yükleme tamponunun hazırlanması

Kimyasal	Alınan miktar	Son derişim	Tamponun son hacmi
Tris baz	12,1 mg	10 mM	
EDTA	223,3 mg	60 mM	
Bromophenol blue (%0,3'lük)	3,0 mg		
Nükleaz free dH ₂ O	4,0 ml		
Gliserol (%60'lık)	6,0 ml		
			10 ml

ÇİZELGELER LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Bitki örneklerinin genotipleri ve tuz solüsyonlarına bırakılma aralıkları.....	16
Çizelge 3.2. cDNA reaksiyonu karışım 1 bileşenleri ve konsantrasyonları.....	17
Çizelge 3.3. Karışım 2 (HOT MIX) bileşenleri ve konsantrasyonları.....	18
Çizelge 3.4. PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	19
Çizelge 3.5. PCR’da kullanılan primerlerin baz dizilişleri.....	19
Çizelge 4.1. Total RNA konsantrasyonları.....	23
Çizelge 4.2. Final Hacime’ e göre RT-PCR’da kullanılmış H ₂ O miktarları.....	24
Çizelge 4.3. RT-PCR’da primer olarak kullanılmış gen adları ve tanımları.....	25
Çizelge 4.4. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen <i>Ws</i> , <i>sgf29a</i> , <i>ada2b-1</i> , <i>sgf29a;ada2b-1</i> mutant bitkilerinin 1.günün sonunda elde edilen kök uzunlukları.....	37
Çizelge 4.5. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen <i>Ws</i> , <i>sgf29a</i> , <i>ada2b-1</i> , <i>sgf29a;ada2b-1</i> mutant bitkilerinin 2. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları.....	38
Çizelge 4.6. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen <i>Ws</i> , <i>sgf29a</i> , <i>ada2b-1</i> , <i>sgf29a;ada2b-1</i> mutant bitkilerinin 3. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları.....	39
Çizelge 4.7. Farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişen <i>Ws</i> , <i>sgf29a</i> , <i>ada2b-1</i> , <i>sgf29a;ada2b-1</i> mutant bitkilerinin 4. günün sonunda elde edilen kök uzunlukları.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Gen ifadesi ve su stres sinyali arasındaki ilişkinin sinyal iletim yolu	3
Şekil 3.1. Bitki büyüme odasına bırakılan petriler.....	15
Şekil 4.1. Döngü sayısı 32 olan <i>REF2</i> geni PCR sonucu.....	26
Şekil 4.2. Döngü sayısı 28 olan <i>RD29B</i> geni PCR sonucu	26
Şekil 4.3. Döngü sayısı 28 olan <i>RD22</i> geni PCR sonucu.....	27
Şekil 4.4. Döngü sayısı 30 olan <i>COR15A</i> geni PCR sonucu	28
Şekil 4.5. Döngü sayısı 25 olan <i>COR47</i> geni PCR sonucu	29
Şekil 4.6. Döngü sayısı 28 olan <i>COR78</i> geni PCR sonucu	30
Şekil 4.7. Döngü sayısı 30 olan <i>COR6.6</i> geni PCR sonucu.....	30
Şekil 4.8. Döngü sayısı 30 olan <i>XERICO</i> geni PCR sonucu.....	31
Şekil 4.9. Döngü sayısı 30 olan <i>RAB18</i> geni PCR sonucu	32
Şekil 4.10. Döngü sayısı 29 olan <i>GOLS3</i> geni PCR sonucu.....	32
Şekil 4.11. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabancı tip ve <i>sgf29a</i> mutant bitkilerinde kök uzama farklılıkları.....	34
Şekil 4.12. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabancı tip ve <i>ada2b-1</i> mutant bitkilerinde kök uzama farklılıkları.....	35
Şekil 4.13. Farklı NaCl konsantrasyonlarında yabancı tip ve <i>sgf29a;ada2b-1</i> mutant bitkilerinde kök uzama farklılıkları.....	36
Şekil 4.14. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 1. günün sonunda tuz stresine yanıtı.....	37
Şekil 4.15. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 2. günün sonunda tuz stresine yanıtı.....	39
Şekil 4.16. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 3. günün sonunda tuz stresine yanıtı.....	39
Şekil 4.17. Transkripsiyonel koaktivatör mutantların 4. günün sonunda tuz stresine yanıtı.....	40

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Öznur TANRIVERDİ

Doğum Yeri: Ardahan

Doğum Tarihi: 11.01.1985

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce (İleri Seviye)

BİLİMSEL FAALİYETLER

Bildiriler- Uluslararası- Ulusal:

Tanrıverdi, Ö., Akı, C., Role of Salt Stress on Gene Expression and Physiological Characterizations of *Sgf29a*, *ada2b* and *sgf29a;ada2b-1* Genes in *Arabidopsis thaliana* (L.) *Heynh.* Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyoteknolojide Gelişmeler ve Yönelimler sempozyumu Poster Sunumu.

İŞ DENEYİMİ

- 01/06/2007- 27.09.2007 Bilecik Devlet Hastanesi, Heyet Raporları bölümü
- 01.07.2005- 02.08.2005 Sakarya Devlet Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarı
- 26.09.2006- 01.05.2007 Final Dergisi Dershanesi, Stajyer biyoloji öğretmeni

İLETİŞİM

by_tnrverd@hotmail.com