



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Arabidopsis thaliana* EPIGENETİK MUTANTLARINDA TUZ
STRESİNİN DNA METİLASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Yağmur Vecide YEŞİLDİREK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA**

Ocak, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 20.01.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakóltesi

Doç. Dr. Cenk KIĞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakóltesi

Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakóltesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36576 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Tezden üretilmiş herhangi bir yayın yoktur.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenim hayatım ve tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, en stresli dönemlerde bile hiçbir sıkıntıya ve problemime kayıtsız kalmayıp manevi desteğini ve anlayışını asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile ufkumu açan, bana olan inancını ve güvenini her zaman hissettiğim, çok büyük sevgi ve saygı duyduğum danışman hocam Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim hayatım ve tez çalışmam boyunca bana her zaman yardımcı olan, hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan ve değerli öneriler veren Arş. Gör. Burcu ARIKAN'a teşekkür ederim.

Değerli tecrübelerini benimle paylaşan, her zaman desteğini hissettiğim ve çalışmalarım için her türlü imkânı sağlayan başta Bölüm Başkanı Prof. Dr. Ercan ARICAN olmak üzere tüm İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca hiçbir yardım çağrımı cevapsız bırakmayan ve bu zorlu pandemi sürecinde bile neşeli ve uyumlu bir çalışma ortamı yaratan değerli meslektaşlarım Tuğçe CELAYİR ve Oğuzhan YENİ başta olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak bütün eğitim hayatım boyunca hep arkamda olan, bana her türlü desteği ve imkânı sağlayan, tezimi benimle defalarca okuyan annem CANAN ŞENGÜLER ve her anımda yanımda olan, tüm nazımı ve sıkıntımı çeken R. Öykü CANAY'a çok teşekkür ederim.

Ocak 2021

Yağmur Vecide YEŞİLDİREK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xi
ÖZET	xiv
SUMMARY	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. MODEL ORGANİZMA	4
2.1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
2.1.1.1. <i>Mutant Bitkiler</i>	7
2.2. BİTKİLERDE STRES	10
2.2.1. Abiyotik Stres.....	12
2.2.2.1. <i>Tuzluluk Stresi</i>	13
2.3. EPİGENETİK	17
2.3.1. Bitkilerde Metilasyon	20
2.3.2. Metilasyon Belirleme Yöntemleri	22
2.4. GEN ANLATIM ANALİZLERİ	24
2.4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	29
3.1. BİTKİ MATERYALİ.....	29
3.2. BESİYERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI.....	29
3.3. TOHURLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU	30
3.4. MUTANTLARIN TANIMLANMASI	30
3.5. NaCl UYGULAMASI	31
3.6. MORFOLOJİK ANALİZLER	32
3.6.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyunun Belirlenmesi.....	32
3.7. GENOM DÜZEYİNDE DNA METİLASYONU	32
3.7.1. DNA İzolasyonu Deney Protokolü.....	32

3.7.2. DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi	33
3.7.3. Genom Düzeyinde DNA Metilasyonu Belirlenmesi Protokolü	34
3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	36
3.8.1. Gen Anlatımları Analiz Edilen Genler ve Özellikleri	36
3.8.2. RNA İzolasyonu Deney Protokolü	37
3.8.3. RNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi	38
3.8.4. cDNA Sentezi	38
3.8.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	39
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ.....	41
4.2. MUTANTLARIN ANALİZİ	41
4.3. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK ETKİLERİ.....	42
4.3.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyundaki Değişimler.....	42
4.4. GENOM DÜZEYİNDE DNA METİLASYON ANALİZİ	46
4.4.1. DNA İzolasyonu	46
4.4.2. ELISA Yöntemi ile Genom düzeyinde DNA Metilasyonunun Belirlenmesi.....	47
4.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ	49
4.5.1. Toplam RNA Analizi.....	49
4.5.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri.....	50
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ	70

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: <i>Arabidopsis thaliana</i> (https://www.arabidopsis.org).....	5
Şekil 2.2: <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> mutantlarının T-DNA eklenti bölgeleri.	10
Şekil 2.3: Abiyotik ve biyotik stres tipleri (Stoller, 2020).....	11
Şekil 2.4: Abiyotik stres sinyal yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri için model (Khan ve diğ., 2018).	13
Şekil 2.5: Tuzluluk toleransının SOS ve ilgili yollarla düzenlenmesi (Tuteja, 2007).	16
Şekil 2.6: Epigenetik düzenlemelerin genel şeması (Tarhan ve Turgut-Kara, 2016).	17
Şekil 2.7: Sitozine metil grubunun eklenmesi ile 5-metilsitozin bazının oluşması.	19
Şekil 2.8: Bitki metilasyon çeşitleri (Erdmann ve Picard, 2020).	21
Şekil 2.9: ELISA yöntemi çeşitleri (Abnova, 2020).	23
Şekil 2.10: Gerçek Zamanlı PZR fazları ve temel adımları (San Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016).	26
Şekil 2.11: GZ-PZR’de SG-I kullanımı; 1- Denatürasyon fazında SG-I serbest haldedir. 2- Bağlanma Fazında primerler tek zincirli DNA’ya bağlanır. 3- Uzama Fazında çift zincirli DNA oluşmaya başlar ve SG-I çift zincirli DNA’ya bağlanır. 4-Çift zincirli DNA miktarı arttıkça SG-I’in DNA’ya bağlanma oranı artar ve aynı anda daha yüksek floresans gözlenir (Van der Velden ve diğ., 2003).	27
Şekil 3.1: Dolaylı ELISA yöntemi (Bio Rad, 2020).	34
Şekil 4.1: Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin MS besiyerinde 14 günlük kontrol grubu (0 mM NaCl) (Bar: 1cm).	41
Şekil 4.2: <i>met1-3</i> mutantında <i>MET1</i> gen ürünlerinin kontrolü.	41
Şekil 4.3: Yedi gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında strese maruz bırakılan <i>A. thaliana</i> bitkileri. A- Kontrol grubu Col-0 bitkilerini, B- <i>met1-7</i> mutant bitkilerini, C- <i>met1-3</i> mutant bitkilerini temsil etmektedir (Bar: 1cm).	43
Şekil 4.4: <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında yaprak sayısında meydana gelen anlamlı değişimler.	44
Şekil 4.5: <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında yaprak yüzey alanında (cm ²) meydana gelen anlamlı değişimler.	45

Şekil 4.6: <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında kök uzunluğunda (cm) meydana gelen anlamlı değişimler. A- Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> gruplarının kendi aralarında meydana gelen; B- <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> mutantları ile Col-0 arasında meydana gelen; C- <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> mutantları arasında meydana gelen anlamlı değişimleri göstermektedir.	45
Şekil 4.7: 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>A. thaliana</i> bitkilerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	47
Şekil 4.8: Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin NaCl uygulamasına göre DNA metilasyonu değişiminin % olarak gösterilmesi.	48
Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan 5-mC standartlarının kalibrasyon eğrisi.	48
Şekil 4.10: 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>A. thaliana</i> bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.	49
Şekil 4.11: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin <i>DRM2</i> gen anlatımının <i>Aktin</i> 'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.	50
Şekil 4.12: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin <i>Pol IV</i> gen anlatımının <i>Aktin</i> 'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.	50
Şekil 4.13: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> bitkilerinin <i>Pol V</i> gen anlatımının <i>Aktin</i> 'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.	51

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: <i>Arabidopsis thaliana</i> genlerinin işlevleri (Reece ve diğ., 2013).....	6
Tablo 2.2: Mutasyon tipleri (Klug ve diğ., 2011b).....	8
Tablo 3.1: Kullanılan bitki materyali.....	29
Tablo 3.2: MS besiyeri hazırlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları (250ml).....	30
Tablo 3.3: <i>met1-3</i> mutantı T-DNA bölgesi için RT-PZR primerleri.....	30
Tablo 3.4: RT-PZR koşulları.....	31
Tablo 3.5: Stres besiyerlerinde kullanılan bileşenler ve miktarları (250 ml).	31
Tablo 3.6: “GeneJET Plant Genomic DNA Purification” kit içeriği ve saklama koşulları.....	32
Tablo 3.7: “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit (P-1034-96, Epigentek) içeriği ve saklama koşulları.	35
Tablo 3.8: “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit (P-1034-96, Epigentek) kit pozitif kontrol konsantrasyonları.....	35
Tablo 3.9: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan genler ve özellikleri.....	37
Tablo 3.10: Gen anlatımı analizlerinde kullanılan primer dizileri.	37
Tablo 3.11: cDNA Sentez reaksiyonunun bileşenleri.....	38
Tablo 3.12: cDNA sentez reaksiyonunun koşulları.....	39
Tablo 3.13: GZ-PZR reaksiyonunun bileşenleri.....	39
Tablo 3.14: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.....	39
Tablo 4.1: Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>A. thaliana</i> Col-0 bitkisi üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.	46
Tablo 4.2: Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>A. thaliana met1-7</i> mutantı üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.	46

Tablo 4.3: Farklı NaCl konsantrasyonlarının <i>A. thaliana met1-3</i> mutanıtı üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değır 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.	46
Tablo 4.4: Farklı NaCl konsantrasyonlarının Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3 Arabidopsis thaliana</i> bitkileri üzerindeki DNA metilasyonu değışiminin yüzde (%) olarak gösterilmesi. Her bir değır 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.	49
Tablo 4.5: Col-0, <i>met1-7</i> ve <i>met1-3 A. thaliana</i> bitkilerinde NaCl uygulaması sonrasında <i>DRM2</i> , <i>Pol IV</i> ve <i>Pol V</i> gen anlatımlarındaki değışimlerin <i>Aktin</i> genine göre rölâtif katsayıları.....	51

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
Ca	: Kalsiyum
Cl	: Klor
C ₂ H ₄ O ₂	: Asetik Asit
C ₃₂ H ₃₇ N ₄ S	: SYBR Green I
cm	: Santimetre
g	: Gram
HCO ₃	: Bikarbonat
K	: Potasyum
L	: Litre
Mb	: Megabaz
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
mM	: Milimolar
ml	: Mililitre
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
SO ₄	: Sülfat
U	: Ünite
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
5-mC	: 5 metilsitozin
BS-Seq	: DNA bisülfite dizileme, “DNA bisulfite sequencing”
CAX1	: Vakuolar katyon / proton değıştirici 1
CBL	: Kalsinörin-B benzeri proteinler, “calcineurin-B-like protein”
CDPK	: Kalsiyuma bağımlı protein kinazlar, “calcium-dependent protein kinases”
CIPK	: CBL ile etkileşen protein kinaz, “CBL-interacting protein kinase”
CMT3	: Kromometilaz 3
CNGC	: Siklik Nükleotid Kapılı Kanal, “cyclic nucleotide-gated channel”
COLD1	: Soğutma-Tolerans Uyuşmazlığı 1, “Chilling-Tolerance Divergence 1”
Ct	: Eşik Değer, “Cycle Threshold”
DAG	: Diasilgliserol
DCL3	: “DICER-LIKE3”
DD	: “Differential Display”
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
Dnmt1	: DNA (sitozin-5-) metiltransferaz 1
DNMT3	: DNA metiltransferaz 3
dNTP	: Deoksinükleotid
DRM	: “Domains Rearranged Methylase”
dsRNA	: Çift zinirli RNA, “double-stranded RNA”
EtBr	: Etidyum Bromür
EtOH	: Etil Alkol
g	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
GLR	: Glutamat Reseptörü Benzeri, “glutamate receptor-like”
GPCR	: G-protein bağı reseptörler, “G-protein-coupled receptor”
HKT1	: “Histidin Kinaz Transporter 1”
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi, “High Pressured Liquid Chromatography”
IP3	: İnositol trifosfat
LC	: Sıvı Kromatografisi, “Liquid Chromatography”
MAPK	: Mitojenle aktiveştirilen protein kinaz, “mitogen-activated protein kinase”
MET1	: Metiltransferaz1
MS	: Murashige ve Skoog
MSL	: MscS benzeri proteinler, “MscS-like protein”

ncRNA	: Kodlanmayan RNA
OSCA1	: Azaltılmış Hiperosmolaliteye Bağlı Kalsiyum Artışı 1, “Reduced hyperosmality-induced calcium increase 1”
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIP2	: Fosfatidilinositol bifosfatı
PK	: Protein kinaz, “protein kinase”
PLC	: Fosfolipaz C
Pol IV	: RNA Polimeraz IV
Pol V	: RNA Polimeraz V
PP	: Protein fosfataz, “protein phosphatase”
PP2C	: Protein fosfataz 2C, “protein phosphatase 2C”
RdDM	: RNA-aracılı DNA Metilasyonu
RDR2	: RNA-Bağımlı RNA Polimeraz 2, “RNA-Dependent RNA Polymerase 2”
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri, “Reactive oxygen species”
RP-HPLC	: Ters Fazlı Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, “reversed-phase high performance liquid chromatography”
RT-PZR	: “Reverse transkriptase PCR”
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı, “Rotation per minute”
SAGE	: “Serial analysis of gene expression”
SAMe	: S-Adenosil metiyonin, “S-Adenosyl methionine”
siRNA	: “Small interfering RNA”
ssRNA	: Tek zincirli RNA, “single-stranded RNAs”
SOS	: Tuz Katmanına Duyarlı, “Salt Overlay Sensitive”
TAE	: Tris-asetat EDTA
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi, “thin-layer chromatography”
TE	: Tris-EDTA
TE	: Transpozabl Elementler
TF	: Transkripsiyon Faktörü
UV	: Ultra Viyole
yy	: Yüzyıl

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Arabidopsis thaliana* EPIGENETİK MUTANTLARINDA TUZ STRESİNİN DNA METİLASYONU ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Yağmur Vecide YEŞİLDİREK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Dünya nüfusunun giderek artması gıda ihtiyacını da arttırmaktadır. Ancak tarım alanlarının tahrip edilmesi ve iklimsel dalgalanmalar gibi nedenler bitkileri çeşitli biyotik ve abiyotik stres koşullarına maruz bırakır. Bu durum mahsul verimliliğini düşürmekte ve açlık tehdidinin artmasına sebep olmaktadır. Bitkilerin değişen çevre koşullarını tolere etmek için epigenetik düzenlemeler de dahil olmak üzere çeşitli moleküler mekanizmalar geliştirdiği bilinmektedir. Bitkilerin strese karşı dayanıklı hale getirilmesi ve bu dayanıklılığı nesiller boyu sürdürebilmelerini sağlamak için öncelikle moleküler mekanizmaların iyi anlaşılması gerekmektedir.

Mahsul verimliliğini düşüren en büyük tehditlerden biri tuzluluk stresidir. NaCl uygulamasının *Arabidopsis thaliana* Col-0 bitkilerinde hipometilasyona neden olduğu ve DNA metilasyonu açısından tüm bitki ve kallus dokuları arasında dikkate değer farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu tez çalışmasında, *A. thaliana* bitkisinin MET1 enziminin sentezlenmediği *null* mutantları olan *met1-7* ve *met1-3* *in vitro* koşullarda tuz stresine maruz bırakılmış ardından morfolojik değişimleri gözlenmiş ve genom düzeyinde metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda mutantlara uygulanan tuz stresinin etkileri, bitkilerde DNA metilasyonunda görev aldıkları bilinen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımlarının analizi ile test edilmiştir. Gen anlatım analizleri gerçek zamanlı PZR yöntemi ile yapılmış, bu yolla NaCl uygulamasının sebep olduğu hipometilasyonun *MET1* geni ile ilişkisi

anlaşılmaya çalışılmıştır. *MET1* geninin homozigot mutantları ile elde edilen sonuçlar önceki veriler ile karşılaştırılarak bitkinin tuzluluk stresine verdiği cevapta metilasyonun rolü hakkında bilgi elde edilebilecektir.

NaCl uygulamasının Col-0 bitkisine göre *met1-7* ve *met1-3* mutantlarını morfolojik olarak daha çok etkilediği görülmüştür. Bitkilerin yaprak sayısına, yaprak yüzey alanına ve kök uzunluklarına bakılarak tüm parametrelerde artan NaCl konsantrasyonunun negatif etkili olduğu belirlenmiştir. Bitkilerdeki morfolojik değişimlerin DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, histon varyantları ve siRNA'lar aracılığı ile düzenleme gibi pek çok epigenetik düzenlemelere de bağlı olduğu bilinmektedir. Bu sebeple, bu çalışmada tuz stresine maruz bırakılan Col-0, *met1-7* ve *met1-3* bitkilerinin genom düzeyindeki metilasyon seviyeleri ELISA tabanlı bir kit ile ölçülmüştür ve tuz stresinin mutantlarda daha yüksek oranda olmak üzere tüm gruplarda hipometilasyona sebep olduğu görülmüştür. NaCl uygulamasının epigenetik düzenlemelerde görev aldığı bilinen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinde yarattığı etki de gerçek zamanlı PZR yapılarak analiz edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, incelenen genlerin anlatımlarının mutant bitkilerde farklı oranlarda arttığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması ile NaCl uygulamasının *MET1* enziminin sentezlenmediği mutantlar üzerindeki etkileri hakkında elde edilen morfolojik ve moleküler verilerin stres mekanizmalarının epigenetik temelini anlamamıza yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Ocak 2021, 87 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, NaCl, gen anlatımı, epigenetik, metilasyon.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF SALT STRESS ON DNA METHYLATION IN *Arabidopsis thaliana* EPIGENETIC MUTANTS

Yağmur Vecide YEŞİLDİREK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

The gradual increase in the world population increases the need for food. However, reasons such as the destruction of agricultural lands and climatic fluctuations expose crops to various biotic and abiotic stress conditions. This situation reduces crop productivity and causes an increase in the hunger threat. It is known that plants develop various molecular mechanisms, including epigenetic arrangements, to tolerate changing environmental conditions. In order to make plants resistant to stress and sustain this resistance for generations, firstly molecular mechanisms must be understood well.

One of the biggest threats to crop yields is salinity stress. It is known that NaCl application causes hypomethylation in *Arabidopsis thaliana* Col-0 plants and there are considerable differences between plants and callus tissues in terms of DNA methylation. In this thesis study, the *null* mutants *met1-7* and *met1-3*, in which the MET1 enzyme of *A. thaliana* plant was not synthesized, were exposed to salt stress in vitro, morphological changes were observed and methylation levels at the genome level were compared. At the same time, the effects of salt stress applied to mutants were tested by analysis of the expressions of *DRM2*, *Pol IV* and *Pol V* genes known to be involved play in DNA methylation in plants. Gene expression analyzes were made by real-time PCR method, and the relationship between the hypomethylation caused by NaCl application and the *MET1* gene was tried to be understood. By comparing the results

obtained with homozygous mutants of the *MET1* gene with previous data, information about the role of methylation in the plant's response to salinity stress can be obtained.

It was observed that NaCl application affected the *met1-7* and *met1-3* mutants morphologically more than the Col-0 plant. By looking at the number of leaves, leaf surface area and root length of the plants, it was determined that the increasing NaCl concentration has negative effect in all parameters. It is known that morphological changes in plants are also connected to many epigenetic regulations such as DNA methylation, histone modifications, histone variants, and regulation via siRNAs. Therefore, in this study, genome-level methylation levels of Col-0, *met1-7* and *met1-3* plants exposed to salt stress were measured with an ELISA-based kit, and salt stress was found to cause hypomethylation in all groups, with a higher rate in mutants. The effect of NaCl application on *DRM2*, *Pol IV* and *Pol V* genes, which are known to be involved in epigenetic regulations, was also analyzed by real-time PCR. As a result of the studies, it was determined that the expressions of the examined genes increased at different rates in mutant plants.

In conclusion, with this thesis, it is thought that the morphological and molecular data obtained about the effects of NaCl application on mutants where MET1 enzyme is not synthesized will help us to understand the epigenetic basis of stress mechanisms.

January 2021, 87 pages.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, NaCl, gene expression, epigenetic, methylation.

1. GİRİŞ

Ekosistemin dengesi için vazgeçilmez bir unsur olan bitkiler, iklimsel dalgalanmalar, kuraklık, sel gibi olumsuz koşullardan doğrudan etkilenerek, çevreleri ile olan ilişkilerini buna göre düzenlerler (Abdulkhair ve Alghuthaymi, 2016; Peck ve Mittler, 2020). Önümüzdeki 50 yıl içerisinde dünya nüfusunun 10 milyara ulaşabileceği ve dünyadaki tüm ekilebilir arazilerin %50'sinden fazlasının toprak tuzlanmasından olumsuz yönde etkileneceği öngörülmektedir (Ngara ve Ndimba, 2014; UN DESA, 2019).

Popülasyondaki artışa paralel olarak, ihtiyaç duyulan gıda miktarının karşılanabilmesi ve tarım faaliyetlerinin sürdürülebilir olması için tarım bitkilerinin maruz kaldıkları stres koşullarına karşı direnç kazanması gerekmektedir ki bu da bitkilerin abiyotik ve biyotik streslerle etkileşiminin altında yatan temel mekanizmalarını anlamamıza bağlıdır (Peck ve Mittler, 2020). Bitkilerin en fazla karşılaştığı abiyotik streslerden biri tuzluluktur. Tuzluluk stresi altında bitkiler; yaprak boyutunda azalma, kök uzamasını ve büyümesini azaltma, su kullanım verimliliğini arttırma, gaz değişiminin kontrolü gibi morfolojik değişiklikler ile tuzluluğun bitki büyümesi ve üremesi üzerindeki diğer olumsuz etkilerini azaltmak için uyarlanabilir moleküler mekanizmalar kullanır (Abobatta, 2020).

Genom boyutlarının küçük olmasından dolayı manipüle edilmesi kolay, çok sayıda döl veren ve kısa süreli yaşam döngüsüne sahip model organizmalar bilimsel çalışmaların temelini oluşturmaktadır. En sık kullanılan model organizmalara; insan hastalıkları ile çalışmak için *Mus musculus* ve *Drosophila melanogaster*, bitkiler ile çalışmak için ise *Zea mays*, *Nicotiana tabacum* ve bu çalışma için seçilen *Araidopsis thaliana* örnek verilebilir. Model bitki olan *Arabidopsis*'in moleküler biyolojisini inceleyerek, bitkiler hakkında kapsamlı bilgi edinilebilir ve deney ortamında elde ettiğimiz bilgiler ile araştırmalarda karşılaştırmalı olarak ilerlenebilir (The National Science Foundation, 2002).

DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, bazı kodlanmayan RNAlar (ncRNA) ve TE'ler kromatin yapısını ve dolayısıyla genetik bilginin erişilebilirliğini etkiler. Nükleotid dizilerini bozmadan genlerin anlatımını değiştiren bu tür modifikasyonlar epigenetik değişikliklerdir. Bu şekildeki düzenlemeler, DNA dizisinde değişiklik olmadığından potansiyel olarak geri dönüşümlü kromatin değişikliği olarak da tanımlanabilir (Molinier ve diğ., 2006; Zhang ve diğ.,

2018; Sudan ve diğ., 2018). Bitkilerdeki DNA metilasyon paternleri, transkripsiyon, onarım ve rekombinasyon dahil olmak üzere bitki gelişimi, genom yapısı ve evrimi ile ilgili sayısız moleküler mekanizmayı etkiler. Bitkilerde DNA metilasyonunu gerçekleştiren; MET1 (Metiltransferaz 1), CMT3 (Kromoteilaz 3) ve DRM (“Domains Rearranged Methylase”) olmak üzere üç ana DNA metiltransferaz ailesi bulunur. Bunun haricinde bitkiler, spesifik olarak RNA'ya bağımlı DNA metilasyonu (RdDM) adı verilen benzersiz bir *de novo* DNA metilasyon yolu geliştirmiştir. Bu RNA aracılığı DNA metilasyonunda bitkilere özgü RNA Polimeraz IV (Pol IV) ve RNA Polimeraz V (Pol V) enzimleri görevlidir (Quadrana ve Colot, 2016; Brocklehurst ve diğ., 2018). Epigenetik değişiklikler mitotik hücre bölünmeleri sırasında miras alınır ve bazı durumlarda bir sonraki jenerasyona aktarılabilir. Bu sayede bitkilerdeki stres hafızaları için olası bir mekanizma sunarlar (Kinoshita ve Seki, 2014; Alonso ve diğ., 2019). Bitki sistemleri epigenetik kalıtımın araştırılması için elverişli modellerdir. Bitkiler kullanılarak bu alanda yapılan önemli keşiflerin örnekleri arasında transpozonlar, paramutasyon, siRNA'lar ve RNA'ya yönelik DNA metilasyonu sayılabilir (Henderson ve Jacobsen, 2007). Bitki genlerinin promotörlerindeki DNA metilasyonu bazen transkripsiyonel baskıya yol açar ve metiltransferaz mutantlarında DNA metilasyonunun kaybı, gen anlatımının değişmesi ve ciddi gelişimsel kusurlarla sonuçlanır (Ji ve diğ., 2018).

Günümüzde DNA metilasyonu analizleri genom düzeyinde veya tek gen düzeyinde yapılabilir. Spesifik gen lokuslarının metilasyon modellerini sorgulayan gen spesifik yöntemler, tipik olarak metilasyona duyarlı restriksiyon enzimlerinin, sodyum bisülfid modifikasyonunun veya her ikisinin birlikte kullanımına dayanır. Genom düzeyinde DNA metilasyonu genom çapındaki değişiklikler, gen spesifik metilasyon modelleri ve genom stabilitesi arasındaki ilişkiyi anlamak için çok önemlidir. Genom düzeyinde DNA metilasyonunun belirlenmesi için HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), Gaz Kromatografisi ve ELISA tabanlı sistemler kullanılabilir (Song ve diğ., 2005). Bu tez çalışmasında genom düzeyinde DNA metilasyon tayini için kromatografik yöntemlere kıyasla daha hızlı sonuç veren ELISA tabanlı yöntem tercih edilmiştir.

Gen anlatım analizi için “Northern” melezleme, Gerçek Zamanlı PZR, RNA Dizileme gibi yöntemler kullanılır. PZR, az miktarlarda nükleik asidin saptanması için en güçlü tekniktir. Gerçek zamanlı PZR, gerçekleşirken PZR işlemi boyunca ortaya çıkan floresan ışımlar sayesinde veri toplanabilir. Böylece amplifikasyon işlem sırasında anlık olarak takip edilebilir

(Ding ve Cantor, 2004; Wong ve Medrano, 2005; Fraga ve diğ., 2008; Schmittgen ve Livak, 2008).

Bu tez çalışmasında öncelikle CG dizilerinin metillenmesinden sorumlu olduğu bilinen MET1 enziminin sentezlenmediği *null* mutantlar olan *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerine NaCl uygulaması yapılarak morfolojik değişimleri incelenmiştir. Bunun için bir haftalık yabani tip, *met1-7* ve *met1-3* Arabidopsis bitkilerine sonraki 7 gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl uygulanmıştır. NaCl uygulamasının bitkilerde genom düzeyinde DNA metilasyonu üzerine etkisi 5-metilsitozin içeriği analiz edilerek belirlenmiştir. Yine bu bitkilerde RdDM metilasyon mekanizmalarında rol oynadıkları bilinen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımları gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir. Deneylerde kontrol grubu olarak yabani tip *A. thaliana* Col-0 kullanılmıştır. Laboratuvarımızda daha önce yapılan çalışmalarda NaCl uygulamasının bitkilerde hipometilasyona sebep olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bütün sonuçlar birbiri ile karşılaştırılarak *MET1* geninin NaCl stresine karşılık gerçekleşen hipometilasyon ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir.

Bitkiler doğal yaşam döngülerinde çeşitli stres faktörleriyle karşılaştıklarından genetik potansiyellerine ulaşamaz ve bu durum mahsul verimliliğinin düşmesi ile sonuçlanır. Olumsuz koşullara karşı bitkileri daha dayanıklı hale getirmek, için strese karşı verdikleri moleküler cevapların iyi anlaşılması gerekir. Bu amaçla ilgili tüm çalışmalar da göz önünde bulundurulduğunda, DNA metilasyon örüntülerinin ayrıntılarının anlaşılmasının, bitki stres toleransının mühendisliğine önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. MODEL ORGANİZMA

Model organizmalar, genleri ve biyolojik işlevleri kontrol eden süreçleri deneysel olarak incelemek için kullanılmaktadır (Klug ve diğ., 2011a). Bu organizmalar biyoçeşitliliğin sadece küçük bir kısmını temsil etse de model organizmalar ile yapılan araştırmalar biyolojik bilginin temelini oluşturmaktadır (Hedges, 2002). Tarım ve sanayi alanlarındaki gelişmeler de model organizmalar üzerinde yapılan çalışmalara dayanmaktadır. Mahsul üretimini kısa sürede arttırmak ve gereken adımları atmak için model organizmadan yararlanarak; çalışmalarda hızlı bir şekilde ilerlenmeli, mevcut insan ve finansal kaynaklar mümkün olduğunca verimli bir şekilde kullanılmalıdır (The National Science Foundation, 2002).

Biyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılan model organizmalara örnek olarak; bakteri (*Escherichia coli*), bakteriyofajlar, maya (*Saccharomyces cerevisiae*), nematod solucanı (*Caenorhabditis elegans*), meyve sineği (*Drosophila melanogaster*), zebra balığı (*Danio rerio*), kurbağa (*Xenopus laevis*) ve fare (*Mus musculus*) verilebilir (Fields ve Johnston, 2005). Bitkilerde üstünde en çok çalışma yapılan model organizmalar ise; fare kulağı teresi (*Arabidopsis thaliana*), mısır (*Zea mays*), asya pirinci (*Oryza sativa*), tütün (*Nicotiana tabacum*), yonca (*Medicago truncatula*), *Physcomitrella patens*, *Selaginella moellendorffii*, *Lotus japonicus*'dur (Reece ve diğ., 2013).

Geçtiğimiz yıllarda, 'Model Organizma' terimi, küçük boyutları, kolay manipüle edilebilmeleri, kısa üretim süreleri ve çok sayıda döl vermeleri nedeniyle deneysel laboratuvar araştırmalarını kolaylaştıran türler olarak dar bir tanıma sahipti. Ancak, son yirmi yılda, genom dizileme projelerinin sayısındaki artışla birlikte bu tanım değişmiştir. Klasik model organizmaların yanı sıra araştırmacılar, deneysel çalışmalar için fiziksel özellikleri yerine genomlarının benzersiz yönleri nedeniyle farklı organizmalara da odaklandı ve bu tür model organizmalar 'Genomik Modeller' olarak adlandırıldı. Bu bağlamda, ekonomik ve tarımsal açıdan önemli türlerden olan pirinç ve insan sağlığı ile ilgili olan sıtma paraziti *Plasmodium* üzerinde yapılan çalışmalar model organizma tanımını genişleten organizmalara örnek verilebilir (Hedges, 2002).

2.1.1. *Arabidopsis thaliana*

16.yy'da botanikçi Johannes Thal tarafından Harz dağlarında (Almanya) keşfedilen *Arabidopsis thaliana* ilk olarak *Pilosella siliquosa* olarak isimlendirilmiştir (Şekil 2.1) (Wixon, 2001).



Şekil 2.1: *Arabidopsis thaliana*
(<https://www.arabidopsis.org>).

Arabidopsis thaliana, Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da geniş bir dağılıma sahip hardal ailesinin (*Cruciferae* veya *Brassicaceae*) üyesi küçük dikotil bir bitkidir (Meinke ve diğ., 1998). Turp, lahanası, brokoli ve kanola gibi ekonomik açıdan önemli bitkiler ile yakından ilişkili olsa da *Arabidopsis* ekonomik açıdan önemli bir bitki değildir (The National Science Foundation, 2002).

Genetik model organizma olarak *Arabidopsis*'in kullanımı, 1943 yılında Laibach'ın, bu bitkinin küçük genom boyutu, az sayıda kromozoma sahip olması, kısa yaşam döngüsü (5-6 hafta), kontrollü koşullarda hızlı büyüme yeteneği, kendi kendine ve çapraz döllenme kolaylığı, fazla sayıda tohum vermesi, mutagenез kolaylığı gibi avantajlarının olduğunu ortaya koymasıyla başlamıştır (Bowman, 1994; Meinke ve diğ., 1998).

A. thaliana'nın haploid kromozom sayısı beştir ve ~135Mb boyutundaki genomu ~27.000 gen barındırır. *Agrobacterium tumefaciens* ile transfer DNA (T-DNA) aracılığı ile gen aktarımına elverişlidir (EnsemblPlants, 2020). Az sayıda kromozoma sahip olduğundan Arabidopsis genomu dizilemesi tamamlanmış ilk bitkidir (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Tablo 2.1'de Arabidopsis'in sahip olduğu genlerin sınıflandırılmasına dair bilgiler yer almaktadır.

Tablo 2.1: *Arabidopsis thaliana* genlerinin işlevleri (Reece ve diğ., 2013).

Gen İşlevi	Gen Sayısı	Toplam Yüzde*
İşlevi bilinmiyor	9,967	%36
Protein metabolizması	3,204	%12
Taşıma	2,253	%8
Transkripsiyon	2,039	%7
Strese yanıt	1,811	%7
Gelişme	1,627	%6
Çevre ile ilgili algılama	1,627	%6
Hücre bölünmesi ve organizasyon	1,207	%4
Sinyal iletimi	1,097	%4
Nükleik asit metabolizması	333	%1
Enerji yolları	304	%1
Hücre ile ilgili diğer süreçler	8,959	%33
Metabolizma ile ilgili diğer süreçler	8,476	%31
Biyoloji ile ilgili diğer süreçler	1,592	%6
*Toplam oran %100'den fazladır. Çünkü listedeki genlerden bazıları birden fazla sınıfta yer almaktadır.		

A. thaliana'nın tüm genomunun DNA metilasyon haritasının ilk defa kapsamlı olarak Zhang ve diğ., (2006) tarafından 35 baz çifti çözünürlükte ortaya konmasıyla gen kodlayan bölgelerin metile olabileceği ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar, genomun %20'sinin metillenmiş halde olduğu bulunmuş, aynı zamanda bir dizi metillenmiş transpozon tanımlanmış ve transpozon bakımından zengin heterokromatik bölgelerin yoğun metillenmiş olduğunu gösterilmiştir. Cokus ve diğ. (2008) ise DNA bisülfite dizileme (BS-Seq, "DNA bisulfite modification") yöntemi ile yaptıkları çalışmada Arabidopsis genomu genelinde yaklaşık % 24 CG, % 6,7 CHG ve % 1,7 CHH DNA metilasyon seviyeleri gözlemlemiştir. Bu yöntem sodyum bisülfite ile muamele edilen genomda metillenmemiş sitozinlerin urasillere dönüştürülüp 5-metilsitozinlerin dönüştürülmeden kalması esasına dayanır. Böylece polimeraz

zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyondan sonra, metillenmemiş sitozinler timine dönüşürken metillenmiş sitozinler ise sitozin olarak kalır.

Temsili olarak bir bitki türünün tüm genlerinin tam sekanslanması, tüm yüksek bitkiler hakkında daha fazla bilgi elde edilmesini sağlayacak ve benzer şekilde, bir model türü tarafından üretilen proteinlerin işlevlerinin keşfedilmesi, tüm yüksek bitkilerdeki proteinlerin rolleri hakkında daha fazla bilgi sunacaktır (Bowman, 1994). Bu açıdan Arabidopsis ile yapılan araştırmalar, modern biyolojinin tüm yönleri hakkında değerli bilgiler sağlamıştır. Genlerinin en az yarısı bakteri ve insanlarda bulunanlara benzerdir ve sıkıştırılmış genomu nedeniyle bitki fizyolojisi ve biyokimyasında uzun süredir süregelen sorular önce Arabidopsis mutantlarının genetik ve moleküler analizi ile çözülmüştür (Meinke ve diğ., 1998; Klug ve diğ., 2011c).

2.1.1.1. Mutant Bitkiler

Gen mutasyonları, geni oluşturan DNA dizisinde meydana gelen kalıcı değişiklikler olarak tanımlanabilir. Genomda oluşan mutasyonların sonraki nesle aktarılabilirliği, meydana geldikleri yere göre farklılık gösterebilirken, fenotipteki yansımalarında değişkenlik oluşabilir (Genetics Home Reference, 2020). Mutasyonların yerine, moleküler değişiklik tipine ve fenotipik etkilerine göre çeşitleri Tablo 2.2’de verilmiştir.

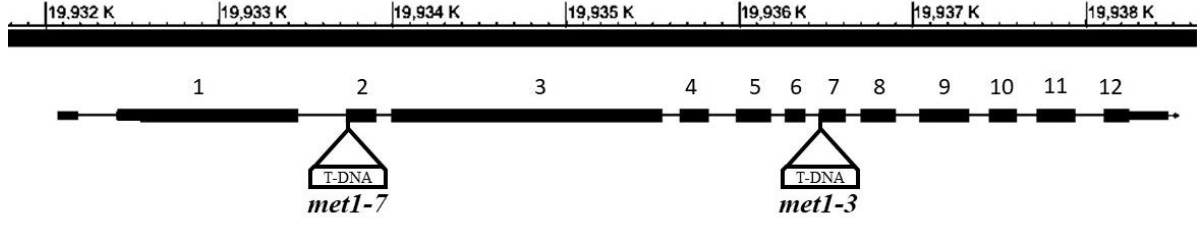
Mutant analizleri Arabidopsis araştırmalarının temelini oluşturur. Başlangıçta ileri genetik taramalar aracılığıyla belirlenen ayırt edici fenotipleri (geç çiçeklenme, şeffaf tohum kabuğu, yaprak trikomlarının yokluğu) olan küçük mutant koleksiyonlarına odaklanılmıştır ve bu mutantların seçilmiş örnekleri daha sonra Arabidopsis'in ilk genetik haritalarını oluşturmak için kullanılmıştır (Meinke, 2020). Oluşturulan bu mutantlara ulaşılacak Arabidopsis koleksiyonlarından bazıları; “Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC)”, “German Plant Genomics Research Program Köln Arabidopsis T-DNA Lines, (GABI-Kat)”, “Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)”, “RIKEN Bioresource Research Center (BRC)” dır.

Tablo 2.2: Mutasyon tipleri (Klug ve diğ., 2011b).

Yerine göre mutasyon tipleri	
Somatik mutasyonlar: Gelecek nesillere aktarılmayan mutasyonlardır.	Otozomal çekinik mutasyonlar: Diploid organizmalarda oluştuğunda tanımlanabilir. Otozomal baskın mutasyonlar: fenotipte gözlenen mutasyon çeşididir.
Soy hattı mutasyonları: Eşey hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlardır.	X'e bağlı mutasyonlar: homogametik dişilerin gametlerinde oluşan X'e bağlı çekinik mutasyonlar etkilenmiş X kromozomunu alan hemizigot erkeklerde ifade edilebilir.
Moleküler değişiklik tipine göre mutasyon tipleri	
Nokta mutasyon	Bir baz çiftinin başka bir baz çiftine dönüşmesidir.
Yanlış anlamlı ("Missense") mutasyon	Amino asit kodonundaki bir nükleotitin değişimi sonucu yeni bir amino asit oluşmasıdır.
Anlamsız ("Nonsense") mutasyon	Kodonun durdurucu kodana dönüşmesi sonucu protein sentezinin sonlanmasıdır.
Sessiz ("Silent") mutasyon	Nokta mutasyonunun amino asit değişikliğine sebep olmamasıdır.
Çerçeve kayması mutasyon	Tek bir bazın kaybedilmesi veya eklenmesiyle tüm kodonun değişmesidir.
Yerleştirme ("Insertion") mutasyon	DNA'ya başka bir dizinin eklenmesi sonucu proteinin düzgün sentezlenememesidir.
Silme ("Deletion") mutasyonu	DNA'dan bir parçanın çıkması sonucu proteinin doğru sentezlenememesidir. Küçük silmeler, bir gen içindeki bir veya birkaç baz çiftini kaldırabilirken, silinen büyük DNA parçaları tüm bir geni veya birkaç komşu geni ortadan kaldırabilir.
Çoğaltma ("Duplication") mutasyonu	Bir veya daha fazla kez anormal şekilde kopyalanan bir DNA parçası anlamına gelir. Bu tür bir mutasyon, ortaya çıkan proteinin işlevini değiştirebilir.
Fenotipik etkilerine göre mutasyon tipleri	
İşlev kaybı ("Knockout") mutasyonları	Gen bölgesinin çıkarılması ile gen ürününün işlevini yok eden mutasyonlardır.
İşlev kaybı (<i>null</i>) mutasyonları	Bir genin RNA'ya kopyalanamaması ve/veya anlamlı bir protein oluşturamaması ile gen işlevinin tamamen ortadan kaldırıldığı mutasyonlardır.
İşlev kazancı mutasyonları	Gen ürününe yeni bir işlev kazandıran mutasyonlardır.
Besinsel veya kimyasal etki gösteren mutasyonlar	Bakteri veya mantarlarda tipik bir besinsel mutasyon bir amino asit veya vitamini sentezlemedeki yetersizliğe sebep olur. İnsanlardaki orak hücreli anemi ise kimyasal etki gösteren mutasyona örnek verilebilir.
Davranış mutasyonları	Organizmanın davranış kalıplarını etkileyen mutasyonlardır.
Düzenleyici mutasyonlar	Düzenleyici bir gendeki mutasyon genin normal işlevini bozabilir ve bir genin süresiz olarak aktif veya inaktif olmasına sebep olabilir.
Koşullu mutasyonlar	Organizmanın yaşadığı çevreye bağımlı olarak ortaya çıkan mutasyonlardır.

Diğer birçok hücresel sinyal yolağı gibi, tuz stresine tolerans tepkilerinin pozitif düzenleme kadar negatif düzenleme altında da olması beklenir. Tuza toleranslı mutantlar, normalde bazı tolerans yanıtlarını baskılayan negatif düzenleyici mekanizmaları ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir. Stres koşulları altında büyüyen bitkilerde DNA metilasyon modellerinin nesiller arası kalıtımı incelenmiştir (Zhu, 2010; Sahu ve diğ., 2013). Bu sebeple azaltılmış apikal hakimiyet, değiştirilmiş yaprak şekli (kırılmış yapraklar) ve değişen çiçeklenme zamanı gibi çeşitli gelişimsel anormalliklere sahip *Arabidopsis* mutantları, metilasyon sistemi kusurlarının araştırılması için uygun modeller haline gelmektedir. *A. thaliana* genomunun 5. kromozomu üzerindeki 19932114-19938470 bazları arasında bulunan ve 12 eksondan oluşan *MET1* (AT5G49160) geni, genom düzeyindeki metilasyonun %80-%90'ından sorumludur (NCBI, 2020; Zangi ve diğ., 2020). *MET1* enzimi büyüme aşamalarında, morfolojik özelliklerin geliştirilmesinde, gametofitlerin oluşumunda ve embriyoların gelişim aşamasında görev almaktadır. *MET1* geninin kaybı, CG metilasyonunun neredeyse tamamen silinmesine yol açar (Saze diğ., 2003). Aynı zamanda DNA demetilasyon aktivitelerinin baskılanmasına, RNA'ya yönelik *de novo* metilasyonun değişmesine ve Lizin 9'da histon H3 dimetilasyon ve Lizin 27'de trimetilasyon gibi diğer baskılayıcı işaretlerin yeniden düzenlenmesine neden olur (Soppe ve diğ., 2002; Tariq ve diğ., 2003; Mathieu ve diğ., 2005; Kong ve diğ., 2018). Diğer yandan Brocklehurst ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada *MET1* genin aşırı anlatımının fenotipte değişiklik yaratmadığını ve epigenetik düzenlemelerde doğrudan etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

MET1 geninin *met1-1*, *met1-3*, *met1-4* ve *met1-7* mutantları başta olmak üzere 10 farklı polimorfizm bulunmaktadır (TAIR, www.arabidopsis.org). Tüm *met1* mutantları gen bölgesi içine T-DNA yerleştirme ("insertion") mutasyonu ile oluşturulmuştur. Bu tez çalışmasında 4284375 polimorfizm numarasına sahip *met1-7* ve 4010745481 polimorfizm numarasına sahip *met1-3* mutantları kullanılmıştır. TAIR'de belirtildiği üzere *met1-7* mutantında T-DNA 2. eksonun başına 19933765 bp noktasından girerek; Saze ve diğ.'nin (2003) belirttiği üzere *met1-3* mutantında ise 7,1 kb'lik T-DNA 7. eksonun başına girerek korunmuş motif bölgeleri bozar. Saze ve diğ. (2003) 180 bp sentromerik tekrarlar da sitozin metilasyonunun bisülfid analizi ile lokusta CpG metilasyonunun homozigot *met1-3* bitkilerinde neredeyse tamamen silindiğini göstermiştir. *met1* mutantlarının korunmuş bölgelerini bozan T-DNA yerleşim bölgeleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

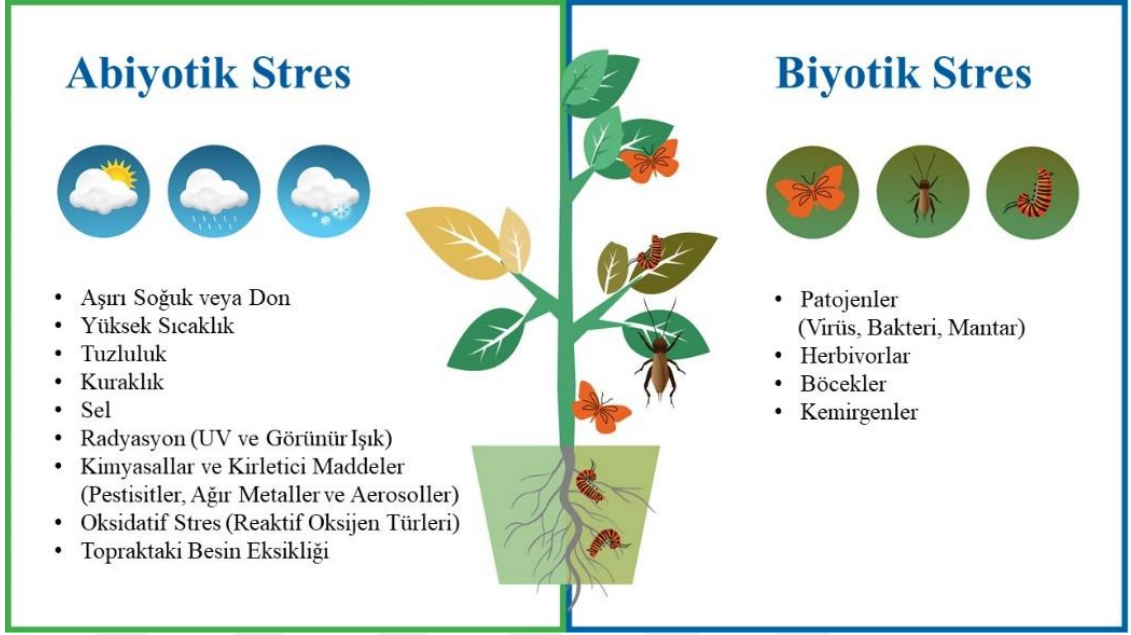


Şekil 2.2: *met1-7* ve *met1-3* mutantlarının T-DNA eklenti bölgeleri.

2.2. BİTKİLERDE STRES

Bitki stresi; bitkinin büyümesini ve üremesini genotip potansiyelinin altına düşüren herhangi bir faktör olarak tanımlanabilir. Bitkilerde abiyotik ve biyotik stres olarak kategorize edilen iki çeşit çevresel stres çeşidi vardır. Biyotik strese, patojenler (bakteri, mantar, virüs ve nematodlar dahil) ve herbivorlar gibi canlı organizmalar sebep olurken abiyotik strese; aşırı sıcaklık, tuzluluk, kuraklık ve radyasyon gibi cansız faktörler sebep olur (Osmond ve diğ., 1987; Atkinson ve Urwin, 2012; Gull ve diğ., 2019). Abiyotik ve biyotik strese sebep olan faktörler Şekil 2.3'te verilmiştir.

Bitkiler doğal yaşam alanlarında tek bir stres çeşidine maruz kalmaz, abiyotik ve biyotik strese birlikte maruz kalır. Örneğin abiyotik strese maruz kalan pirinç (*Oryza sativa*), arpa (*Hordeum vulgare*), makarnalık buğday (*Triticum turgidum* ssp durum) ve ekmek buğdayı (*Triticum aestivum*) gibi tarım bitkileri genellikle kayıpları önemli ölçüde artıran patojenler, böcekler ve yabancı otlar gibi biyotik stres faktörleri ile de mücadele etmek zorundadırlar (Khan ve diğ., 2018; Alonso ve diğ., 2019).



Şekil 2.3: Abiyotik ve biyotik stres tipleri (Stoller, 2020).

Hayvan türlerinin çoğunun aksine, bitkiler hareketsiz organizmalardır ve bu nedenle çevresel faktörlerden daha fazla etkilenirler. Son yıllarda yapılan çalışmalarla; bitkilerin çevresel uyarılarına nasıl algıladığına dair bilgiyi önemli ölçüde artmış; epigenetik mekanizmaların gerçekten stres hafızası ve bitkilerdeki adaptasyon için gerekli olduğunu gösteren kanıtlar bulunmuştur. Bitkilerin geçmiş stres koşullarını hatırlayabildiği ve bu stres koşulları tekrarlandığında mücadele etmek için mitotik hücre bölünmeleriyle miras aldıkları stres hafızalarını kullanabildiği gösterilmiştir (Kinoshita ve Seki, 2014).

2016 yılında küresel sıcaklık 20.yy ortalarından 0,99°C daha fazlaydı (NASA, 2018). 21.yy sonlarında da ortalama küresel yüzey sıcaklığının 20.yy sonlarına göre 1-3,7°C daha fazla olacağı tahmin edilmektedir (IPCC, 2014). Küresel ısınmanın etkisiyle değişen iklim şartları sonucu 2050 yılına kadar, dünyadaki tüm ekilebilir arazilerin %50'sinden fazlasının topraktaki tuz oranı artışından olumsuz yönde etkileneceği ön görülmektedir (Ngara ve Ndimba, 2014). Dünya nüfusunun 2050 yılına kadar 9.7 milyara, 2100 yılına kadar ise 10.9 milyara ulaşması beklenmektedir (UN DESA, 2019). Popülasyonun katlanarak artması, tarım arazilerinin çarpık kentleşme sonucu giderek azalması ve kalan tarım arazilerinde yetişen bitkilerin çeşitli stres koşullarına maruz kalması ihtiyaç duyulan gıda miktarının karşılanabilmesini ve tarım faaliyetlerinin sürdürülebilir olmasını zorlaştırmaktadır. Bu şartlarla mücadele etmek ve

yaşamın devamlılığını sağlamak için tarım bitkilerinin karşı karşıya geldikleri stres koşullarına direnç kazanması gerekmektedir.

Genel olarak, bitkilerde strese karşı verilen yanıtlar; sinyal algısı, sinyal iletimi ve stres yanıtı olarak üç adımda gerçekleşir (Khan ve diğ., 2018). Bu mekanizmaları detaylı biçimde anlamak; değişen çevre faktörlerinin olumsuz etkilerine hazırlıklı olabilmek dolayısıyla bitkilerde verim kaybının önüne geçebilmek için gerekli biyoteknolojik manipülasyonlara hedef belirlemek adına son derece önemlidir.

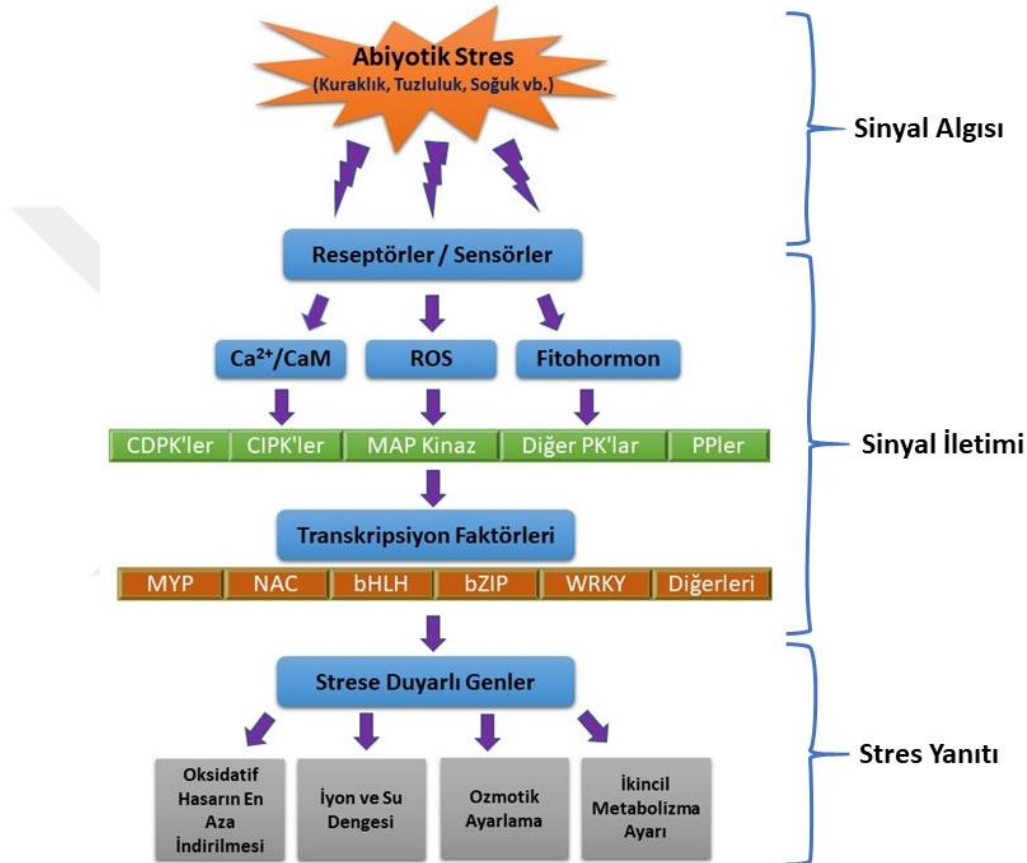
2.2.1. Abiyotik Stres

Bitkilerin büyümesinde ve verimliliğinde azalmaya neden olan çevresel koşullar abiyotik stres olarak tanımlanır. Bu koşullar arasında uygun olmayan sıcaklık, kuraklık, metal toksisitesi veya tuzluluk stresi sayılabilir. İklim değişikliği ile bağlantılı olarak, yüksek sıcaklık, kuraklık ve tuzluluk günümüzde karşılaştığımız en önemli abiyotik stres çeşitleridir.

Herhangi bir abiyotik stres için bir sinyal yolunun aktivasyonundaki ilk adım, stres sinyalinin bitki hücresinin zarında bulunan reseptörler vasıtasıyla tanınmasıdır. Son yıllarda COLD1 (Soğutma-Tolerans Uyuşmazlığı 1), OSCA1 (Azaltılmış Hiperosmolaliteye Bağlı Kalsiyum Artışı1), MSL'ler (MscS Benzeri Proteinler), CNGC'ler (Siklik Nükleotid Kapılı Kanallar), GLR (Glutamat Reseptörü Benzeri) kanalları, histidin kinazlar, kalsiyum kanalları (Ca Akışlarından Sorumlu) ve GPCR'ler (G-protein Bağlı Reseptörler) gibi çeşitli plazma membran proteinlerinin abiyotik stres sinyalleri için varsayılan sensörler oldukları gösterilmiştir (Swarbreck ve diğ., 2013; Yuan ve diğ., 2014; Ma ve diğ., 2015). Sinyalin tanınmasından sonra, bu sensörler Ca^{2+} ve ROS (reaktif oksijen türleri) gibi ikinci haberciler ve fitohormonlar yoluyla sinyalleri iletir. ROS gibi ikinci haberciler, MAPK (mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz) yolu, CDPK'ler (kalsiyuma bağımlı protein kinazlar), CBL'ler (kalsinörin-B benzeri proteinler), CIPK (CBL ile etkileşen protein kinaz) ve diğer birçok protein kinaz'ın yanı sıra bazı PP2C'ler (protein fosfataz 2C'ler) gibi protein fosfatazların da dahil olduğu başka ROS modülasyonlu protein kinazlar (PK'lar) ve protein fosfatazlar (PP'ler) grubunun aktivasyonunu tetikler. Daha sonra, bu PK'lar ve PP'ler bilgiyi aşağı yönde iletir ve özellikle transkripsiyon faktörlerinin de dahil olmak üzere bir dizi fosforilasyon ve defosforilasyon yolunu tetikler (Şekil 2.4). Böylece doğrudan hücresel korumada görev alan fonksiyonel genlerin ifadesi ya da dolaylı olarak sinyal yollarına ve gen ifadesinin

transkripsiyonel regülasyonuna katılan düzenleyici genlerin ifadesi gerçekleşmiş olur (Khan ve diğ., 2018).

Bitkilerin stres koşullarına karşı verdiği yanıtların daha iyi anlaşılması bitkilere dayanıklılık kazandırmak açısından büyük öneme sahiptir. Böylece stres koşullarına daha kolay uyum sağlayabilen ve mahsul verimliliğinde kayıp yaşamayan bitkilerin üretimi sağlanabilir.



Şekil 2.4: Abiyotik stres sinyal yollarını düzenleyen transkripsiyon faktörleri için model (Khan ve diğ., 2018).

2.2.2.1. Tuzluluk Stresi

Tuzluluk, topraktaki çözünmüş tuz miktarının yüksekliği olarak tanımlanır. Topraktaki tuzların yüksek konsantrasyonu, düşük su potansiyeli nedeniyle bitkiler için toprak suyunu erişilemez hale getirir ve bitkiler tuzluluk stresiyle karşılaşır (Sánchez-Romera ve Aroca, 2020). Toprak tuzluluğu düşük yağış, yüksek yüzey buharlaşması, şiddetli rüzgâr ve kayaların ayrışması gibi uzun süreli doğa olaylarının sonucunda yeraltı sularında biriken tuz miktarının artmasıyla

oluşabilirken, aynı zamanda yanlış sulama ve drenaj yapılması gibi toprağın hidrolojik yapısını bozan insan kaynaklı sebepler ile de oluşabilir (Yadav ve diğ., 2011; Shrivastava ve Kumar, 2015; Duan, 2016).

Tuzluluk, tarımsal üretimi etkileyen baskın abiyotik streslerden biridir. Tuzluluğun olumsuz etkileri dünyadaki ekin yetiştiriciliğinin en az %20'sine zarar vererek ekonomik kayba sebep olur. Ancak tüm tuz çeşitleri bitki büyümesini engellemez. Örneğin, Potasyum (K^+) bitki hücrelerinde en bol bulunan katyondur; stomalarının açılıp kapanması, ozmotik dengenin korunması ve birçok enzimin katalitik aktiviteleri için gereklidir. Tuzluluk ile ilişkili en yaygın katyonlar Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} iken, yaygın anyonlar Cl^- , SO_4^{-2} , HCO_3^- 'tür (Tester ve Davenport, 2003; Mahajan ve Tuteja, 2005; Abobatta, 2020). Doğal ortamlarda, tuz stresinin çoğu, özellikle en yaygın tuz olan NaCl'nin sodyum tuzlarından kaynaklanmaktadır. Topraklardaki yüksek NaCl konsantrasyonları, Na^+ , Cl^- , K^+ ve Ca^{+2} 'nın iyonik dengesini bozar (Ngara ve Ndimba, 2014; Liu ve diğ., 2019; Yang ve Guo, 2018a). Seki ve diğ. 2002 yılında yaptıkları çalışmada 7000 *Arabidopsis thaliana* geninin cDNA mikrodizi analizini yapmış ve 194 genin yüksek tuzluluk stresi altında gen anlatımının arttığını göstermişlerdir. Bu durum birçok transkripsiyonel düzenleyici mekanizmanın stres sinyali iletim yollarında işlev gördüğünü düşündürmektedir. Wull ve diğ. (1996) ise bitkilerin tuz stresini algılaması ile ilgili yaptığı çalışmada SOS1, SOS2 ve SOS3 (tuz katmanına duyarlı, "salt overlay sensitive") genlerini tanımlamıştır. SOS3 geni (aynı zamanda AtCBL4 olarak da bilinir), Ca^{+2} bağlayıcı bir protein olan CBL'yi (kalsinörin-B benzeri proteinler) kodlar ve sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliği algılar ve aşağı yönde sinyali iletir.

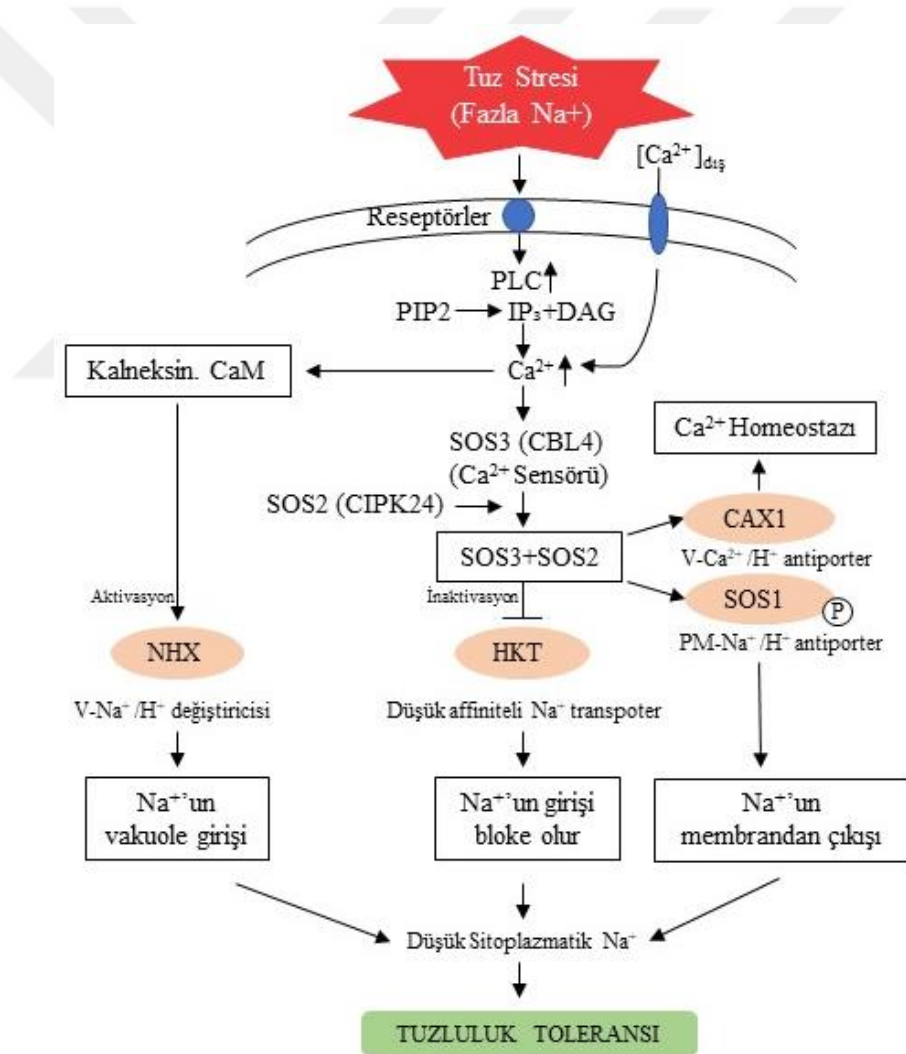
Tuzluluğa verilen doğrudan bitki tepkileri iki ana aşamaya ayrılmıştır. İlk aşama, dakikalar veya günler içinde gerçekleşen bitkinin ozmotik strese girme durumudur. İyon değişiminden bağımsız stomatal kapanmaya ve hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olarak genç yaprakların büyümesini engeller; artan tuz oranı ile bozulan homeostaz membran reseptörleri tarafından algılanıp çeşitli pompaların, iyonların ve Ca^{+2} sensörlerinin koordineli etkileşimiyle korunmaya çalışılır. İkinci aşama ise iyonik strestir; günler hatta haftalar içinde daha yüksek miktarda NaCl akışına bağlı olarak gerçekleşir. Çoğu K^+ taşıma sisteminin Na^+ 'ya karşı da affinitesinin yüksek olması kök çevresinde artan Na^+ 'nın hücre içine girmek için K^+ ile yarışmasına sebep olur ve K^+ 'nın hücreye alınmasını engeller. Bu durum metabolik toksisiteye, erken yaşlanmaya ve son olarak hücre ölümüne neden olan sitotoksik iyon seviyelerinin

oluşmasıyla sonuçlanır (Munns ve Tester, 2008). Tuz stresi, bitki hücrelerinde hızlı ROS (reaktif oksijen türleri) üretimi ile ilişkili olarak fotosentez gibi birçok hücresel süreci de bozar. Önemli ROS sinyal iletim yolları olarak işlev gören MAPK (mitojenle aktive edilen protein kinaz) yolları, ROS homeostasisi, iyonik homeostasis ve bitki büyümesi ve gelişmesini düzenlemede görev alır bu sebeple artan ROS seviyeleri büyüme ve gelişmeyi etkileyen sinyal görevi görür. (Sako ve diğ., 2018; Yang ve Guo, 2018b).

Bitkiler tuz stresi ile başa çıkmak ve hayatta kalmak için farklı uyarlanabilir mekanizmalar geliştirmiştir (Tanveer ve Ahmed, 2020). Karşılaştığı yüksek tuz miktarına bitki; ozmotik stres toleransı, iyonik tolerans ve doku toleransı kademelerinde cevap verir. Toprak tuzluluğundaki ani artış, yaprak hücrelerinin su kaybetmesine neden olur, ancak bu hücre hacmi kaybı ve turgor geçicidir. Suyu korumak için stomatal iletkenlikte hızlı bir düşüş yaşanır. Saatler içinde, hücreler ozmotik ayarlama sayesinde kendi hacimlerini ve şişkinliklerini yeniden kazanır, ancak buna rağmen hücre uzama oranları azalır. Tuzun kök sistemine girmesi durumunda iyonik tolerans oluşturan SOS yolunu aktive eden bir kalsiyum sinyalini başlatır. Sinyal ilk olarak, inositol trisfosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) oluşturmak için fosfatidilinositol bifosfatı (PIP2) hidrolize eden fosfolipaz C'yi (PLC) aktive eder ve bu da Ca^{2+} iyonlarının artmasına neden olur. Sitosolik Ca^{2+} iyonlarındaki değişiklik, kalsiyum sensörlerinden biri olan SOS3 (CBL4) tarafından algılanıp SOS2 (CTPK24) ile kompleks oluşturmalarına neden olur. Oluşan SOS3-SOS2 (CBL4-CTPK24) protein kinaz kompleksi, SOS1 genini aktive ederek bir Na^+/H^+ antiporter olan SOS1 proteininin üretilmesini ve fosforilasyonunu sağlar. Böylece Na^+ 'nın membrandan çıkışı sağlanır. Köklerden Na^+ dışarı atılması, Na^+ 'nın yapraklarda toksik konsantrasyonlarda birikmemesi için önemlidir. SOS3-SOS2 kompleksi aynı zamanda düşük kapasiteli bir Na^+ taşıyıcısı olan HKT1 ("histidin kinaz transporter 1") inaktive ederek sitozole Na^+ girişini kısıtlar. İyonik homeostazın sağlanmasından etkili yollardan biri olan Na^+ 'un vakuollere itilmesini sağlayan NHX'in etkinleştirilmesinde SOS2'nin yanı sıra Ca^{2+} bağlı proteinler (kalneksin, kalmodulin (CaM)) de etkilidir. CAX1 ise tüm bu yolakta sitozolik Ca^{2+} homeostazını eski haline getirerek SOS2 aktivitesi için ek bir hedef olarak tanımlanır. Yüksek tuz stresine karşı gösterilen tolerans mekanizmalarından bir diğeri ise iyonik homeostazın yeterli derecede sağlanamaması durumunda meydana gelen sürgünlerdeki doku toleransıdır. Bitki fazla tuzu ilk olarak yaşlı yapraklarda biriktirerek dokuların işlevini sürdürmeye çalışır. Diğer yandan hücre içinde artan Na^+ miktarı reaktif oksijen türlerinin de hücre içinde birikmesine yol açar. Biriken ROS'lar ise enzim inaktivasyonuna ve DNA hasarına sebep olarak hücre

homeostazını olumsuz yönde etkiler. Bu durumla başa çıkabilmek için hücrede çeşitli antioksidan mekanizmalar devreye girer (Şekil 2.5) (Tuteja, 2007; Munns ve Tester, 2008; Isayenkov ve Maathuis, 2019).

Bitkilerin tuz stresine gösterdikleri tolerans farklılık gösterir. Tahıllar arasında pirinç (*Oryza sativa*) en hassas, arpa (*Hordeum vulgare*) ise en toleranslı olandır. Makarnalık buğday (*Triticum turgidum* ssp durum) ise ekmek buğdayına (*Triticum aestivum*) göre daha az toleranslıdır (Munns ve Tester, 2008). Başta düşük toleransa sahip bitkiler olmak üzere bitkilerin tuz stresine olan toleranslarını artırmak için çözümlerin belirlenmesi, dünya genelinde sürdürülebilir tarımın devam etmesi için önemlidir.

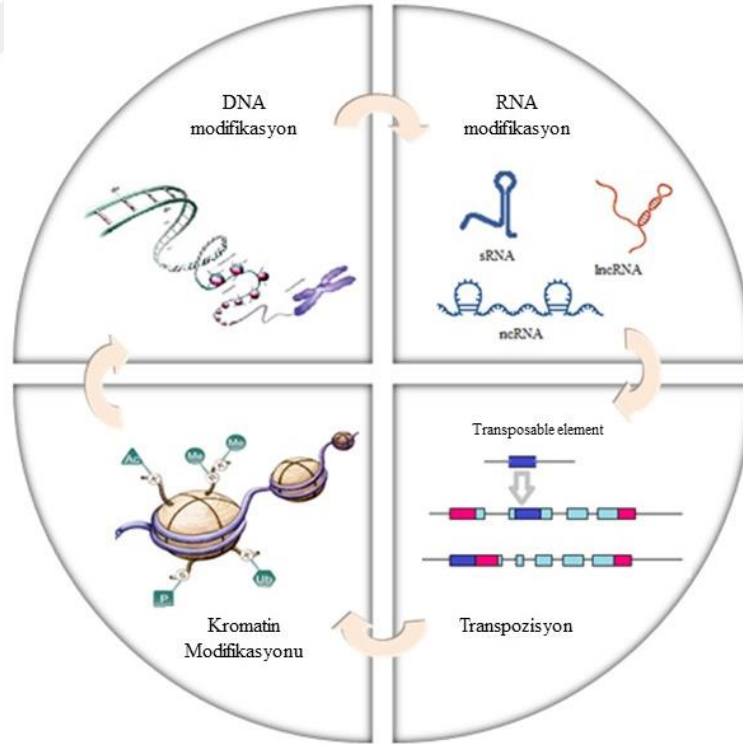


Şekil 2.5: Tuzluluk toleransının SOS ve ilgili yollarla düzenlenmesi (Tuteja, 2007).

2.3. EPİGENETİK

Epigenetik terimi ilk olarak Conrad H. Waddington'un 1942 yılında 'Epigenotip' hakkında yazdığı bir makalede kullanılmıştır. Waddington bu terimi, genotip ve fenotip arasındaki bağlantının kurulması ve bu bağlantının gelişimsel süreçlerin bir karışımı olduğunu belirtmek için öne sürmüştür. Bu terimi kullanırken Waddington, 'fenotipin genotip ve ortama eşit olduğu' genetik kavramını, 'fenotipin genotip, epigenotip ve ortama eşit olduğu' bir düşünceye genişletmiştir (Gilbert, 2012).

Epigenetik düzenlemeye DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, histon varyantları, kromatin yeniden modellenmesi, siRNA'lar ve gen anlatımının transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel kontrolünde yer alan transpozabl elementler (“transposable elements”, TE) aracılık eder. Bu değişiklikler mitotik olarak kararlıdır veya bir organizmanın DNA sekanslarında herhangi bir değişikliğe neden olmamasına rağmen gelecek nesiller için mayotik olarak kalıtılabilir (Şekil 2.6) (Tarhan ve Turgut-Kara, 2016; Sudan ve diğ., 2018).

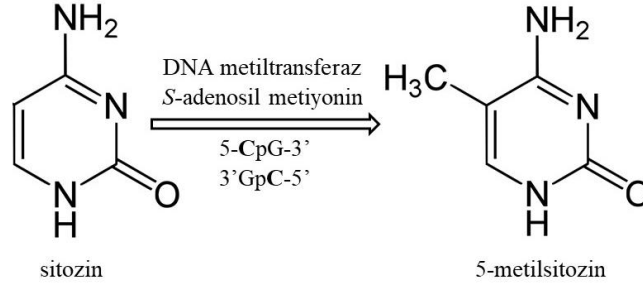


Şekil 2.6: Epigenetik düzenlemelerin genel şeması (Tarhan ve Turgut-Kara, 2016).

Epigenetik düzenlemelerde rol alan kodlanmayan RNA'lar (ncRNA'lar) ve siRNA'lar değişikliğe uğrayabilir ve RNA girişimi yollarında işlev görebilir. Bu işlemin bir sonucu olarak küçük RNA molekülleri oluşur ve bu moleküller olgunlaşmamış bir RNA veya DNA molekülü ile etkileşime girerek gen anlatım sürecinin inhibisyonuna neden olabilirler. Ayrıca, diğer bazı ncRNA molekülleri, büyük kromozom segmentlerinin susturulmasına müdahale eder ve sonuç olarak bu segmentler, transkripsiyonel olarak inaktif hale gelir. Genetik materyalin düzenlenmesinde etkili diğer bir mekanizma da 1940'larda Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde kromozomlara zarar verme eğilimleri nedeniyle keşfedilen transpozabl elementler (TE) veya transpozonlardır. Transpozonların genom içerisindeki rastgele hareketinin genlerin düzenlenmesinde doğrudan ve dolaylı olarak katkıda bulunduğu bilinmektedir (Lisch, 2009; Tarhan ve Turgut-Kara, 2016).

Kalıtsal molekülün kromozom düzeyinde yapısal olarak düzenlenmesi histon modifikasyonları ile sağlanır. Ökaryotik DNA; histonların etrafına sarılıp, negatif yükünü nötralize eden pozitif yüklü proteinler ile katlanmaya başlar. Histonlar (H2A, H2B, H3 ve H4) farklı pozisyonlarda (çoğunlukla lizin ve arjinin bakiyelerinde) farklı kimyasal işaretlerle (metilasyon, asetilasyon, ubikitinasyon, fosforilasyon, biyotinleme ve ADP-ribozilasyon) kovalent olarak modifiye edilebilir. Farklı histon işaretleri farklı işlevlere sahiptir ve aynı histon işareti bile farklı organizmalarda farklı işlevlere sahip olabilir. Asetilasyon, fosforilasyon ve ubikitinasyon gen anlatımını arttırırken; H3K9 (histon H3 Lizin 9) ve H3K27 (histon H3 Lizin 27) demetilasyonu, biyotinleme ve sumolasyon gen anlatımının baskılanmasına neden olabilir (Clark, 2009; Chen ve diğ., 2010; Feng ve Jacobsen, 2011). Histon kuyruklarındaki bu kimyasal modifikasyon modellerinin varlığı 'histon kod' hipotezinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu hipoteze göre modifikasyonların ortaya çıkış sırası kadar özel kombinasyonlarının da kromatinin şeklini belirleyebileceği ve böylece genlerin transkripsiyon seviyelerinin değişebileceği öne sürülmektedir (Jenuwein ve Allis, 2001; De La Cruz ve diğ., 2005).

En yaygın epigenetik düzenlemelerden biri olan DNA metilasyonu ise DNA replikasyonunda doğru bir şekilde kopyalanan böylece hücre bölünmesi sırasında epigenetik bilgiyi ileten sitozinin kovalent modifikasyonu olarak tanımlanabilir (Park ve diğ., 2016). DNA'nın sitozin bazlarına bir metil grubunun eklenmesi ile 5 metilsitozin (5-mC) oluşturulur (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Sitozine metil grubunun eklenmesi ile 5-metilsitozin bazının oluşması.

DNA'daki sitozinlerin ve adeninlerin metilasyonu hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda önemli bir epigenetik işarettir. Bu durum protein-DNA ilişkilerini etkiler ve genom stabilitesine katkıda bulunur. Bakterilerde sitozin metilasyonu genom DNA'sının bakteriyi enfekte eden faj DNA'sından ayrılmasını ve bu sayede faj DNA'sının konakçı restriksiyon enzimleri tarafından parçalanmasını sağlar. Ökaryotlarda ise sitozin metilasyonu düzenleyici proteinlerin bağlanmasını engelleyebilir, promotör ve genlerin kodlayıcı sekanslarının transkripsiyonunu baskılayabilir (Finnegan ve diğ., 1998; Iyer ve diğ., 2011; He ve diğ., 2011; Zangi ve diğ., 2020).

1970'lerde yapılan çalışmalarda; susturulmuş X kromozomunun keşfedilmesi ile bu durumun somatik hücrelerde klonal olarak miras alındığı ve DNA sekansının kendisinde bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Böylece 5 metilsitozin “susturucu” epigenetik bir işaret olarak tanımlanmaya başlanmıştır (Jones, 2012; Felsenfeld, 2014).

DNA metilasyonu; replikasyondan sonra metiltransferaz enzimleri tarafından metil grubunun S-adenosil metiyoninden (SAM) sitozinlere aktarılmasıyla gerçekleşir. DNA'nın demetilasyonu ise pasif ve/veya aktif olabilir. Pasif DNA demetilasyonu, DNA replikasyonunu takiben hücre döngüsü sırasında metiltransferazların etkisiz kalması durumunda meydana gelir ve bu durum yeni sentezlenmiş ipliğin metillenmemiş halde kalmasına sebep olur. Aktif DNA demetilasyonu ise normalde DNA onarımı ile ilişkili olan DNA glikozilazların 5-metilsitozini tanıyarak metil grubunu DNA'dan çıkarması ile gerçekleşir. DNA demetilasyonu bazı baskılı genlerin anlatım yapılan alellerini aktive edebilir (Gehring ve diğ., 2009; Zhu, 2009).

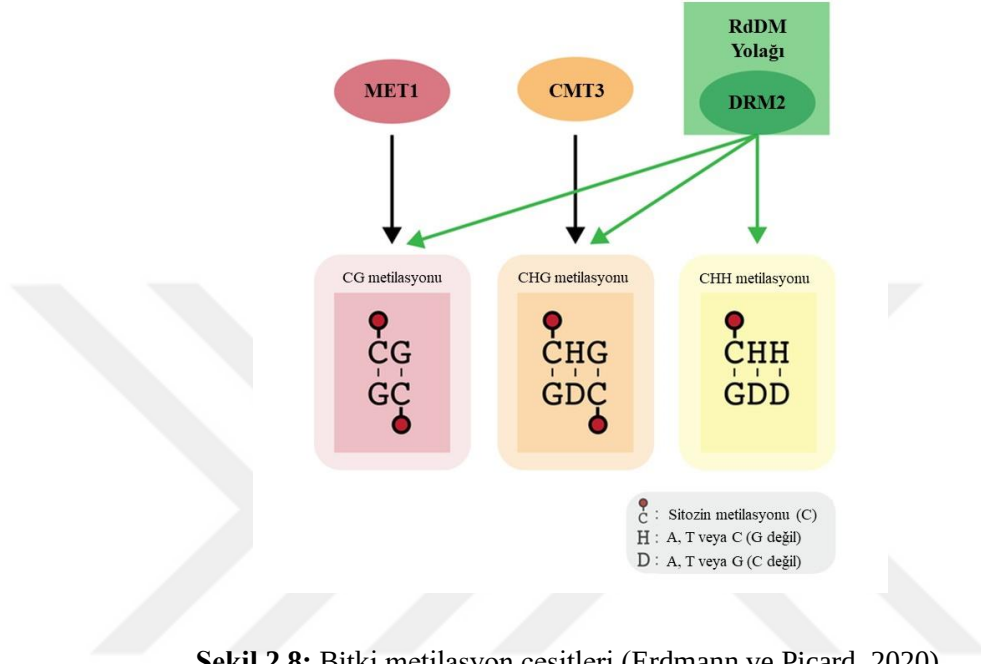
2.3.1. Bitkilerde Metilasyon

Spesifik genlerin promotöründe 5-metilsitozinin bulunması, transkripsiyon faktörlerinin ve diğer proteinlerin bitkilerde DNA'ya bağlanma biçimini değiştirir. Aynı zamanda, genin transkripsiyon başlangıç bölgesi çevresinde kromatin yapısını değiştiren DNA'ya metil bağlayıcı proteinleri ve histon deasetilazları da çeker. Her iki şekilde de transkripsiyonu bloke olur ve gen susturulması gerçekleşir (Fraga ve Esteller, 2002).

Çiçeklenme süresi, gametogenez, stres tepkisi, ışık sinyali ve morfolojik değişim dahil olmak üzere bitki gelişiminin birçok aşaması doğrudan veya dolaylı olarak epigenetik işaretlerle düzenlenebilir. Bitkilerdeki sıcaklık, gün uzunluğu, UV ve tuz gibi abiyotik stres kaynakları ilgili genlerin kodlama bölgesindeki metilasyon düzeninde değişikliklere neden olur ve gen anlatımını düzenler (Sudan ve diğ., 2018). Bitkilerdeki DNA metilasyonu simetrik CG, CHG ve asimetrik CHH (burada H; A, T veya C'yi temsil eder) şeklinde iki tipte meydana gelir (Feng ve Jacobsen, 2011; Kong ve diğ., 2018). Türlerle ilgili olarak bitkilerde toplam sitozinin %6 ila %25'i metillenmiş durumdadır. *A. thaliana*'daki sitozin metilasyonu ise tüm DNA metilasyonunun yaklaşık %30'unu oluşturur (Haag ve Pikaard, 2011; Sahu ve diğ., 2013). Sitozin metilasyonunun gerçekleştiği bölgelerin dağılımı da bitki türleri arasında farklılık gösterir. Yapılan çalışmalar sonucu Arabidopsis yapraklarında %30,5 CG, %10,0 CHG, %3,9 CHH metilasyonu; Pirinç (*Oryza sativa*) yapraklarında %58,4 CG, %31,0 CHG, %5,1 CHH metilasyonu; Pancar (*Beta vulgaris*) yapraklarında %92,6 CG, %81,2 CHG, %18,9 CHH metilasyonu içerdiği bulunmuştur (Bartels ve diğ. 2018).

2000 yılında *A. thaliana* genom dizilemesinin tamamlanmasıyla bitkilerin DNA metiltransferaz proteinlerini kodlayan üç ana sitozin DNA-metiltransferaz genine sahip olduğu ortaya çıkmıştır. İlk enzim, CG dizilerinin metilasyonundan sorumlu ve memeli DNMT1 geninin bir homologu olan Metiltransferaz1 (MET1) dir. İkinci enzim bitkilere özel olan Kromometilaz3 (CMT3) CHG dizileri ile az miktarda CHH dizisinin metilasyonundan sorumludur. Memelilerdeki DNA Metiltransferaz3'ün (DNMT3) homologu olan üçüncü ana metilasyon enzimi DRM2 ("Domains Rearranged Methylase") ise siRNA'larla birlikte esas olarak asimetrik CHH metilasyonunun korunmasından sorumludur. Bu enzim CHG metilasyonunun korunmasında küçük bir rol oynar ve ayrıca sitozinlerin tüm sekans bağlamında *de novo* metilasyonu için gereklidir (Şekil 2.8) (Ashapkin ve diğ., 2002; Henderson ve Jacobsen, 2007; Johnson ve diğ., 2007; Law ve Jacobsen, 2010). Her DNA replikasyon döngüsünden sonra

asimetrik metilasyonun yeniden oluşturulması gerekir, çünkü belirli sitozinlerin yeniden sentezlenmesi için bir kılavuz görevi görecektir tamamlayıcı bir dizi yoktur. Bu sebeple asimetrik bölgelerin metilasyonu, önceden modifiye edilmemiş DNA'yı metilasyon yapabilen *de novo* metiltransferazların sürekli aktivitesi ile sağlanır (Cao ve Jacobsen, 2002).



1994 yılında viroidle enfekte tütün bitkilerinde keşfedilen RNA'ya bağımlı DNA metilasyonu da sitozin DNA metilasyonu yoluyla gen anlatımını kontrol eder. RNA aracılı DNA metilasyonunda Polimeraz II (Pol II)'den gelişmiş olan bitkiye özgü Pol IV ve Pol V görev alır (Chinnusamy ve Zhu, 2009b; Zhang ve Zhu, 2011). RNA polimeraz IV (Pol IV) tarafından üretilen uzun tek zincirli RNA (ssRNA)'lar önce RNA-BAĞIMLI RNA POLİMERAZ 2 (RDR2) ile çift zincirli RNA (dsRNA)'lara dönüştürülür. Ardından DICER-LIKE 3 (DCL3) ile 24 nt siRNA'lara dönüştürülerek sitoplazmaya gönderilir. Sitoplazmaya geçen siRNA'lar AGO4 proteinlerine bağlanır ve daha sonra genom içindeki aynı kökenli DNA sekanslarında sitozin metilasyonunu hedeflemek için tekrar nükleusa geçer. Bu mekanizmada siRNA'ların hedef bölgeleri bulmasına RNA polimeraz V (Pol V) rehberlik eder (Matzke ve Mosher, 2014; Zhou ve Law, 2015; Gallego-Bartolomé ve diğ., 2019).

A. thaliana'daki DNA metilasyonunun iki görevi vardır. Genomu bencil “selfish” DNA elementlerinden korur ve gen anlatımını düzenler. Genom savunmasında DNA metilasyonunun

birincil rolü ile tutarlı olarak, transpozonlar ve diğer dağınık tekrar dizileri, metillenmiş DNA'nın çoğunu içerir. Bu diziler sentromerler etrafında toplanır, fakat ökromatinde de bulunur. Bitkilerde, promotör bölgelerinin DNA metilasyonu genellikle transkripsiyonu inhibe eder, ancak kodlama bölgelerindeki metilasyon genellikle gen anlatımını etkilemez (Chan ve diğ., 2005).

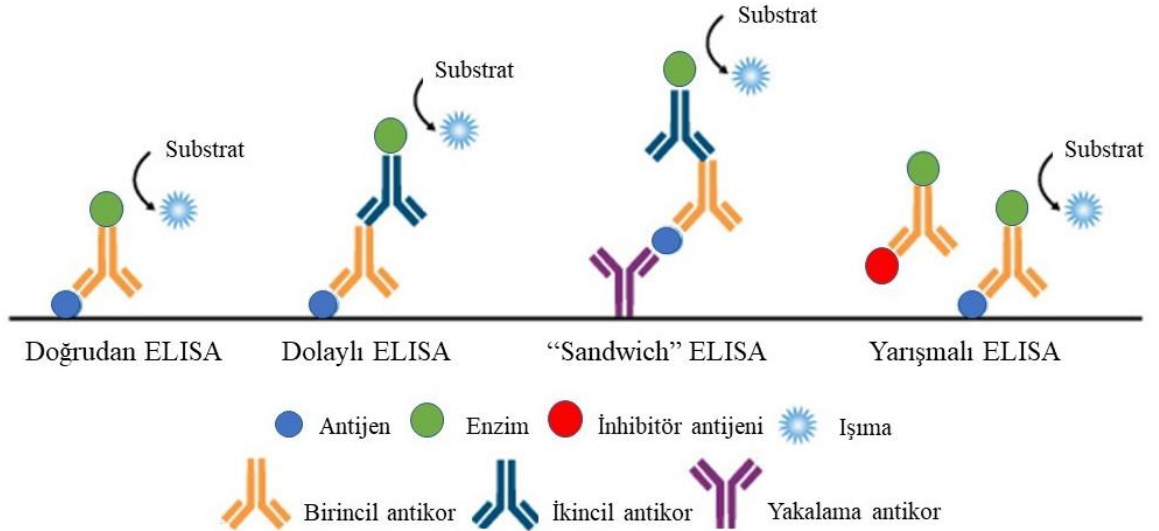
2.3.2. Metilasyon Belirleme Yöntemleri

DNA metilasyonu bitki gelişimini düzenlemede ve genom düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Epigenetik düzenlemeler bitkilerin strese karşı verdiği cevapların daha kararlı olabilmesini sağlar (Chinnusamy ve Zhu, 2009a; Finnegan ve diğ., 2000). Bu sebeple bitki genomundaki epigenetik değişimleri saptamak bitkilerin strese verdiği cevapların anlaşılması açısından büyük önem taşır.

5-metilsitozini (5mC) kantitatif olarak belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemler; DNA Bisülfid Dizileme ("BS-Seq"), COBRA (Kombine Bisülfid Kısıtlama Analizi), HPCE (Yüksek Performanslı Kapiler Elektroferez), HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), MS-PZR (Metilasyona Özgü PZR, "MS-PCR"), MSRE (Metilasyon Duyarlı Restriksiyon Endonükleaz), TLC (İnce Tabaka Kromatografisi), Radioaktif Etiketleme, DNA Mikrodizilim ("DNA Microarray") ve İmmüno Çöktürmesi yöntemleridir. HPLC ve TLC gibi bazı yöntemler sadece metillenmiş sitozin kalıntılarının metillenmemiş sitozin kalıntısına oranının ölçülebilmesini sağlarken PZR temelli yöntemler ise gene spesifik metilasyon oranlarının ölçülebilmesini sağlar (Fraga ve Esteller, 2002; Dahl ve Guldborg, 2003; Parle-Mcdermott ve Harrison, 2011). Genom düzeyinde DNA metilasyonunun hızlı ve pratik bir tayini olarak 5-metilsitozinin saptanması için HPLC ve TLC gibi kromatografiye dayalı çeşitli teknikler zaman alıcıdır ve yüksek maliyetlerle düşük verime sahiptir. Bu sorunu çözmek için enzim ve enzim substratı kullanılarak elde edilen renk değişimi yoluyla antijen-antikor reaksiyonlarını gösteren ve biyolojik sıvılardaki moleküllerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemeye yarayan, ELISA olarak da bilinen "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay" gibi yöntemler son yıllarda sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Aydın, 2015).

ELISA yöntemi temelde homojen ve heterojen olarak ikiye ayrılır. Homojen ELISA yönteminde enzimler antikora bağlandıklarında inaktif olurlar ve dolayısıyla yıkama aşamasına gerek yoktur. Ancak bu yöntem pahalıdır ve hassasiyeti düşüktür, ancak kullanımı

kolaydır. Heterojen ELISA yönteminde ise antijen ve antikor bağlandıktan sonra ortamdaki diğer moleküllerin kompleks ile etkileşiminin önlenmesi için antijen-antikor kompleksi deney tüplerinin duvarlarına bağlanır ve kompleks dışındaki her şey yıkama prosedürleri ile ortamdan uzaklaştırılır. Diğer yönleme nazaran hassasiyeti daha fazla olduğu için daha yaygın bir şekilde kullanılır. ELISA yönteminin yıkama aşamasına göre heterojen ve homojen olarak adlandırılmasının yanı sıra antikor bağlanma özelliklerine göre de doğrudan, dolaylı, “Sandwich” ve yarışmalı olarak isimlendirilen türleri mevcuttur. Doğrudan ELISA yönteminde ölçüm enzim ile etiketlenmiş bir antikor veya antijen sayesinde gerçekleşir. Duyarlılığı az olduğundan yüksek molekül ağırlıklı antijenlerin miktarını belirlemek için uygundur. Dolaylı ELISA ise yüksek hassasiyete sahip bir yöntemdir ve ucuzdur. İkincil antikorla çapraz reaktivite meydana gelebilme dezavantajı vardır. “Sandwich” ELISA diğer yöntemlerden 2-5 kat daha duyarlıdır ancak zaman alıcı ve pahalıdır. Adını iki antikor arasında bir antijeni sandviç yapabilme düzeneğinden alır. Yarışmalı ELISA yönteminde etiketli ve etiketlenmemiş antijen veya antikor molekülleri, kuyucuklardaki antikora veya antijene bağlanmak için birbirleriyle rekabet eder. Düşük verime sahiptir ve özgüllüğü de düşük olduğundan seyreltik numuneler için kullanılması uygundur. Numunedeki yüksek miktarda antijen daha düşük bir sinyal verecek şekilde ters bir eğri üretir (Aydın, 2015; Shah ve Maghsoudlou, 2016).



Şekil 2.9: ELISA yöntemi çeşitleri (Abnova, 2020).

Bu tez çalışmasında diğer yöntemlere nazaran pek çok avantaja sahip olan dolaylı ELISA tabanlı “MethylFlash™ Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy” kit kullanılmıştır. Bu teknik, 1978 yılında ortaya konan doğrudan ELISA yönteminden esinlenilerek geliştirilmiştir. Yöntemin dolaylı olarak adlandırılmasının nedeni, ölçülecek antijeni belirleyip ayıran bileşenin birincil antikor değil, ortama yerleştirilen ikincil bir antikor olmasıdır. Bu yöntemin esasına göre ilk olarak DNA, antijen kaplı kuyucuklara eklenir ve plaklar inkübe edilir. Bu inkübasyon sırasında uygulama serum plağındaki antijenlere karşı oluşan antikorlar, bir antijen-antikor kompleksi üretir. Antijen-antikor kompleksini görünür kılmak için, serumdaki antikoru tanıyan ve enzim ile etiketlenmiş ikincil bir antikor ve ardından enzimin substratı, renk üretmek için ortama eklenir. Son olarak da spektrofotometre ile konsantrasyon belirlenir. Yüzde ölçeğinde kesirli hale getirilebilen optimize edilmiş pozitif kontroller, testin HPLC-MS analizine göre daha doğru ve yüksek oranda karşılaştırılabilir olmasını sağlar (Ross ve diğ., 2001; Aydın, 2015; Epigentek, 2019).

Kullanılan kitin çalışma esasına göre tüm biyolojik numunelerin DNA'sındaki 5-mC seviyeleri, genomdaki sitozinlerin içeriğine göre metillenmiş sitozinlerin miktarı olarak rapor edilir. Genom düzeyinde DNA metilasyon analizinde 5-mC için yakalama antikorunun metillenmemiş sitozine karşı çapraz reaktivitesi yoktur veya ihmal edilebilir düzeyde oluşur. Genom düzeyinde DNA metilasyonu, metillenmemiş sitozine çapraz reaktivite olmaksızın 5-mC seviyelerinin spesifik olarak ölçülmesiyle belirlenir (Tellez-Plaza ve diğ., 2014; Epigentek, 2019).

2.4. GEN ANLATIM ANALİZLERİ

Hücrelerin, dokuların ve organizmaların biyolojik aktiviteleri moleküler biyolojinin santral dogmasına dayanır. Francis Crick (1970) tarafından tanımlandığı şekliyle "moleküler biyolojinin santral dogması", yaşam planının DNA içinde dijital olarak korunduğunu ve bu bilginin haberci RNA aracılığıyla sıralı olarak kopyalandığını ardından biyolojik bir sistem içinde proteine çevrildiğini belirtir. Transkriptom veya genomik DNA'dan kopyalanan genlerin çalışması olan transkriptomik ise belirli bir gelişim aşaması veya fizyolojik durum için bir hücredeki tüm transkript setini ve bunların miktarını ortaya çıkarır. Transkriptom, belirli bir koşul altında gen anlatımını yansıttığından, oldukça dinamiktir ve dış etkenlere duyarlıdır. (Raghavachari ve Garcia-Reyero, 2018). Temel olarak gen anlatım analizleri ise ilgili genin belirli bir zaman ve koşulda anlatım yapan mRNA'sının miktar tayinine dayanmaktadır.

Büyüme, farklılaşma ve hayatta kalma ile ilgili hücresel kararlar genellikle değiştirilmiş gen anlatım modellerinde yansıtılır bu sebeple gen anlatım analizi, biyolojik araştırmaların birçok alanında giderek daha da önem kazanmaktadır ve bu analizlerin görece kolaylığı, DNA'nın durağanlığı ve kararlılığına nazaran RNA'nın dinamik yapısından kaynaklanmaktadır. Yapılan gen anlatım analizlerinin; ifade edilen genlerin kalıplarını ve transkriptomu anlamak, genomun fonksiyonel öğelerini yorumlamak, hücrelerin ve dokuların moleküler bileşenlerini ortaya çıkarmak ve karmaşık düzenleyici yollar hakkında fikir vermesi beklenmektedir. Aynı zamanda yeni biyolojik süreçlerle ilgili veya hastalıkta yer alan genlerin tanımlanmasına yol açabilmektedir (Vandesompele ve diğ., 2002; Raghavachari ve Garcia-Reyero, 2018).

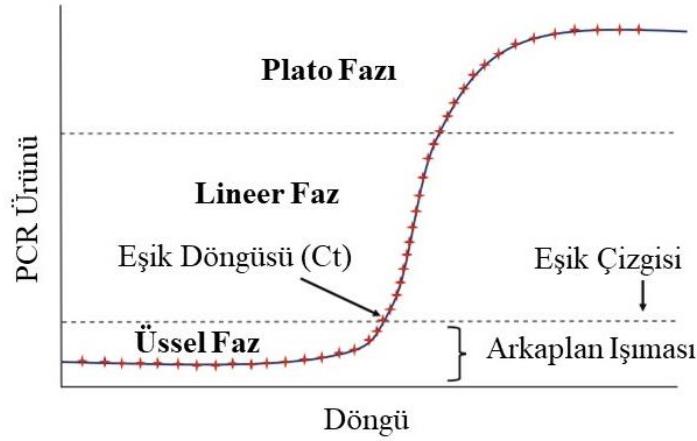
Gen anlatımı çalışmaları 1977 yılında James Alwine ve diğ.'nin RNA miktarını saptamak için Northern melezleme ("Northern Blotting") yöntemini kullanmasıyla başlamıştır. Son yıllarda geliştirilen iki yöntem olan Gerçek Zamanlı PZR ("Real Time PCR") veya RNA Dizileme ("RNA-Seq") popülerlik kazanmıştır ve sıklıkla uygulanmaktadır. Gerçek zamanlı PZR sınırlı sayıda gen için birçok farklı örnekte gen anlatımının eş zamanlı olarak saptanması sağlarken, "RNA-Seq" ile anlık olarak tüm transkriptlerin analizi yapılabilir. Bununla birlikte duyarlılık, reaksiyon ilerlemesinin gerçek zamanlı tespiti, analiz hızı ve numunedeki incelenen malzemenin hassas ölçümü gibi avantajlara sahip olan Gerçek Zamanlı PZR ("Real Time PCR") tekniği diğer yöntemlerle elde edilen verileri doğrulaması açısından en doğru ve güvenilir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Sıklıkla kullanılan diğer yöntemler ise DNA Mikrodizilim ("DNA Microarray"), Farklılık Gösterimi ("Differential Display", DD) ile Gen Anlatımının Seri Analizi ("Serial Analysis of Gene Expression", SAGE) yöntemleridir (Vandesompele ve diğ., 2002; Ding ve Cantor, 2004; Kozera ve Rapacz, 2013; San Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016).

2.4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

1984 yılında Kary Mullis'in belirli bir DNA segmentinden birkaç saat içinde milyonlarca kopya elde edilmesini sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniğini keşfetmesinin ardından 1992 yılında Higuchi ve diğ. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonunu ("qPCR") geliştirmiştir (Higuchi ve diğ., 1992). Gerçek zamanlı PZR ve gerçek zamanlı ters transkripsiyon PZR'nin ("Gerçek Zamanlı RT-PCR") ortaya çıkışı, gen anlatımının belirlenmesini önemli ölçüde değiştirmiştir. Kantitatif gen anlatım çalışmaları ile genel olarak değişen şartlarda bir genin anlatımındaki farklılığın incelenmesi gerçekleştirilebilir. Örneğin, hücre farklılaşması ve

gelişimi sırasında gen ifadesindeki değişikliğin veya kimyasal bir maddeye (ilaç, toksik madde, hormon veya sitokin vb.) maruz kalan hücrelerin gen ifadesindeki değişikliğin araştırılması mümkün olabilmektedir (Wong ve Medrano, 2005; Schmittgen ve Livak, 2008).

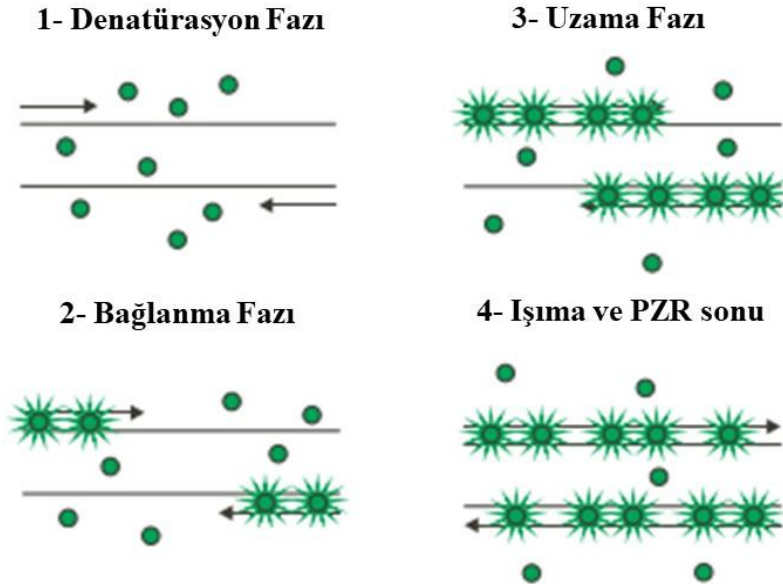
Klasik PZR’da reaksiyonun tamamlanmasının ardından PZR ürünlerinin jel elektroforezi ile kontrol edilip ölçülmesi gerekir. Gerçek zamanlı PZR’de ise floresan tabanlı teknoloji kullanır ve her amplifikasyon döngüsü sırasında üretilen ampikon miktarı gerçek zamanlı olarak ölçülür. Böylece gerçek zamanlı PZR, reaksiyon sonrası aşamaları azaltıp deneysel hata payını en aza indirir (San Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016). Şekil 2.10’da gösterildiği gibi gerçek zamanlı PZR üssel faz, lineer faz ve plato fazı olarak 3 fazdan oluşur. Üssel faz, en verimli amplifikasyonu nedeniyle verileri toplamak ve analiz etmek için en uygun aralıktır. Bununla birlikte, başlangıçta amplifikasyon arka plan düzeyinde kaldığından, erken döngülerde PZR ürünlerinin floresan sinyali her zaman düzensizdir. Arka plan floresan sinyalini ortadan kaldırmak için, eşik çizgisi belirlenmiştir. Eşik döngüsü (“Cycle Threshold”, Ct), amplifikasyon grafiğinin eşik çizgisiyle kesiştiği döngü numarasıdır ve hata payı az bir PZR için olabilecek en düşük Ct değerini seçmek gerekir. Optimal bir PZR reaksiyonunda, her ampikon kopyalandığında ve ürün miktarı her döngüden sonra ikiye katlanacaktır (Fraga ve diğ., 2008; Cao ve diğ., 2020).



Şekil 2.10: Gerçek Zamanlı PZR fazları ve temel adımları (San Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016).

Gerçek zamanlı PZR'nin geleneksel kantitasyon tekniklerine göre artan duyarlılığı ve dinamik aralığı nedeniyle, GAPDH ve β -aktin gibi iyi bilinen genler referans olarak kabul edilir. Bu düzenleyici genler hücrenin hayatta kalması için gerekli olduklarından tüm nükleus hücre tiplerinde mevcuttur. Bu genlerin mRNA sentezinin, deneysel tedaviler altında bile çeşitli dokularda stabil ve güvenli olduğu düşünülmektedir (Pfaffl, 2001; Wong ve Medrano, 2005).

Gerçek zamanlı PZR'da floresan tabanlı okuma floresan dedektör molekülleri sayesinde gerçekleştirilir. Hidroliz ("TaqMan") veya hibridizasyon üzerine floresan prob dizileri, floresan saç tokaları ("Fluorescent Hairpins") ve ara boyalar (SYBR Green) Gerçek Zamanlı PZR'da en yaygın kullanılan floresan belirleyicilerdir. "SYBR Green I" (SG-I), kimyasal formülü $C_{32}H_{37}N_4S$ olan organik bir bileşiktir. Gerçek Zamanlı PZR sırasında hedef dizinin primer aracılı replikasyonunu takiben, çift sarmal DNA'nın küçük oluklarına bağlanıp kolayca tespit edilebilen güçlü bir floresan ışığa yayarak PZR ürünlerinin gerçek zamanlı olarak doğrudan görselleştirilmesini sağlar (Şekil 2.11). SB-I diziye özgü problemlara kıyasla ucuzdur, kullanımı kolaydır ve diziye özel olmadıkları için herhangi bir reaksiyon için kullanılabilirler. Fakat gen dizileri arasında ayırım yapamadıkları için çoklu analizler için kullanılamazlar (VanGuilder ve diğ., 2008; San Segundo-Val ve Sanz-Lozano, 2016).



Şekil 2.11: GZ-PZR'de SG-I kullanımı; 1- Denatürasyon fazında SG-I serbest haldedir. 2- Bağlanma Fazında primerler tek zincirli DNA'ya bağlanır. 3- Uzama Fazında çift zincirli DNA oluşmaya başlar ve SG-I çift zincirli DNA'ya bağlanır. 4-Çift zincirli DNA miktarı arttıkça SG-I'in DNA'ya bağlanma oranı artar ve aynı anda daha yüksek floresans gözlenir (Van der Velden ve diğ., 2003).

Stres koşulları altında büyüyen bitkilerde DNA metilasyon motiflerinin nesiller boyunca kalıtılarak epigenetik hafızanın oluştuğu bilinmektedir. Bu sayede sağlanan içsel epigenetik plastisite, organizmaların hızlı tepkisinde ve stres altında uzun vadeli adaptasyonun sağlanmasında önemli bir rol oynar (Sahu ve diğ., 2011). Bitkilerin vejetatif dönemlerinde çevresel etki altında biriktirdikleri bu epigenetik hafıza, daha sonra gelişme sırasında eşey hücreleri tarafından bir sonraki nesle aktarılır. Arıkan ve diğ.'nin (2018) yaptıkları çalışmada, tuz stresinin bitkilerde hipometilasyona sebep olduğunu ve bunun doğrudan *MET1* geni ile bağlantılı olmadığını, *DRM2* bağlantılı *de novo* metilasyonun etkilendiğini belirtilmiştir. Tüm bu bilgiler göz önüne alındığında bitkilerin karşılaştıkları stres koşullarına karşı daha dayanıklı hale getirilmesi ve bu dayanıklılığı nesiller boyu sürdürebilmelerinin sağlanması için öncelikle moleküler mekanizmaların iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu çalışmada ise Arıkan ve diğ.'nin (2018) bildirdiği NaCl stresine bağlı hipometilasyonun *MET1* geni ile ilişki oranının ortaya konulabilmesi için *MET1* enziminin sentezlenmediği *null* mutantları *met1-7* ve *met1-3*, farklı konsantrasyonlarda tuz stresine maruz bırakılmış ve genom düzeyinde metilasyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Aynı zamanda *null* mutantlarda bitkilerde RdDM mekanizmasında görev aldıkları bilinen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımı gerçek zamanlı PZR yöntemi ile analiz edilmiş, hipometilasyondaki rolleri anlaşılmasına çalışılmıştır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu tez çalışmasında kullanılan *MET1* (AT5G49160) genine ait *null Arabidopsis thaliana* mutant *met1-7* ve *met1-3* tohumlarının ve kontrol grubu olarak kullanılan *A. thaliana* Col-0 tohumunun kaynağı Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan bitki materyali.

Mutant ismi	İsim	Üniversite	NASC Stok Numarası
Columbia Col-0	Dr. Ralf Stracke	Bielefeld Üniversitesi, Biyoteknoloji Merkezi	
<i>met1-7 null mutant</i>	Dr. Binglian Zheng	Fudan Üniversitesi, Biyokimya ve Moleküler Biyoloji bölümü	N576522
<i>met1-3 null mutant</i>	Dr. Hidetoshi Saze	Okinawa Bilim ve Teknoloji Enstitüsü, Bitki Epigenetik Birimi	N16394

Familya: *Brassicaceae*

Cins: *Arabidopsis*

Tür: *Arabidopsis thaliana*

3.2. BESİYERİ VE KÜLTÜRLEME KOŞULLARI

Arabidopsis thaliana’ların *in vitro* kültürlenmesi için Murashige ve Skoog (MS) (Murashige ve Skoog, 1962) besiyeri kullanıldı. Çimlendirme besiyerinde kullanılan bileşenlerin miktarları ve markaları Tablo 3.2’de verilmiştir. 250 ml MS besiyeri için, yaklaşık 200 ml distile suya MS ve sukroz eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözdürüldü. Besiyerinin pH’sı ayarlandıktan sonra 250 ml’e tamamlanıp agar eklendi ve 121°C’de, 1.2 atmosfer basınçta, 15 dk otoklavda steril edildi. 50-60°C’ye kadar soğuması beklenen besiyerine 250 µl MS vitamin çözeltisinden 1 mg/l olacak şekilde (Sigma, M3900) ilave edildi.

Doku kültürü çalışmaları laminar hava akımlı steril kabinde (Telstar Bio II Advance, EN-12469) yapıldı. Çimlendirme ve stres uygulaması işlemleri için bitki büyüme kabini [25±2°C, 16 saat ışık/8 saat karanlık, 1400 lux (Sanyo, MLR-352H)] kullanıldı.

Tablo 3.2: MS besiyeri hazırlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları (250ml).

Besiyeri Bileşenleri	Miktar	Marka
MS mikro ve makro element karışımı	1.1 g	Duchefa Biochemie, M0221.0050
Sukroz	7.5 g	Multicell, 800-081-LG
Agar	2.25 g	Sigma, 05039-500G
5N NaOH	pH'sı 5.6-5.8	Merck, 1.06462.1000
MS Vitamin (1mg/ml)	250 µl	Sigma, M3900

3.3. TOHUMLARIN YÜZEY STERİLİZASYONU

Col-0, *met1-7* ve *met1-3* tohumlarının yüzey sterilizasyonu için 3 mg tohuma 1 ml %70'lik etil alkol eklendikten sonra 2 dakika 7500 rpm'de (ScanSpeed Mini, Labnet) santrifüj edildi. Etil alkol uzaklaştırıldı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Son aşamada 1 ml %100'lük etil alkol eklenip yeniden santrifüj (NUVE, NF800R) ile uzaklaştırıldı. Steril tohumlar kuruması için laminar hava akımlı steril kabinde 15-20 dakika bırakıldı. Kuruyan steril tohumlar, MS besiyeri içeren 9 cm çaplı Petri kaplarına döküldü ve hava temasının kesilmesi için parafilm ile sarıldı. MS besiyerine ekilen tohumlar çimlenebilmeleri için bitki büyüme kabininde bırakıldı.

3.4. MUTANTLARIN TANIMLANMASI

met1-3 mutantının *MET1* transkript kontrolü için Bölüm 3.8.4'de anlatılacağı şekilde cDNA sentezlenmiş ve *met1-3* polimorfiziminde T-DNA'nın giriş bölgesine göre tasarlanan primerler kullanılarak RT-PZR (BIO-RAD, T100 Thermal Cycler) yapılmıştır. PZR'da kullanılan *MET1* ve kontrol için seçilen *Aktin* geni primerleri Tablo 3.3'te, PZR koşulları ise Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.3: *met1-3* mutantı T-DNA bölgesi için RT-PZR primerleri.

Primerler	Dizi	Referans
<i>MET1</i>	İleri 5'GATTGTGTCTCTACTACAGAGGC3' Geri 5'GTAAAGCTCATTATAGCCTTGC3'	Saze ve diğ.,2003
<i>Aktin</i>	İleri 5'-GCCAGTGGTCGTACAACCG-3' Geri 5'-TCATGAGGTAATCAGTAAGGTCAC-3'	Sáenz-Mata ve diğ., 2012

Tablo 3.4: RT-PZR koşulları.

	Sıcaklık	Zaman
Denatürasyon	94°C	2'
Denatürasyon	94°C	30''
Primer Bağlanma	55°C (<i>MET1</i>) 61°C (<i>Aktin</i>)	35 Döngü 30''
Uzama	72°C	1'
Final Uzaması	72°C	5'

PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. %1'lik agaroz jel Bölüm 3.7.2'de anlatılacağı şekilde hazırlandı ve örnekler 90 V'da 35 dakika yürütülerek Avegene-Xlite 30R jel görüntüleme sisteminde jelin görüntüsü alındı.

met1-7 mutantının *MET1* transkript kontrolü İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen ve laboratuvarımızda yürütülen FBA-2019-33713 numaralı proje kapsamında yapılmıştır.

3.5. NaCl UYGULAMASI

Arıkan ve diğ. (2018)'de belirtildiği gibi; MS besiyerinde çimlenen 7 günlük Col-0 *met1-7* ve *met1-3 A. thaliana* bitkileri 0, 100 ve 150 mM NaCl (EMSURE, 106404) içeren MS besiyerlerine aktarıldı. Besiyerleri Tablo 3.5'te verilen bileşenler ile verilen miktarlarda hazırlandı. 0, 100 ve 150 mM NaCl stres besiyerlerine alınan bitkiler yedi gün daha bitki büyüme kabini içinde kültürlendi ve sonrasında toplanan bitki örnekleri morfolojik analizler için kullanıldı. Moleküler analizler için toplanan tüm bitki örnekleri ise sıvı nitrojende dondurularak kullanılacakları zamana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.5: Stres besiyerlerinde kullanılan bileşenler ve miktarları (250 ml).

Besiyeri Bileşenleri	0 mM NaCl	100 mM NaCl	150 mM NaCl
MS mikro ve makro element karışımı	1.1 g	1.1 g	1.1 g
Sukroz	7.5 g	7.5 g	7.5 g
Agar	2.25 g	2.25 g	2.25 g
NaCl	—	1.46 g	2.19 g

3.6. MORFOLOJİK ANALİZLER

3.6.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyunun Belirlenmesi

Bir hafta boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl içeren besiyerlerine maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinin yaprak sayısı, yaprak yüzey alanı ve kök boyları belirlenerek stres koşuluna maruz kalmış bitkiler ile kontrol grubu arasındaki morfolojik değişimler belirlendi.

Carus ve Çatal (2005) tarafından da kullanılan Denklem 3.1 ile yaprakların yüzey alanları hesaplandı.

$$y.y. = (\pi r + 2 r) * \lambda \quad (3.1)$$

y.y. = yaprak yüzeyi, r = yaprağın yarıçapı, λ = yaprağın uzunluğu

3.7. GENOM DÜZEYİNDE DNA METİLASYONU

Metilasyonun belirlenmesi amacı ile 0, 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında strese maruz bırakılan *A. thaliana* bitkilerinden DNA izolasyonu yapıldı ve izole edilen DNA'lar kullanılacakları zamana kadar -80°C'de muhafaza edildi.

3.7.1. DNA İzolasyonu Deney Protokolü

“GeneJET Plant Genomic DNA Purification” kit (Thermo Scientific, K0792) ile üreticisi tarafından belirtildiği şekilde DNA izolasyonu yapıldı. Kit içeriği Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.6: “GeneJET Plant Genomic DNA Purification” kit içeriği ve saklama koşulları.

Kitin İçeriği	İşlevi	Saklama Koşulları(°C)
“RNase A”	Enzim (6 X 1.0 ml)	Açıldıktan sonra -20 °C
“Lysis Buffer A”	Parçalama tamponu A (120 ml)	25 °C
“Lysis Buffer B”	Parçalama tamponu B (15 ml)	25 °C
“Precipitation Solution”	Çöktürme çözeltisi (40 ml)	25 °C
“Plant gDNA Binding Solution”	Bitki gDNA bağlama çözeltisi (120 ml)	25 °C
“Wash Buffer I (concentrated)”	Yıkama tamponu I (40ml)	25 °C
“Wash Buffer II (concentrated)”	Yıkama tamponu II (40ml)	25 °C
“Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.1 mM EDTA)”	Elüsyon çözeltisi (150ml)	25 °C

Önceden soğutulmuş olan havanda yaklaşık 100 mg bitki örneği sıvı azot yardımıyla toz haline getirildi ve 350 µl Lysis Buffer A eklenerek 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere aktarıldı. 50 µl Lysis Buffer B ve 20 µl RNase A eklenerek 20 sn vorteks yapıldı. Ardından 10 dk 65°C'ye ayarlanan ısı bloğunda inkübe edildi. 130 µl çöktürme solüsyonu eklendi ve tüpler 2-3 kez alt-üst edilip içeriğin karışması sağlandıktan sonra 5 dk buzda bekletildi. 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıp süpernatant yeni 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere aktarıldı. Üstlerine 400 µl bitki gDNA bağlama çözeltisi ve 400 µl %96'lık etanol eklendi. Tam karıştırma sağlandı ve çözeltiden 700 µl kadarı kitin içeriğinde bulunan filtreye yüklendi. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak DNA'nın filtreye tutunması ve kalan sıvının filtreden aşağıya akması sağlandı. Filtreden geçirilen sıvı atılarak çözelti bitene kadar aynı filtre için bu işlem tekrarlandı. Çözeltinin filtreden geçirildikten sonra filtrenin üstüne 500 µl Yıkama tamponu I eklenerek 10000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Aşağıya geçen sıvı atılarak 500 µl Yıkama tamponu II eklendi ve 14000 rpm'de 3 dk santrifüj yapıldı. Filtrenin alt kısmı atılarak yeni Eppendorf tüplere yerleştirildi. 40-100 µl TE tampon filtreye eklenerek 5 dk bekletildi ve 10000 rpm'de 1 dk santrifüj yapılarak DNA'nın filtreden geri kazanımı sağlandı.

3.7.2. DNA'nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

DNA örneklerinin bütünlüklerinin belirlenebilmesi için %1 agaroz jel elektroforezinden yararlanıldı. DNA'nın jelde yürümesi için 50X TAE tamponunun distile su ile seyreltilmesi sonucu elde edilen 1X TAE tamponu kullanıldı. 50X/1 L konsantrasyonunda TAE tamponu hazırlamak için 242 g Tris-base (Sigma, T1503) 600 ml ddH₂O'da çözdürüldükten sonra 57.1 ml glasiyel asetik asit (Merck, 101830) ve 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) (Merck, K03559321) eklenerek son hacim dH₂O ile 1L'ye tamamlandı.

Agaroz jel, Maniatis ve diğ. (1982) tarafından belirttiği şekilde hazırlandı. 40 ml 1X TAE tamponu için 0,40 g agaroz (Sigma, A5073) tartılarak mikrodalga fırında sıvı hale getirildi ve çözeltinin 50-60°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra üzerine 10 mg/ml EtBr'den 3 µl (Sigma, E1510) eklendi. Jel karışımının polimerize olabilmesi için 6x9 cm boyutlarına sahip jel kasete (Thermo, EC 320) dökülerek polimerize olması için soğumaya bırakıldı.

İçinde 1X TAE yürütme tamponu bulunan tanka polimerize olan jel yerleştirildi ve DNA örnekleri (5µl) 1µl 6X yükleme tamponu (Thermo Fisher, R0611) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. DNA örnekleri 1 kb marker (Hibriden, MG-LDR-1000) ile birlikte 90V sabit güçte

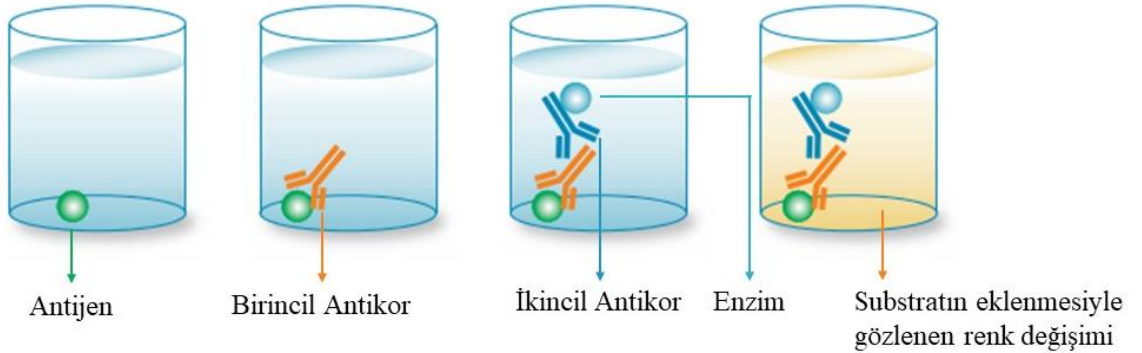
40 dakika boyunca jelde yürütüldü ve Avegene-Xlite 30R jel görüntüleme sisteminde jelin görüntüsü alındı.

DNA örneklerinin nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, nanodrop 2000) cihazı ile 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçüldü. DNA örneklerinin saflık kontrolü için A_{260}/A_{280} oranı kullanıldı. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 1.8 olan DNA örnekleri saf olarak kabul edildi. Saflığı belirlenen DNA örneklerinin konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$) temelinde aşağıda verilen Denklem 3.2'e göre cihaz tarafından hesaplandı.

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 50 \quad (3.2)$$

3.7.3. Genom Düzeyinde DNA Metilasyonu Belirlenmesi Protokolü

“MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kiti (P-1034-96, Epigentek) çalışma prensibine göre (Şekil 3.1), genom düzeyinde DNA metilasyonu ölçümünde; DNA, yüksek bir DNA afinitesine sahip olmak için özel olarak muamele edilen şerit oyuklarına bağlanır. Metillenmiş DNA fraksiyonu, yakalama ve saptama antikorları kullanılarak saptanır ve daha sonra mikropilaka spektrofotometresindeki absorbans okunarak kolorimetrik olarak ölçülür. Metillenmiş DNA yüzdesi ölçülen OD yoğunluğu ile orantılıdır. Kitin içeriği Tablo 3.7'de verilmiştir.



Şekil 3.1: Dolaylı ELISA yöntemi (Bio Rad, 2020).

Tablo 3.7: “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit (P-1034-96, Epigentek) içeriği ve saklama koşulları.

Kit İçeriği	İşlevi	Saklama Koşulları (°C)
ME1	10x Yıkama tamponu	4 °C
ME2	Bağlama çözeltisi	25 °C
ME3	Negatif kontrol (20 µg/ml)	-20 °C
ME4	Pozitif kontrol (20 µg/ml)	-20 °C.
ME5	Yakalama antikoru (1000 µg/ml)	4 °C
ME6	Saptama antikoru (400 µg/ml)	-20 °C
ME7	Güçlendirici çözelti	-20 °C
ME8	Developer çözelti	4 °C
ME9	Durdurucu çözelti	25 °C

Yıkama tamponu, 26 ml WB’in içine 234 ml distile su eklenerek pozitif kontrol (PC) standart çözeltileri ise aşağıdaki gösterildiği şekilde hazırlandı;

Tablo 3.8: “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit (P-1034-96, Epigentek) kit pozitif kontrol konsantrasyonları.

Tüp	ME4 (10 ng/µL)	1X TE	Sonuç ME4 Konsantrasyonu
1	1,0 µL	19,0 µL	0,5 ng/µL
2	1,0 µL	9,0 µL	1,0 ng/µL
3	2,5 µL	2,5 µL	5,0 ng/µL

DNA bağlama aşamasında; kullanılacak sayıda kuyucuk plaka çerçevesinden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve her kuyucuğa 80 µL ME2 bağlama çözeltisi eklendi. 1 µL ME3, 1 µL ME4 standart çözeltileri ve 100 ng örnek DNA ikişer tekrar olacak şekilde belirlenen kuyucuklara eklendi. Plaka parafilm ile kaplandı ve 37°C’de 90 dk inkübe edildi. Ardından her kuyu üç defa 150 µL seyreltilmiş ME1 ile yıkandı.

Metillenmiş DNA’yı yakalama aşamasında; ME5, 1: 1000 oranında seyreltik ME1 ile seyreltildi. Ardından her kuyucuğa 50 µL seyreltik ME5 eklenerek oda sıcaklığında 60 dk inkübe edildi. Seyreltik ME5 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL seyreltik ME1 ile 3 kez yıkandı. ME6, 1: 2000 oranında seyreltik ME1 ile seyreltildi ve her kuyucula bu seyreltik ME6’dan 50 µL eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Seyreltik ME6 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL seyreltik ME1 ile 4 kez yıkandı. Son olarak, ME7, 1: 5000 oranında seyreltik ME1 ile seyreltildi ve her kuyucuğa 50 µL seyreltik ME7

eklenerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edildi. Seyreltik ME7 kuyucuklardan döküldü ve her kuyucuk 150 µL seyreltik ME1 ile 5 kez yıkandı.

Sinyal tayini aşamasında; Her kuyucuğa 100 µL ME8 ilave edildi ve 1-10 dk karanlıkta, oda sıcaklığında inkübe edildi. Yeterli miktarda metile DNA bulunduğunda ME8 çözeltisinin rengi maviye döneceğinden örnek ve kontrol kuyularında renk değişimi dikkatlice izlendi. Pozitif kontrol kuyularındaki renk maviye döndüğünde, enzim reaksiyonunu durdurmak için her bir kuyucuğa 100 µL ME9 ilave edildi. Mikro kuyucukların bulunduğu çerçeve hafifçe sallanarak çözelti karıştırıldı ve renk reaksiyonunun tamamen durdurulmasını sağlamak için 1-2 dk beklendi. Reaksiyon durduğunda sarı renge dönüştü ve oluşan rengin şiddeti 450 nm’de mikroparka okuyuculu spektrofotometrede (“BioTek™ Eon Microplate Spectrophotometer”) ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi aşamasında ise “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kitte (P-1034-96, Epigentek) belirtildiği üzere pozitif kontrol standart çözeltileri ile hazırlanan ölçü eğrisi yardımıyla DNA örneklerindeki metilasyon oranı % olarak belirlendi.

3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile seçilen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatım analizleri gerçekleştirilebilmesi için öncelikle Bölüm 3.4’te belirtilen stres koşullarında yetiştirilen *A. thaliana* bitkilerinden RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA’ya çevrilerek RT-PZR analizlerinde kullanıldı.

3.8.1. Gen Anlatımları Analiz Edilen Genler ve Özellikleri

Bitkilerde stres koşulları altında metilasyon mekanizmaları ile ilişkileri olduğu bilinen ve daha önce Arıkan ve diğ. (2018) tarafından tuzluluk stresi sonucu anlatımları çalışılmış, bu çalışmada da *MET1* geninin hipometilasyondaki rolünün değerlendirilmesi için *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genleri seçildi. İçsel kontrol olarak seçilen *Aktin* geni ile seçilen genlerin özellikleri Tablo 3.8’de ayrıntılı olarak verildi. Genlerin anlatımlarının analizinde kullanılan primer dizileri ise Tablo 3.9’da verildi.

Tablo 3.9: Gen anlatımı çalışmalarında kullanılan genler ve özellikleri.

Genler	Özellikleri	Referans
DRM2	Asimetrik CpNpN bölgelerinin metilasyonu memelilerdeki Dnmt3 enzimi ile homolog olan ve <i>de novo</i> metilasyonundan da sorumlu DRM2 tarafından gerçekleştirilir.	Lee ve Cho, 2016
Pol IV	Bitkilere özgü bir enzimdir. RNA aracılı DNA metilasyonunda siRNAların biyosentezinden sorumludur.	Haag ve Pikaard, 2011
Pol V	siRNA'ların RNA aracılı DNA metilasyonundan etkilenen lokusları hedeflemesi için gereklidir.	Haag ve Pikaard, 2011
Aktin	Hemen hemen tüm ökaryotlarda bulunur. Hücre yapısında, hücre hareketliliğinde ve hem kas hem de kas dışı hücrelerde kasılma kuvveti oluşumunda önemli rol oynayan bir proteindir.	Rubenstein, 1990

Tablo 3.10: Gen anlatımı analizlerinde kullanılan primer dizileri.

Primerler	Dizi	Referans
DRM2	İleri 5'AAACAAAGCTGCCCCACTCG3' Geri 5'ATACGCCACAGTATCAACCTG3'	Naydenov ve diğ., 2015
Pol IV	İleri 5'GAAACGCATTCTCCACAGTTAC3' Geri 5'GCGACCCGGATTCTTTGAC3'	Naydenov ve diğ., 2015
Pol V	İleri 5'CATCCGTCTGCGTACCCTG3' Geri 5'TCAACCGTGATGAAGTCAACG3'	Naydenov ve diğ., 2015
Aktin	İleri 5'-GCCAGTGGTTCGTACAACCG-3' Geri 5'-TCATGAGGTAATCAGTAAGGTCAC-3'	Sáenz-Mata ve diğ., 2012

3.8.2. RNA İzolasyonu Deney Protokolü

A. thaliana bitkilerinden TRIzol® (Hibrigen, MG-TRZ-01-100) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. Yaklaşık 50 mg bitki örneği önceden soğutulmuş havanda sıvı azot yardımı ile parçalanarak toz haline getirildi. Ardından üzerlerine 1 ml TRIzol® eklendi ve 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere aktarıldı. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Her bir örneğe 200 µl kloroform (ISOLAB, 910.033) eklenerek tüpler 10-15 saniye altüst edilerek karıştırıldı. Kloroform ile karışmış olan örnekler 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletilip 4°C'de ve 12.000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant 1.5 ml'lik yeni Eppendorf tüplere alınarak her 1 ml TRIzol® için 500 µl izopropanol (Sigma, 24137) eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 4°C'de ve 12.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atılarak pelletler 1 ml %75 EtOH (ISOLAB, 920.026) ile yıkandı ve 4°C'de ve 7.500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında etanol döküldü ve ısıtıcı blokta (Biosan, TS-100C) RNA pelletlerinin kuruması sağlandı. Kuruyan

RNA pelletlerinin üzerine 20-50 µl nükleaz içermeyen dH₂O ilave edildi ve 37°C’lik ısıtıcı blokta 10-15 dakika tutularak RNA’ların tamamen çözünmesi sağlandı.

3.8.3. RNA’nın Kalitatif ve Kantitatif Analizi

İzole edilen RNA’ların bütünlükleri agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. %1’lik agaroz jel Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı şekilde hazırlandı ve örnekler 90 V’da 35 dakika yürütülerek jel görüntüleme sisteminde jelin görüntüsü alındı.

İzole edilen RNA’ların saflıkları ve miktarları ise Bölüm 3.6.3’te anlatıldığı gibi nanodrop spektrofotometre (Thermo scientific, Nanodrop 2000) cihazı ile ölçüldü. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA örnekleri saf olarak kabul edildi. RNA miktarlarının ölçülmesi için ise formülde çift zincirli DNA için 50 olan katsayı tek zincirli RNA için 40 olarak cihaz tarafından değiştirilerek hesaplandı.

$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} \times 40 \quad (3.3)$$

3.8.4. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA’lardan “High-Capacity cDNA Reverse Transcription” kiti (Thermo Scientific, 4368814) kullanılarak üreticinin önerdiği protokole göre PZR cihazında (BIO-RAD, T100 Thermal Cycler) cDNA sentezlendi. Sentez reaksiyonunun bileşenleri Tablo 3.10’da koşulları ise Tablo 3.11’de verildi.

Tablo 3.11: cDNA Sentez reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Hacim
10x RT Buffer	2 µl
25x dNTP (100 mM)	0.8 µl
10x Random Primers	2 µl
Ters Transkriptaz (50 U/µL)	1 µl
Kalıp RNA	1000ng
ddH ₂ O	20 µl tamamlanır

Tablo 3.12: cDNA sentez reaksiyonunun koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Zaman
Primer Bağlanması	25°C	10 dk
cDNA sentezi	37°C	120 dk
Enzim inaktivasyonu	85°C	5 dk
Saklama	4°C	∞

3.8.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk olarak gen anlatımları incelenecek olan genlerin optimum bağlanma koşulları belirlendi. Ardından “2X SYBR Green master mix” (Hibrigen, 0220-UB-775) kullanılarak gerçek zamanlı PZR yapıldı. Yapılan analizlerde kullanılan PZR bileşenleri Tablo 3.12’de reaksiyon koşulları ise Tablo 3.13’te verildi. GZ-PZR reaksiyonunun bileşenleri.

Tablo 3.13: GZ-PZR reaksiyonunun bileşenleri.

Bileşen	Hacim
“2X SYBR Green Master Mix”	12.5 µl
Primer (10 µM)	0.5 µl
cDNA	3 µl
Nükleaz İçermeyen dH ₂ O	25 µl’ye tamamlanır

Tablo 3.14: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu koşulları.

	Sıcaklık	Zaman
Bekleme	50°C	60’’
Denatürasyon	94°C	30’’
Primer Bağlanma	61°C (<i>Aktin</i> , <i>Pol IV</i> ve <i>Pol V</i>) 65°C (<i>DRM2</i>)	40 Döngü 30’’
Uzama	72°C	30’’
Bekleme	40°C	30’’

“LightCycler Nano” (Roche) cihazı kullanılarak yapılan Gerçek zamanlı PZR analizlerinden elde edilen Ct değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile rölatif olarak değerlendirilerek anlatım katsayıları belirlendi.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

A. thaliana met1-7 ve *met1-3* bitkileriyle yapılan morfolojik deneyler, “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit (p-1034-96, EpiGentek) ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve gen anlatımı analizleri istatistiksel olarak GraphPad Prism® 7.0 bilgisayar programı kullanılarak çift yönlü ANOVA (“Two-Way-AVOVA- Ordinary three data sets”) Tukey testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. Morfolojik deneyler 3 biyolojik tekrarlı, metilasyon seviyesi analizi ve gen anlatımı analizleri ise 3 biyolojik, 2 teknik tekrarlı olarak yapıldı.



4. BULGULAR

4.1. TOHUMLARIN ÇİMLENDİRİLMESİ

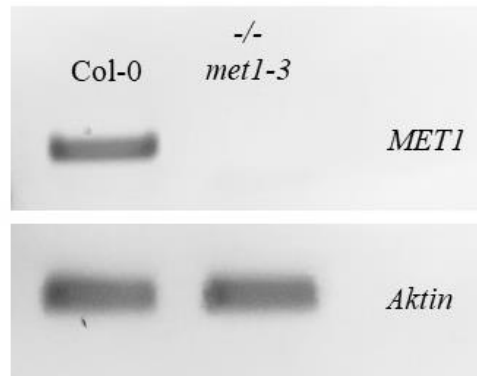
Bölüm 3.3'te anlatıldığı gibi yüzey sterilizasyonu yapılan *Arabidopsis thaliana* tohumları çimlenmeleri için MS besiyeri içeren Petri kaplarına ekilerek bitki büyüme kabininde bırakıldı. Tohumların ekimleri yapıldıktan yedi gün sonra çimlenmeye başladığı gözlemlendi ve stres besiyerlerine aktarıldı. Şekil 4.1'de Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinin kontrol grubunu vermiştir.



Şekil 4.1: Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin MS besiyerinde 14 günlük kontrol grubu (0 mM NaCl) (Bar: 1cm).

4.2. MUTANTLARIN ANALİZİ

met1-3 mutantlarından izole edilen RNA'lar ile Bölüm 4.5.1'de anlatılacağı gibi cDNA sentezlendi ve pozitif kontrol olarak seçilen Aktin geni ile birlikte RT-PZR yapıldı. MET1 gen ürünleri Şekil 4. 2'de gösterildiği PZR sonrası agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi.



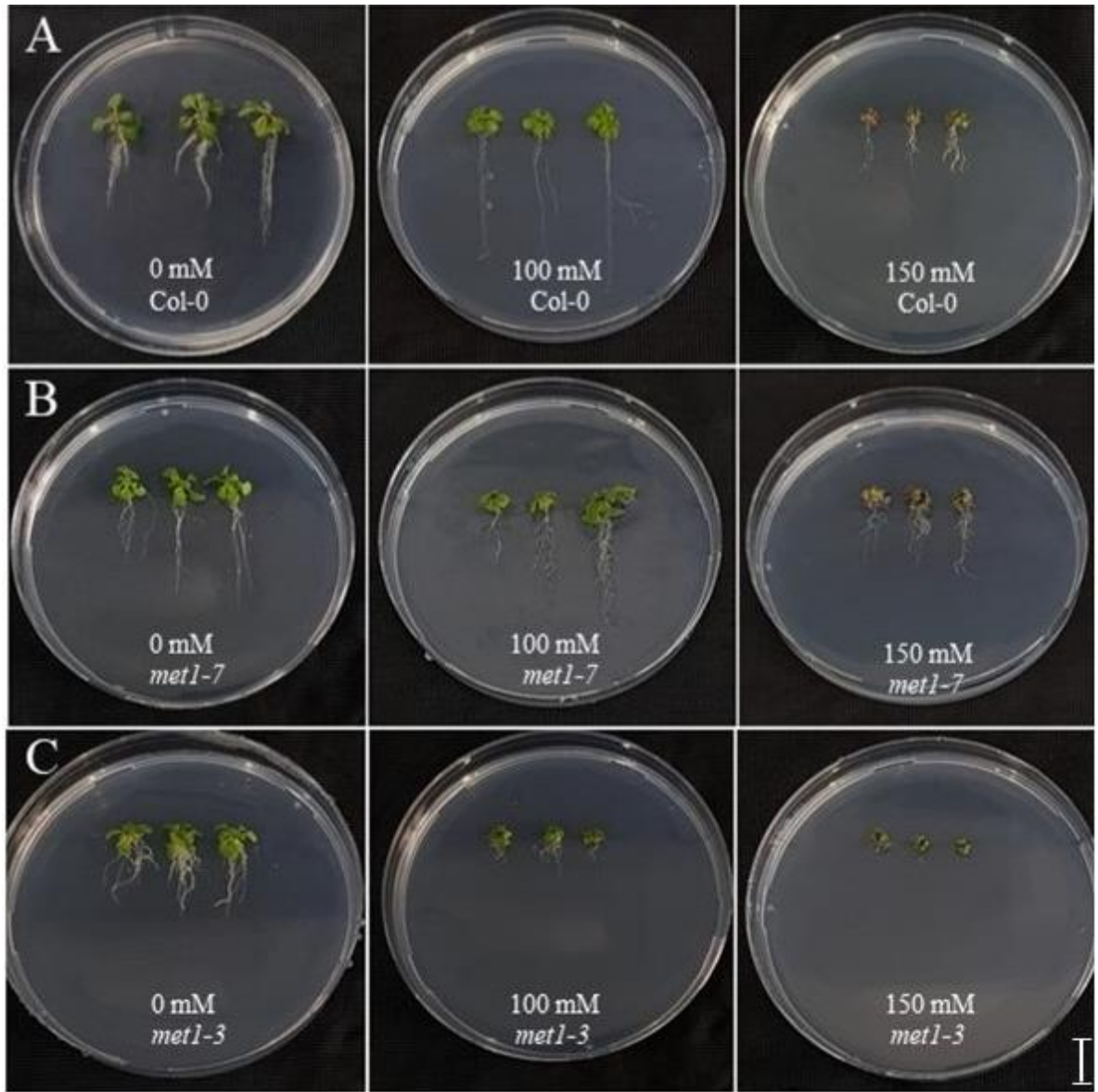
Şekil 4.2: *met1-3* mutantında *MET1* gen ürünlerinin kontrolü.

met1-7 mutantının *MET1* transkript kontrolü İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen ve laboratuvarımızda yürütülen FBA-2019-33713 numaralı projede yapılmış ve *met1-7* homozigotları oldukları belirlenmiştir.

4.3. STRES UYGULAMASININ MORFOLOJİK ETKİLERİ

4.3.1. Bitki Yaprak Sayısı, Yaprak Yüzey Alanı ve Kök Boyundaki Değişimler

Yedi günlük Col-0, *met1-7* ve *met1-3* bitkileri 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl içeren besiyerine aktarıldı. Yedi gün boyunca stres besiyerlerinde büyütülen bitkiler morfolojik olarak değerlendirilerek yaprak sayısı, yaprak yüzey alanı, kök boyu değerlendirildi. Şekil 4.3'te tuz uygulaması sonrasında Col-0, *met1-7* ve *met1-3* bitkilerin genel görünümü verilmiştir.

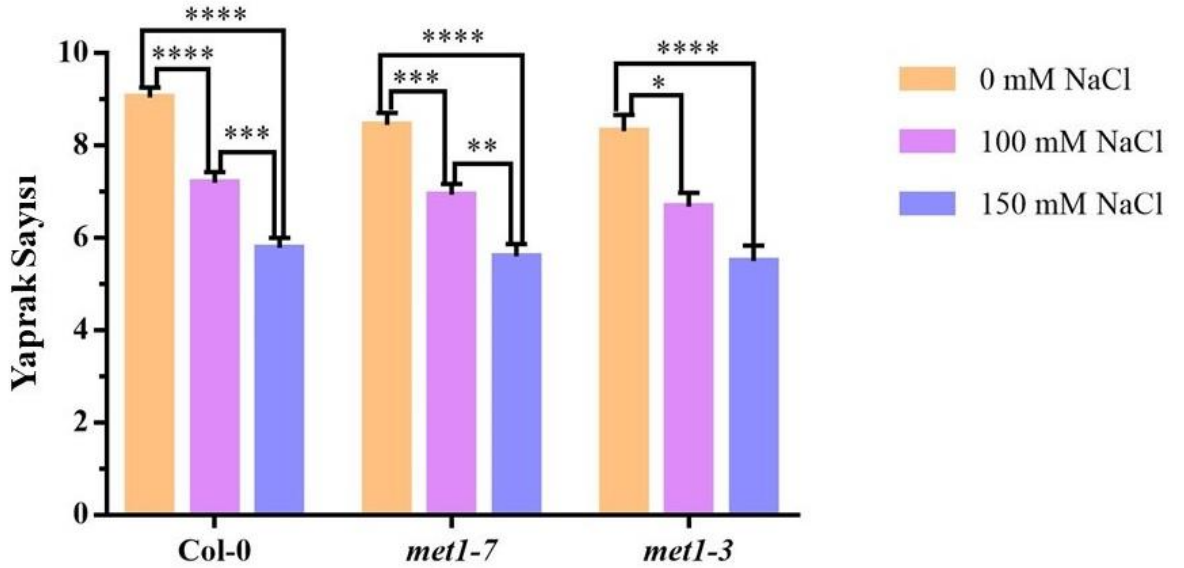


Şekil 4.3: Yedi gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarında strese maruz bırakılan *A. thaliana* bitkileri. A- Kontrol grubu Col-0 bitkilerini, B- *met1-7* mutant bitkilerini, C- *met1-3* mutant bitkilerini temsil etmektedir (Bar: 1cm).

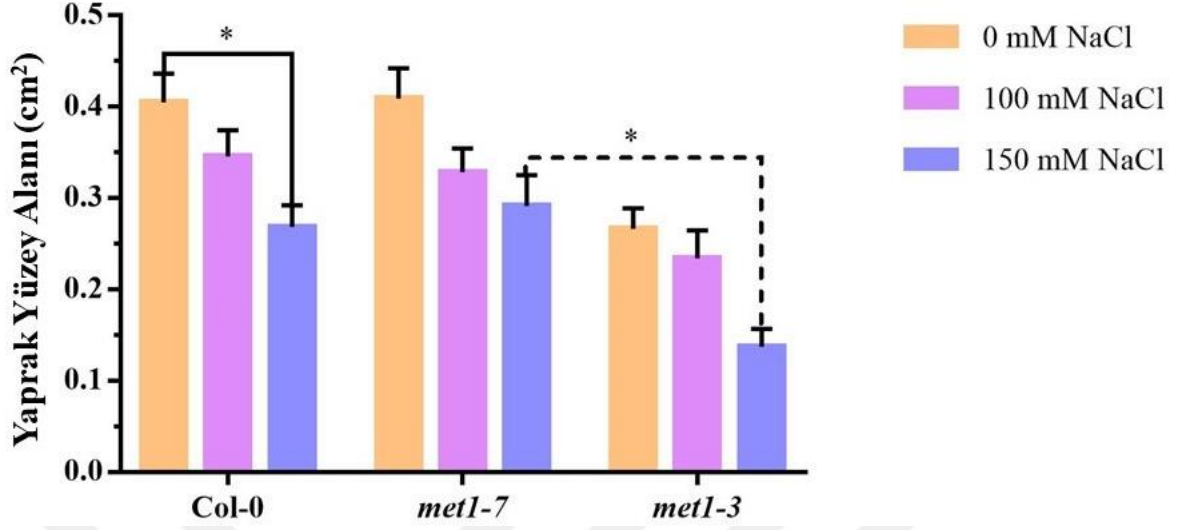
Şekil 4.3'te artan NaCl konsantrasyonunun Arabidopsis bitkilerinin morfolojisini olumsuz olarak etkilediği net bir şekilde görülmektedir. Yapılan morfolojik analizlerde yaprak sayısına bakıldığında kontrol grubu Col-0 ve *met1-7*, *met1-3* epigenetik mutantlarına uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarının gruplar arasında anlamlı bir değişime neden olmadığı ancak *met1-3* mutantına uygulanan 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonları hariç tüm bitki ve koşullarda yaprak sayılarının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Yaprak yüzey

alanlarının sadece Col-0 bitkisine uygulanan 0 ve 150 mM NaCl konsantrasyonu ile *met1-7* ve *met1-3* epigenetik mutantlarının 150 mM konsantrasyonları arasında anlamlı olarak küçüldüğü görülmüştür. Kök uzunluğunda; *met1-7*'nin kontrol grubu ile tuz uygulaması yapılan bitkileri arasında ve *met1-3*'ün kontrol grubu ile 100 mM NaCl konsantrasyonu uygulanan bitkileri arasında anlamlı olarak kısılmadığı diğer grupların kendi aralarında anlamlı olarak kısıldığı gözlenmiştir. *met1-7*'nin kontrol grubu ile Col-0 kontrol grubu arasında, *met1-3*'e uygulanan her NaCl konsantrasyonu ile Col-0'nun NaCl konsantrasyonları arasında ve mutantların kendi aralarında 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonları arasında kök uzunluğunun anlamlı olarak kısıldığı görülmüştür.

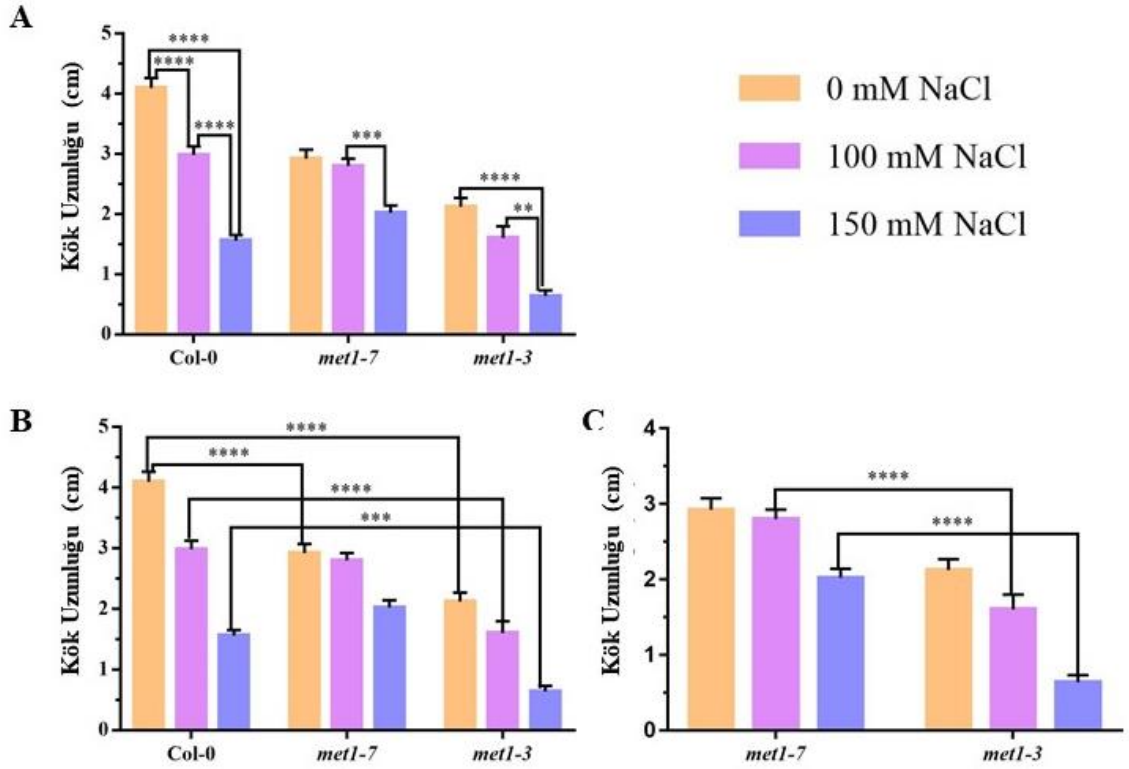
Arabidopsis thaliana bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonları sonrasında meydana gelen morfolojik değişimleri belirlemek için bitkilerin yaprak sayıları, yaprak yüzey alanları ve kök uzunlukları GraphPad Prism® 7.0 bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler çift yönlü ANOVA ("Two Way AVOVA-Ordinary three data sets") Tukey testi ile yapıldı. Şekil 4.4, Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilen grafikler çizildi. $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.4: *Arabidopsis thaliana* bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında yaprak sayısında meydana gelen anlamlı değişimler.



Şekil 4.5: *Arabidopsis thaliana* bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında yaprak yüzey alanında (cm²) meydana gelen anlamlı değişimler.



Şekil 4.6: *Arabidopsis thaliana* bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarında kök uzunluğunda (cm) meydana gelen anlamlı değişimler. A- Col-0, *met1-7* ve *met1-3* gruplarının kendi aralarında meydana gelen; B- *met1-7* ve *met1-3* mutantları ile Col-0 arasında meydana gelen; C- *met1-7* ve *met1-3* mutantları arasında meydana gelen anlamlı değişimleri göstermektedir.

Grafik verilerine ek olarak yapılan morfolojik analizlerin değerlerinin ortalamaları ve standart hataları Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.1: Farklı NaCl konsantrasyonlarının *A. thaliana* Col-0 bitkisi üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.

NaCl (mM)	Yaprak Sayısı	Yaprak Yüzeyi Alanı (cm ²)	Kök Uzunluğu (cm)
0	9,047 $\pm$ 0,216	0,405 $\pm$ 0,032	4,097 $\pm$ 0,169
100	7,195 $\pm$ 0,235	0,346 $\pm$ 0,029	2,984 $\pm$ 0,141
150	5,787 $\pm$ 0,215	0,269 $\pm$ 0,020	1,560 $\pm$ 0,090

Tablo 4.2: Farklı NaCl konsantrasyonlarının *A. thaliana met1-7* mutanıtı üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.

NaCl (mM)	Yaprak Sayısı	Yaprak Yüzeyi Alanı (cm ²)	Kök Uzunluğu (cm)
0	8,455 $\pm$ 0,261	0,409 $\pm$ 0,033	2,922 $\pm$ 0,152
100	6,936 $\pm$ 0,238	0,328 $\pm$ 0,026	2,800 $\pm$ 0,124
150	5,605 $\pm$ 0,265	0,292 $\pm$ 0,034	2,023 $\pm$ 0,120

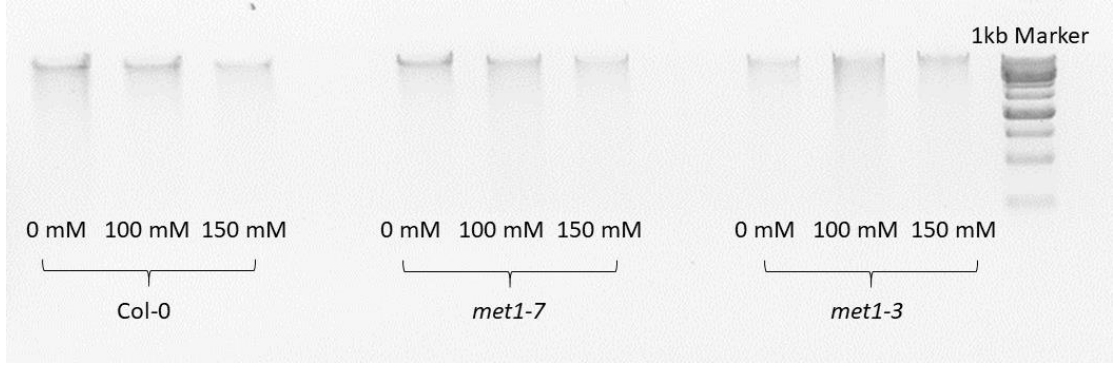
Tablo 4.3: Farklı NaCl konsantrasyonlarının *A. thaliana met1-3* mutanıtı üstündeki morfolojik etkilerinin belirlenmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.

NaCl (mM)	Yaprak Sayısı	Yaprak Yüzeyi Alanı (cm ²)	Kök Uzunluğu (cm)
0	8,313 $\pm$ 0,362	0,266 $\pm$ 0,023	2,124 $\pm$ 0,144
100	6,682 $\pm$ 0,297	0,234 $\pm$ 0,031	1,600 $\pm$ 0,197
150	5,500 $\pm$ 0,336	0,137 $\pm$ 0,020	0,640 $\pm$ 0,092

4.4. GENOM DÜZEYİNDE DNA METİLASYON ANALİZİ

4.4.1. DNA İzolasyonu

“MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit ile (Epigentek, P-1034-96), genom düzeyinde DNA metilasyonunun ölçümü için NaCl uygulaması yapılan *A. thaliana* bitkilerinden DNA izolasyonu yapılarak bütünlükleri Şekil 4.7’de gösterildiği gibi 1 kb’lik marker ile agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. A₂₆₀/A₂₈₀ oranı $\approx$ 1.8 olan DNA’lar saf olarak kabul edildi ve deneylerde kullanıldı.

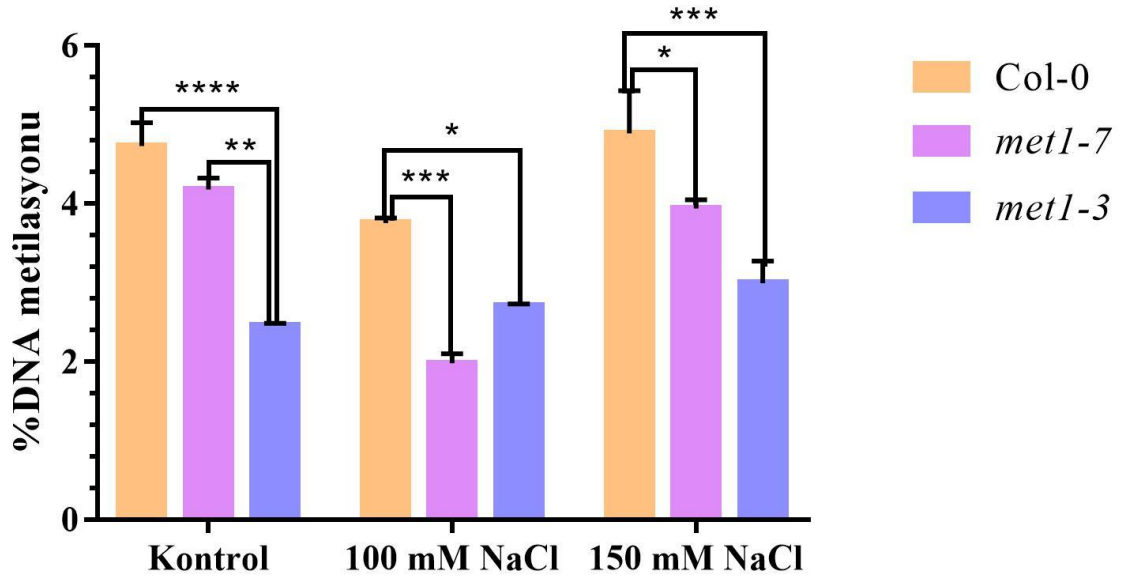


Şekil 4.7: 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen DNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

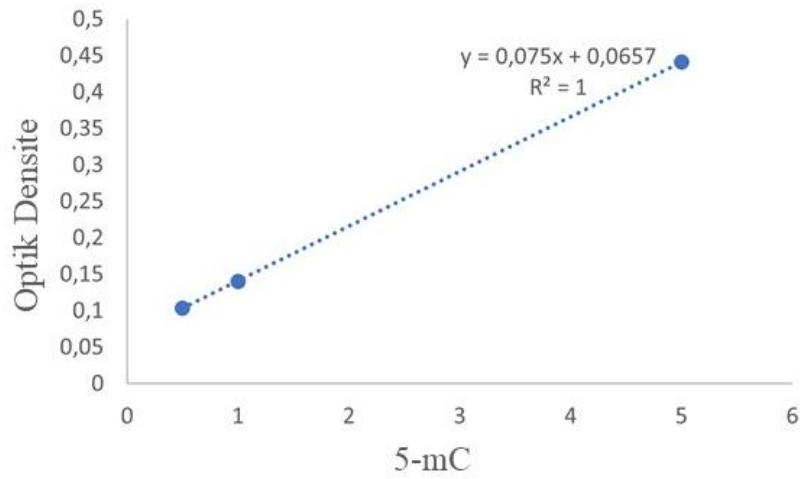
4.4.2. ELISA Yöntemi ile Genom düzeyinde DNA Metilasyonunun Belirlenmesi

Genom düzeyinde 5-mC içeriğinin kantitatif tayini “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kit ile gerçekleştirildi. Bölüm 3.6’da anlatıldığı şekilde %5-mC miktarı kit ile temin edilen pozitif kontroller ile hazırlanan standart eğri üzerinden hesaplandı.

7 gün boyunca 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinin %5 mC seviyeleri Şekil 4.8’de ve bu analizlerde kullanılan 5-mC standartlarının kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.9’da verilmiştir. Yapılan analizler sonucu uygulanan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak bitki grupları arasında hipometilasyon olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan her NaCl konsantrasyonunda Col-0’a oranla mutantların daha az metilasyon durumunda olduğu görülmüştür. 0 mM NaCl uygulamasında *met1-7*’e kıyasla *met1-3* mutantında daha az metilasyon olduğu ancak uygulanan NaCl konsantrasyonları arasında *met1-3*’te anlamlı bir değişim olmazken *met1-7*’de 0 ve 100 mM arasında hipometilasyon oluştuğu ardından 100 ve 150 mM konsantrasyonları arasında hipermetilasyon oluştuğu görülmüştür.



Şekil 4.8: Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin NaCl uygulamasına göre DNA metilasyonu değişiminin % olarak gösterilmesi.



Şekil 4.9: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan 5-mC standartlarının kalibrasyon eğrisi.

Grafik verilerine ek olarak yapılan DNA metilasyon değerlerinin (%) ortalamaları ve standart hataları Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4: Farklı NaCl konsantrasyonlarının Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkileri üzerindeki DNA metilasyonu değişiminin yüzde (%) olarak gösterilmesi. Her bir değer 3 deneyin ortalamasını ve standart hatayı ($\pm$ SH) göstermektedir.

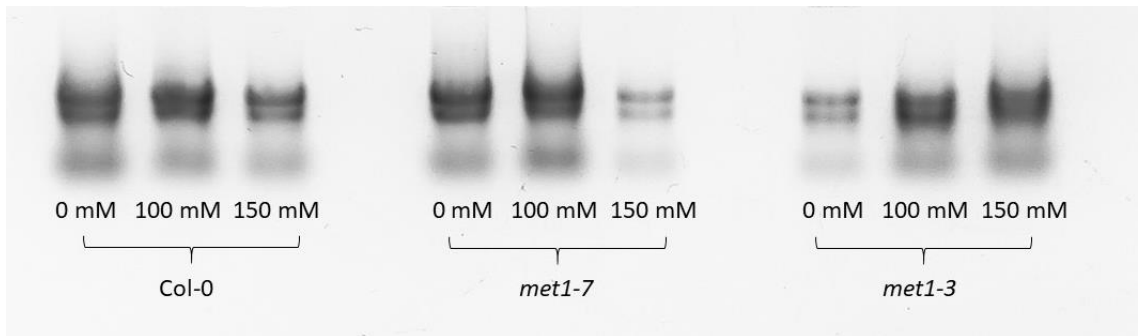
NaCl (mM)	Col-0	<i>met1-7</i>	<i>met1-3</i>
0	4,726 $\pm$ 0,296	4,176 $\pm$ 0,146	2,452 $\pm$ 0,032
100	3,752 $\pm$ 0,068	1,979 $\pm$ 0,116	2,700 $\pm$ 0,027
150	4,888 $\pm$ 0,541	3,936 $\pm$ 0,114	2,994 $\pm$ 0,281

4.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

Genomik metilasyon analizleri gerçekleştirilen Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinin epigenetik mekanizmalarda yer aldıkları bilinen ve daha önce Arıkan ve diğ., (2018) tarafından Col-0'da çalışılmış olan *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin stres koşullarındaki anlatım düzeyleri analiz edildi.

4.5.1. Toplam RNA Analizi

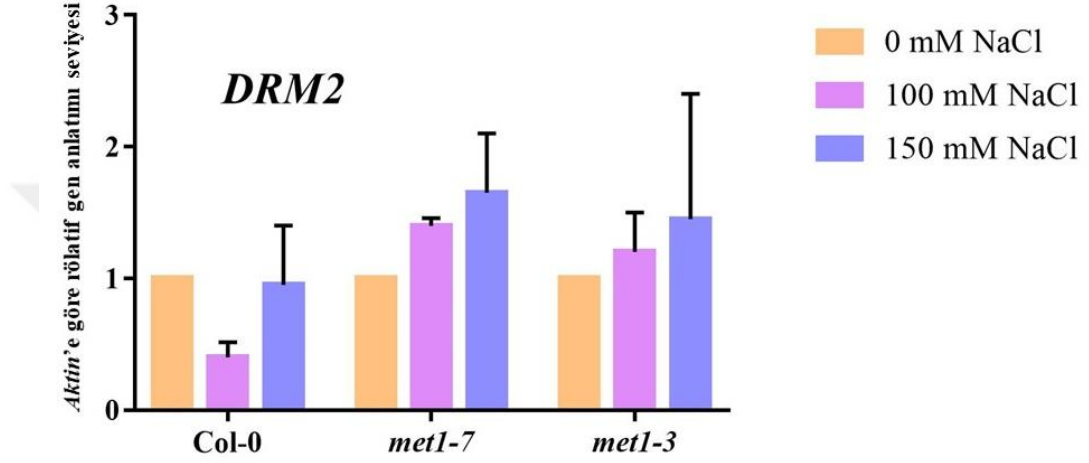
Gen anlatım düzeylerinin belirlenebilmesi için 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinin RNA izolasyonu yapılarak bütünlükleri Şekil 4.10'da gösterildiği gibi agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. A_{260}/A_{280} oranı ≈ 2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi ve GZ PZR reaksiyonlarında kalıp olmak üzere RNA'lardan cDNA sentezlendi.



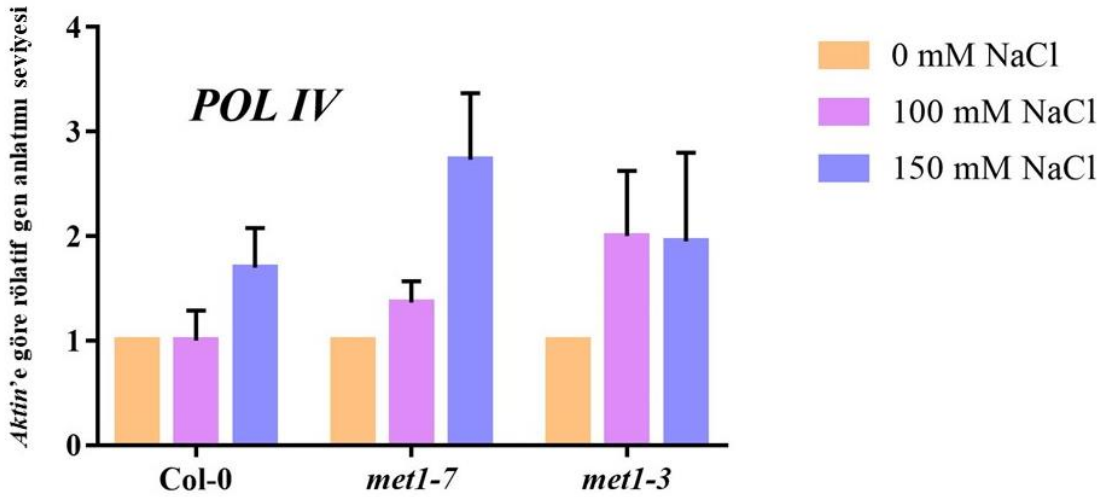
Şekil 4.10: 0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü.

4.5.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizleri

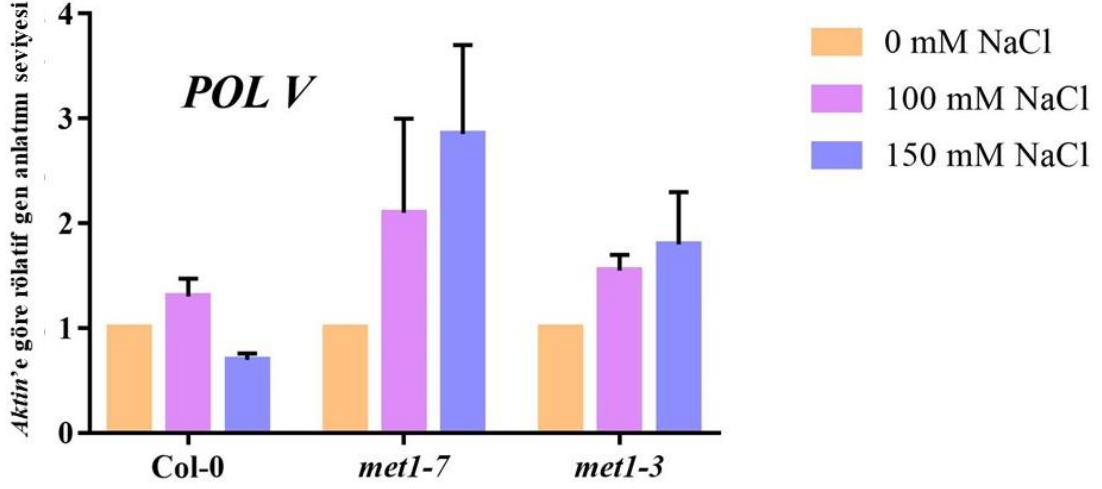
0, 100 ve 150 mM konsantrasyonlarında NaCl stresine maruz bırakılan *A. thaliana* Col-0, *met1-7* ve *met1-3* bitkilerinde seçilen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatım düzeyleri GZ-PZR reaksiyonu ile analiz edildi. Gen anlatımlarının değişimi Şekil 4.11, 4.12 ve 4.13'te verilen grafiklerde özetlenmiştir.



Şekil 4.11: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin *DRM2* gen anlatımının *Aktin*'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.



Şekil 4.12: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin *Pol IV* gen anlatımının *Aktin*'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.



Şekil 4.13: GZ-PZR analizleri sonucunda Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *Arabidopsis thaliana* bitkilerinin *Pol V* gen anlatımının *Aktin*'e göre rölatif gen anlatımı seviyelerinin grafiksel gösterimi.

Farklı NaCl uygulamalarına göre gen anlatımı değişiminin rölatif katsayıları Tablo 4.5'te verilmiştir. *DRM2* geninin *Aktin*'e göre 100mM NaCl uygulanmasında *Arabidopsis* Col-0 bitkisinde anlatımının 0,4 oranında azaldığı, *met1-7* ve *met1-3*'te sırasıyla 1,4 ve 1,2 oranında arttığı; 150 mM konsantrasyonda ise Col-0'da değişime sebep olmazken *met1-7* ve *met1-3*'te sırasıyla 1,65 ve 1,45 oranında arttığı görülmüştür. *Pol IV* geninin *Aktin*'e göre olan değişiminde 100 mM NaCl uygulamasının Col-0, *met1-7* ve *met1-3* gruplarında sırasıyla 1 - 1,37 ve 2 oranında; 150 mM NaCl uygulamasında ise sırasıyla 1,7 - 2,73 ve 1,95 oranında artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Son olarak 100 mM NaCl uygulamasının *Pol V* geninin anlatımında Col-0, *met1-7* ve *met1-3* gruplarında sırasıyla 1,3 – 2,1 ve 1,55 oranlarında artışa neden olduğu 150 mM NaCl uygulamasının ise Col-0 bitkisinde 0,7 oranında bir azalmaya sebep olurken, mutantlarda sırasıyla 2,85 ve 1,8 oranında artışla sonuçlandığı görülmüştür.

Tablo 4.5: Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinde NaCl uygulaması sonrasında *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* gen anlatımlarındaki değişimlerin *Aktin* genine göre rölatif katsayıları.

NaCl (mM)	<i>DRM2</i>			<i>Pol IV</i>			<i>Pol V</i>		
	Col-0	<i>met1-7</i>	<i>met1-3</i>	Col-0	<i>met1-7</i>	<i>met1-3</i>	Col-0	<i>met1-7</i>	<i>met1-3</i>
Kontrol	1	1	1	1	1	1	1	1	1
100	0,4	1,4	1,2	1	1,37	2	1,3	2,1	1,55
150	0,95	1,65	1,45	1,7	2,73	1,95	0,7	2,85	1,8

NaCl stres uygulamasının MET1 enziminin sentezlenmediği *null* mutantlar olan *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerinde Col-0 bitkisine oranla metilasyonda görevli *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımında daha fazla artışa sebep olduğu gözlenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Stres organizmanın büyümesi, gelişmesi ve çoğalmasını olumsuz yönde etkileyen en önemli faktördür. Bu olumsuz etkiyi en aza indirmek için organizmalar üç farklı strateji geliştirirler; tolerans, direnç ve kaçma. Hareketsiz yaşam tarzları nedeniyle karşılaştıkları biyotik ve abiyotik streslere bitkilerin verdiği cevap yalnızca tolerans ve direnç mekanizmalarıyla sınırlıdır. Bu sebeple çeşitli moleküler mekanizmalar geliştirmişlerdir (Boyko ve Kovalchuk, 2008). Bitkilerin en çok karşılaştığı abiyotik streslerden biri olan toprak tuzluluğu, mahsul verimini sınırladığı ve önceden işlenmemiş arazinin kullanımını kısıtladığı için gıda üretiminde önemli kayıplara sebep olur. Aynı zamanda tarımsal üretimin kalori ve beslenme potansiyelini de sınırlar (Yokoi ve diğ., 2002). Tüm bu sorunların çözülmesi için bitkilerin strese karşı geliştirdikleri moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekir.

Yapılan çalışmalarda küçük boyutları, kolay manipüle edilebilmeleri, kısa üretim süreleri ve fazla döl vermeleri gibi özelliklere sahip model organizmalar kullanılır. Araştırmaların model organizmalar üzerinden yürütülmesinin zaman ve maliyet açısından pek çok avantajı vardır. Bitkiler üzerinde yapılan araştırmalarda en hızlı şekilde sonuç alıp bu sonuçların tarımsal öneme sahip bitkilerin geliştirilebilmesi için *Arabidopsis thaliana* sıklıkla model organizma olarak kullanılmaktadır.

Gen anlatımının düzenlenmesi, gen susturması ve genom stabilitesinin korunması gibi pek çok önemli biyolojik sürecin DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda DNA metilasyon kusurlarının bitkilerde morfolojik kusurlara yol açtığı bilinmektedir (Law ve Jacobsen, 2010; Kong ve diğ., 2018).

Bu tez çalışmasında ise NaCl uygulamasının; CG dizilerinin metillenmesinden sorumlu olduğu bilinen MET1 enziminin sentezlenmediği *A. thaliana null* mutantlar olan *met1-7* ve *met1-3* bitkilerinde sebep olduğu morfolojik değişimlere bakılmış ve genomik düzeydeki metilasyon farklılıkları incelenmiştir. Aynı zamanda metilasyonda görevli olduğu bilinen *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımları analiz edilmiştir.

Toprak tuzluluğu suda çözünebilen iyonların (Na^+ , Ca^+ , Mg^{+2} , Cl^- , SO_4^{-2} , HCO_3^-) birikmesiyle oluşur. Tuz stresi, mahsul üretimi için en önemli sınırlayıcı faktörlerden biridir. Tuz stresine maruz kalmak bitkilerde; çimlenme ortamının düşük ozmotik potansiyeli nedeniyle tohumların

su emilimini değiştirir, nükleik asit metabolizmasında görevli enzimlerinin aktivitelerini değiştiren toksisiteye neden olur, hormonal dengeyi bozar ve tohum üretimini azaltır (Parihar ve diğ., 2015). Chartzoulakis ve Klapaki (2000) sera biberine ("*Capsicum annuum* L.") 0, 10, 25, 50, 100 ve 150 mM NaCl uyguladıkları çalışmalarında; 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonlarının bitkilerin çimlenme oranında, çimlendikten sonra ise kök uzunluklarında kayda değer bir azalmaya sebep olduğunu, fide yüksekliğinin ve yaprak yüzey alanının ise 10 mM'den daha yüksek konsantrasyonlarda önemli ölçüde azaldığını ancak kuru ağırlığın değişmediğini belirtmişlerdir.

Bitkilerde sitozin metilasyonundan sorumlu temel enzimler MET1, CMT3 ve DRM2 enzimleridir. Bu tez çalışmasında bitkilerde CG dizilerini metilleyen ve genom düzeyindeki metilasyonun %80-%90'ından sorumlu olduğu bilinen *MET1* geninin *null* mutantları olan *met1-7* ve *met1-3* kullanılmıştır. *met1-3* mutantının analizi için MET1 gen bölgesine giren T-DNA bölgesine göre tasarlanan primerler kullanılarak RT-PZR ile kontrol edilmiştir. *met1-7* mutantının analizi ise aynı şekilde İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen ve laboratuvarımızda yürütülen FBA-2019-33713 numaralı projede yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında bir haftalık Col-0, *met1-7* ve *met1-3* *A. thaliana* bitkilerine 7 gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl uygulanmış ve morfolojik değişimleri yaprak sayısı, yaprak yüzey alanı (cm²) ve kök uzunluğu (cm) olarak incelenmiştir. Yapılan morfolojik analizler sonucunda yaprak sayısında kontrol grubu olan Col-0 ve *met1-7*, *met1-3* bitkilerine uygulanan farklı NaCl konsantrasyonlarının anlamlı bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir. Ancak, *met1-3* mutantına uygulanan 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonları hariç tüm bitki ve koşullarda yaprak sayılarının anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Yaprak yüzey alanlarının sadece Col-0 bitkisine uygulanan 0 ve 150 mM NaCl konsantrasyonu ile *met1-7* ve *met1-3* bitkilerinin 150mM konsantrasyonları arasında anlamlı olarak küçüldüğü grlmştir. Kök uzunluğunda; *met1-7*'nin kontrol grubu ile tuz uygulaması yapılan bitkileri arasında ve *met1-3*'n kontrol grubu ile 100 mM NaCl konsantrasyonu uygulanan bitkileri arasında anlamlı olarak kısalmadığı diğer grupların kendi aralarında anlamlı olarak kısaldığı gözlenmiştir. *met1-7*'nin kontrol grubu ile Col-0 kontrol grubu arasında, *met1-3*'e uygulanan her NaCl konsantrasyonu ile Col-0'nun NaCl konsantrasyonları arasında ve mutantların kendi aralarında 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonları arasında kök uzunluğunun anlamlı olarak kısaldığı grlmştir. Bütün morfolojik analizler istatistiksel olarak değerlendirilerek $p < 0.05$

seviyesinde anlamlı oldukları belirlenmiştir. Elde ettiğimiz verilere paralel olarak Arıkan ve diğ. (2018)'de Col-0 bitkisine uygulanan tüm NaCl konsantrasyonlarında, yaprak sayısının anlamlı olarak azaldığını; yaprak yüzey alanının sadece 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonu arasında anlamlı olarak küçülmediğini ancak 0-100 mM ve 0-150 mM arasında anlamlı olarak küçüldüğü; kök uzunluğunun ise yaprak sayısında olduğu gibi tüm NaCl konsantrasyonlarında anlamlı olarak kısaldığını bildirmiştir. Yapılan morfolojik analizler sonucu *met1-3* mutantının *met1-7* mutantına kıyasla tuz stresine daha duyarlı olduğu görülmüştür. Baek ve diğ. (2011)'de benzer şekilde *met1-3* mutantının NaCl'ye aşırı duyarlı olduğunu, kök büyümesinde tuza duyarlı bir fenotip gözlemlediklerini ve bu durumun AtHKT1 promotöründeki varsayılan küçük RNA hedef bölgesindeki metilasyon kaybına bağlanabileceğini belirtmiştir. İlave olarak, bu çalışma kapsamında laboratuvarımızda yaptığımız kendi kendine döllenme ile tohum alma çalışmaları *met1-7* mutantında sonuç verirken, *met1-3* mutantında sonuçsuz kalmıştır.

Epigenetik faktörler, DNA dizilerini değiştirmeden gen ifadesinin değişimine neden olup bu durumun hem kısa vadeli (mitotik) hem de uzun vadeli (mayotik) kalıtımına katkıda bulunabilir. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları, siRNA'lar, paramutasyon, nükleozom düzenlemesi ve diğerleri gibi epigenetik kalıtımda etkili olan için çeşitli mekanizmalar bilinmektedir. Boyko ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada tuz stresine maruz bırakılan Arabidopsis bitkilerinin döllerinde Arıkan ve diğ. (2018)'in aksine hipermetilasyonla karşılaştıklarını bildirmişlerdir. Bitkilerde DNA metilasyonu birçok epigenetik olgunun düzenlenmesinde rol oynar. Bunlar arasında transpozonların ve transgenlerin transkripsiyonel susturulması, stres koşullarına karşı savunma, çiçeklenme zamanı tohum oluşması ve yaprak morfolojisini kontrol eden genlerin susturulması gelmektedir (Chen ve diğ., 2010; Bilichak ve diğ., 2012; Yao ve diğ., 2012). Örneğin; hipometilasyon Arabidopsis'te çiçeklenmede gecikmeye (Jones ve Sung, 2014), elmada ise küçük meyve oluşumuna neden olurken (Daccord ve diğ., 2017); hipermetilasyon portakal meyvesinin gelişiminde ve olgunlaşmasında kritik bir rol oynar (Huang ve diğ., 2019). Bununla birlikte metilasyon seviyelerinin bitki dokularının farklı aşamalarında da farklılık gösterdiği bilinmektedir. Şeftalide, genç fidelerin sürgün apikal meristemi, yetişkinlere göre daha fazla metilasyona uğrarken (Bitonti ve diğ., 2002); havuçta yetişkin yaprakların metilasyon seviyesi fidelerden daha yüksektir. Ancak fidelerin köklerinde de yetişkinlere göre daha fazla metilasyon meydana gelir (Palmgren ve diğ., 1991).

Bu tez çalışmasında NaCl uygulamasının *A. thaliana* *MET1* geninin *null* mutantları olan *met1-7* ve *met1-3* polimorfizmleri üzerindeki metilasyon değişimleri araştırılmış ve genom düzeyinde 5-mC içeriğinin kantitatif tayini için dolaylı ELISA tabanlı “MethylFlash™ Methylated DNA Quantification” kiti kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucu uygulanan NaCl konsantrasyonuna bağlı olarak bitki grupları arasında hipometilasyon olduğu gözlemlenmiştir. Uygulanan her NaCl konsantrasyonunda Col-0’a oranla mutantların daha az metillenmiş durumda olduğu görülmüştür. 0 mM NaCl uygulamasında *met1-7*’ye kıyasla *met1-3* mutantının daha az metillenmiş durumda olduğu ancak uygulanan 0, 100 ve 150 mM NaCl konsantrasyonları arasında *met1-3*’te anlamlı bir değişim olmazken *met1-7*’de 0 ve 100 mM arasında hipometilasyon olduğu ardından 100 ve 150 mM konsantrasyonları arasında hipermetilasyon olduğu görülmüştür. Karşılaştığımız bu durum *met1-7* mutantında tuz stresinde farklı mekanizmaların devreye girmiş olabileceğini düşündürmektedir. Aynı şekilde verilerimize paralel olarak Arıkan ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada *A. thaliana* Col-0 bitkisine 7 gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl uygulanmasının genom düzeyinde hipometilasyona yol açtığını belirtilmiştir. Zhong ve diğ. (2009) ise ekmek buğdayına (“*Triticum aestivum* L.”) 5 gün boyunca 0, 100 ve 150 mM NaCl uygulanması sonucu genomda yer yer hipermetilasyona rastlansa da tuz stresinin hipometilasyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Diğer birçok hücresel sinyal yolağı gibi, tuz stresine tolerans tepkilerinin de gen anlatımlarında pozitif düzenleme kadar negatif düzenleme etkisinin olması beklenir. Tuza toleranslı mutantlar, normalde bazı tolerans yanıtlarını baskılayan negatif düzenleyici mekanizmaları ortaya çıkarma potansiyeline sahiptir (Zhu, 2000). DRM2 enzimi siRNA’lar ile birlikte bazı lokuslarda asimetrik CHH metilasyonun sürdürülmesi ve diğer DNA metilasyonlarının başlatılması için gereklidir (Johnson ve diğ., 2008). *DRM2* geninin 100 mM NaCl uygulanmasında Arabidopsis Col-0 bitkisinde anlatımının 0,4 oranında azaldığı, *met1-7* ve *met1-3*’te sırasıyla 1,4 ve 1,2 oranında arttığı; 150 mM konsantrasyonda ise Col-0’da değişime sebep olmazken *met1-7* ve *met1-3*’te sırasıyla 1,65 ve 1,45 oranında arttığı görülmüştür. Elde ettiğimiz verilerle paralel olarak Gao ve diğ. (2020) tarafından yapılan çalışmada 150 mM NaCl stresinde *DMR2*’nin gen anlatımının *Ginkgo biloba*’da düştüğü ancak nohut köklerinde arttığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, bilindiği gibi *MET1* geninin aktif olmamasının hipometilasyonda etkisi olduğunu ve bu durumda *met1-7*, *met1-3* mutantlarında *DRM2* ilişkili *de novo* metilasyonun daha etkin bir rol aldığını düşündürmektedir.

Bitkilerde DNA metilasyonu Pol IV ve Pol V enzimleri sayesinde RNA aracılı (RdDM) şekilde gerçekleşebilir. *De novo* metillenecek hedef bölgeler, karmaşık çok aşamalı bir süreçte RNA'ya yönelik DNA metilasyonunda (RdDM), ilgili lokusların parçalarına tamamlayıcı olan 24 nükleotid uzunluğunda küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA'lar) yardımıyla tanınır (Ashapkin ve diğ., 2016). Bu tez çalışmasında MET1 enziminin yokluğunda NaCl stresi uygulamasının RdDM açısından değerlendirilmesi için *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımları incelenmiştir. *Pol IV* geni için 100 mM NaCl uygulamasının Col-0, *met1-7* ve *met1-3* gruplarında sırasıyla 1 - 1,37 ve 2 oranında; 150 mM NaCl uygulamasında ise sırasıyla 1,7 - 2,73 ve 1,95 oranında artışa sebep olduğu belirlenmiştir. Son olarak 100 mM NaCl uygulamasının *Pol V* geninin anlatımında Col-0, *met1-7* ve *met1-3* gruplarında sırasıyla 1,3 - 2,1 ve 1,55 oranlarında artışa neden olduğu 150 mM NaCl uygulamasının ise Col-0 bitkisinde 0,7 oranında bir azalmaya sebep olurken mutantlarda sırasıyla 2,85 ve 1,8 oranında artışla sonuçlandığı görülmüştür. Genel olarak bakıldığında NaCl stres uygulamasının *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımında; MET1 enziminin sentezlenmediği *null* mutantlar olan *met1-7* ve *met1-3*'te Col-0 bitkisine göre artışa neden olduğu görülmüştür. Arıkan ve diğ. (2018) *A. thaliana*'ya 100 mM NaCl uygulamasında *Pol IV* ve *Pol V* anlatımının azaldığını, 150 mM'de ise *Pol IV* anlatımının 2 katına çıktığını fakat *Pol V* anlatımının değişmediğini bildirmiştir. Benzer şekilde Naydenov ve diğ. (2015) *Pol IV* ve *Pol V* anlatımının sıcak stresi altında da arttığını gözlemlemiş ve bu genlerin anlatımının sadece RdDM aracılığıyla değil, aynı zamanda diğer düzenleyici süreçlerde hareket ederek de değişebileceğini belirtmişlerdir.

Önceki çalışmalar da göz önüne alındığında; *A. thaliana* *MET1* geninin *null* mutantları olan *met1-7* ve *met1-3* polimorfizmlerinde NaCl uygulaması sonrası elde ettiğimiz genom düzeyinde hipometilasyon ve mutantların Col-0 bitkisine oranla morfolojik olarak geri kalması sonuçları; *MET1* geninin NaCl etkisinde bitkilerin morfolojik özelliklerini negatif yönde etkilediğini ve çiçeklenme zamanını düzenleyebileceğini gösteren önceki raporlarla tutarlıdır. Aynı şekilde genom düzeyinde DNA hipometilasyon oranı da *met1* mutantlarında Col-0'ya göre daha yüksektir. Gen anlatımı düzeyinde de *met1-7* ve *met1-3* mutantlarında Col-0 bitkisine oranla CHH metilasyonunda görevli *DRM2*, *Pol IV* ve *Pol V* genlerinin anlatımında daha fazla artış olması, hipometilasyonun doğrudan CG bölgeleriyle ilişkili olduğunu ancak *met1* mutantlarında CG metilasyonunun eksikliğinin RdDM ile giderilmeye çalışıldığını düşündürmektedir.

Sonuç olarak; NaCl uygulamasının *met1* mutantları üzerine etkisinin genomik metilasyon ve gen anlatımlarında yarattığı değişimler düzeyinde incelediğimiz bu tez çalışmasında elde ettiğimiz verilerin; tuzluluk sebebiyle kullanılamaz haldeki topraklarda yetişebilecek yüksek verimlilik gösteren bitkilerin üretilebilmesi için tuz stresinin epigenetik mekanizmalar üstündeki etkisinin anlaşılmasına temel oluşturacağı düşündürmektedir.



KAYNAKLAR

- Abdulkhair, W. M., Alghuthaymi, M. A., 2016, Plant pathogens, *Plant Growth*, 49.
- Abobatta, W. F., 2020, *Plant Responses and Tolerance to Extreme Salinity: Learning from Halophyte Tolerance to Extreme Salinity*, In Salt and Drought Stress Tolerance in Plants, In: Hasanuzzaman, M., Tanveer, M. (ed), Chapter 7, Springer, ISSN: 1867-9056, 177-210.
- Abnova, 2020, *ELISA Pairs Kit*, <http://www.abnova.com/support/resources.asp?switchfunctionid={70196CA1-59B1-40D0-8394-19F533EB108F}>, [Ziyaret tarihi: 17 Eylül 2020].
- Alonso, C., Ramos-Cruz, D., Becker, C., 2019, The role of plant epigenetics in biotic interactions, *New Phytologist*, 221(2), 731-737.
- Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*, *Nature*, 408 (6814), 796-815.
- Arikan, B., Özden, S., Turgut-Kara, N., 2018, DNA methylation related gene expression and morphophysiological response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*, *Environmental and Experimental Botany*, 149, 17-26.
- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Vanyushin, B. F., 2002, The gene for domains rearranged methyltransferase (DRM2) in *Arabidopsis thaliana* plants is methylated at both cytosine and adenine residues, *FEBS letters*, 532(3), 367-372.
- Ashapkin, V. V., Kutueva, L. I., Vanyushin, B. F., 2016, Plant DNA methyltransferase genes: Multiplicity, expression, methylation patterns, *Biochemistry (Moscow)*, 81(2), 141-151.
- Atkinson, N.J., Urwin, P.E., 2012, The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field, *Journal of Experimental Botany*, 63 (10), 3523-3543.
- Aydin, S., 2015, A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA, *Peptides*, 72, 4-15.
- Baek, D., Jiang, J., Chung, J. S., Wang, B., Chen, J., Xin, Z., Shi, H., 2011, Regulated *AtHKT1* gene expression by a distal enhancer element and DNA methylation in the promoter plays an important role in salt tolerance, *Plant and Cell Physiology*, 52(1), 149-161.
- Bartels, A., Han, Q., Nair, P., Stacey, L., Gaynier, H., Mosley, M., ... Xiao, W., 2018, Dynamic DNA methylation in plant growth and development, *International journal of molecular sciences*, 19(7), 2144.
- Bilichak, A., Ilnystkyy, Y., Hollunder, J., Kovalchuk, I., 2012, The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression, *PloS one*, 7(1), e30515.

- Bio Rad, 2020, *Type of ELISA*, <https://www.bio-rad-antibodies.com/elisa-types-direct-indirect-sandwich-competition-elisa-formats.html#3>, [Ziyaret tarihi: 13 Eylül 2020].
- Bitonti, M. B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Castiglione, M. R., Dewitte, W., ... Innocenti, A. M., 2002, Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch), *Journal of Experimental Botany*, 53(371), 1047-1054.
- Boyko, A., Kovalchuk, I., 2008, *Epigenetic control of plant stress response*, Environmental and molecular mutagenesis, In: Gollapudi, B. (ed), 49(1), ISSN: 1098-2280, 61-72.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytsky, Y., ... Kovalchuk, I., 2010, Transgenerational adaptation of Arabidopsis to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins, *PloS one*, 5(3), e9514.
- Bowman, 1994, The Role of Arabidopsis in Plant Science Research, *The Multinational Science Steering Committee*.
- Brocklehurst, S., Watson, M., Carr, I. M., Out, S., Heidmann, I., Meyer, P., 2018, Induction of epigenetic variation in Arabidopsis by over-expression of DNA METHYLTRANSFERASE1 (*MET1*), *PloS one*, 13(2), e0192170.
- Cao, X., Jacobsen, S. E., 2002, Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the *DRM* and *CMT3* methyltransferase genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(suppl 4), 16491-16498.
- Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., Zhang, B., 2020, Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation, *Molecules*, 25(3), 706.
- Carus, S., Çakal, Y., 2005, Yaprak Yüzeyinin Karaçam (*Pinus Nigra Arnold*) ve Toros Sediri (*Cedrus Libani A. Rich.*) Fidanlarında Dip Çap ve Boy Artımı Üzerindeki Etkileri, *Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2 (1302-7085), 52-61.
- Chan, S. W. L., Henderson, I. R., Jacobsen, S. E., 2005, Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*, *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 351-360.
- Chartzoulakis, K., Klapaki, G., 2000, Response of two greenhouse pepper hybrids to NaCl salinity during different growth stages, *Scientia horticulturae*, 86(3), 247-260.
- Chen, M., Lv, S., Meng, Y., 2010, Epigenetic performers in plants, *Development, growth & differentiation*, 52(6), 555-566.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. K., 2009a, Epigenetic regulation of stress responses in plants, *Current opinion in plant biology*, 12(2), 133-139.
- Chinnusamy, V., Zhu, J. K., 2009b, RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants, *Science in China Series C: Life Sciences*, 52(4), 331-343.

- Clark, D. P., 2009, *Molecular biology: academic cell update edition*, Academic Press ISBN: 978-0-12-378589-3.
- Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., ... Jacobsen, S. E., 2008, Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning, *Nature*, 452(7184), 215-219.
- Dahl, C., Guldberg, P., 2003, DNA methylation analysis techniques, *Biogerontology*, 4(4), 233-250.
- De La Cruz, X., Lois, S., Sánchez-Molina, S., Martínez-Balbás, M. A., 2005, Do protein motifs read the histone code?, *Bioessays*, 27(2), 164-175.
- Ding, C., Cantor, C. R., 2004, Quantitative analysis of nucleic acids-the last few years of progress, *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(1), 1-10.
- Daccord, N., Celton, J. M., Linsmith, G., Becker, C., Choise, N., Schijlen, E., ... Di Pierro, E. A., 2017, High-quality *de novo* assembly of the apple genome and methylome dynamics of early fruit development, *Nature genetics*, 49(7), 1099-1106.
- Duan, Y., 2016, *Saltwater intrusion and agriculture: a comparative study between the Netherlands and China*, <http://www.diva-portal.org/smash/record.jsf?pid=diva2%3A1060822&dswid=6501>, [Ziyaret Tarihi: 9 Haziran 2020].
- Ensemblplants, *Arabidopsis Thaliana Assembly and Gene Annotation*, 2020, https://plants.ensembl.org/Arabidopsis_thaliana/Info/Annotation/, [Ziyaret Tarihi: 9 Haziran 2020].
- Epigentek, MethylFlash™ Methylated DNA Quantification Kit (Colorimetric), <https://www.epigentek.com/catalog/methylflash-methylated-dna-mc-quantification-kit-colorimetric-p-2094.html>, [Ziyaret Tarihi: 9 Ekim 2020].
- Erdmann, R. M., Picard, C. L., 2020, RNA-directed DNA Methylation, *PLoS Genetics*, 16(10), e1009034.
- Felsenfeld, G., 2014, A brief history of epigenetics, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(1), a018200.
- Feng, S., Jacobsen, S. E., 2011, Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective, *Current opinion in plant biology*, 14(2), 179-186.
- Fields, S., Johnston, M., 2005, Whither model organism research?, *Science*, 307(5717), 1885-1886.
- Finnegan, E. J., Genger, R., Kovac, K., Peacock, W. J., Dennis, E. S., 1998, DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5824-5829.

- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S., 2000, DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes, *Current opinion in genetics & development*, 10(2), 217-223.
- Fraga, M. F., Esteller, M., 2002, DNA methylation: a profile of methods and applications, *Biotechniques*, 33(3), 632-649.
- Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S., 2008, Real-time PCR, *Current protocols essential laboratory techniques*, (1), 10-3.
- Gallego-Bartolomé, J., Liu, W., Kuo, P. H., Feng, S., Ghoshal, B., Gardiner, J., ... Jacobsen, S. E., 2019, Co-targeting RNA polymerases IV and V promotes efficient *de novo* DNA methylation in Arabidopsis, *Cell*, 176(5), 1068-1082.
- Gao, C., Deng, M., Yang, X., Yu, W., Cai, J., Shi, Y., ... Wang, G., 2020, Genome-Wide Identification and Coexpression Network Analysis of DNA Methylation Pathway Genes and their Differentiated Functions in *Ginkgo biloba*. L, *Forests*, 11(10), 1076.
- Gehring, M., Reik, W., Henikoff, S., 2009, DNA demethylation by DNA repair, *Trends in Genetics*, 25(2), 82-90.
- Genetics Home Reference, 2020, *Genetics*, <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/mutationsanddisorders>, [Ziyaret tarihi: 27 Eylül 2020].
- Gilbert, S. F., 2012, Commentary: 'The Epigenotype' by CH Waddington, *International journal of epidemiology*, 41(1), 20-23.
- Gull, A., Lone, A. A., Wani, N. U. I., 2019, *Biotic and Abiotic Stresses in Plants*, Abiotic and Biotic Stress in Plants, IN: De Oliveira, A.(ed), IntechOpen, ISBN: 978-1-78923-812-9.
- Haag, J. R., Pikaard, C. S., 2011, Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing, *Nature reviews Molecular cell biology*, 12(8), 483-492.
- He, X. J., Chen, T., Zhu, J. K., 2011, Regulation and function of DNA methylation in plants and animals, *Cell research*, 21(3), 442-465.
- Hedges, S.B., 2002, The Origin and Evolution of Model Organisms, *Nature Reviews Genetics*, 3(11), 838-49.
- Henderson, I. R., Jacobsen, S. E., 2007, Epigenetic inheritance in plants, *Nature*, 447(7143), 418-424.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., Griffith, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence, *Bio/technology*, 10(4), 413-417.
- Huang, H., Liu, R., Niu, Q., Tang, K., Zhang, B., Zhang, H., ... Lang, Z., 2019, Global increase in DNA methylation during orange fruit development and ripening, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(4), 1430-1436.

- IPCC, 2014, *Special Report Global Warming of 1.5 °C*, <https://www.ipcc.ch/sr15/>, [Ziyaret tarihi: 10 Eylül 2020].
- Isayenkov, S. V., Maathuis, F. J., 2019, Plant salinity stress: Many unanswered questions remain, *Frontiers in plant science*, 10.
- Iyer, L. M., Abhiman, S., Aravind, L., 2011, *Natural history of eukaryotic DNA methylation systems*, In Progress in molecular biology and translational science, 101, 25-104, Academic Press.
- Jenuwein, T., Allis, C. D., 2001, Translating the histone code, *Science*, 293(5532), 1074-1080.
- Ji, L., Jordan, W. T., Shi, X., Hu, L., He, C., Schmitz, R. J., 2018, TET-mediated epimutagenesis of the *Arabidopsis thaliana* methylome, *Nature communications*, 9(1), 1-9.
- Johnson, L. M., Bostick, M., Zhang, X., Kraft, E., Henderson, I., Callis, J., Jacobsen, S. E., 2007, The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation, *Current Biology*, 17(4), 379-384.
- Johnson, L. M., Law, J. A., Khattar, A., Henderson, I. R., Jacobsen, S. E., 2008, SRA-domain proteins required for DRM2-mediated *de novo* DNA methylation, *PLoS Genet*, 4(11), e1000280.
- Jones, P. A., 2012, Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond, *Nature Reviews Genetics*, 13(7), 484-492.
- Jones, A. L., Sung, S., 2014, *Mechanisms underlying epigenetic regulation in Arabidopsis thaliana*, Integrative & Comparative Biology, vol. 54, ISSN 1540-7063, 61-67.
- Khan, S. A., Li, M. Z., Wang, S. M., Yin, H. J., 2018, Revisiting the role of plant transcription factors in the battle against abiotic stress, *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1634.
- Kinoshita, T., Seki, M., 2014, Epigenetic memory for stress response and adaptation in plants, *Plant and Cell Physiology*, 55(11), 1859-1863.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2011a, *Genetiğe Giriş*, Genetik Kavramlar, In: Öner, C. (ed.), Bölüm 1, Palme Yayıncılık, MRK Matbaacılık, Sıhhiye, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-5859-26-1, 11-16.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2011b, *Gen Mutasyonu, DNA onarımı ve Transpozisyonu*, Genetik Kavramlar, In: Öner, C. (ed.), Bölüm 15, Palme Yayıncılık, MRK Matbaacılık, Sıhhiye, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-5859-26-1, 361-387.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., 2011c, *Genomik ve Proteomik*, Genetik Kavramlar, In: Öner, C. (ed.), Bölüm 20, Palme Yayıncılık, MRK Matbaacılık, Sıhhiye, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-5859-26-1, 484-515.

- Kong, W., Li, B., Wang, Q., Wang, B., Duan, X., Ding, L., ... La, H., 2018, Analysis of the DNA methylation patterns and transcriptional regulation of the NB-LRR-encoding gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Plant molecular biology*, 96(6), 563-575.
- Kozera, B., Rapacz, M., 2013, Reference genes in real-time PCR, *Journal of applied genetics*, 54(4), 391-406.
- Laibach, F., 1907, *Botanischen Centralblatt Beihefte*, 1(22): 191–210.
- Law, J. A., Jacobsen, S. E., 2010, Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals, *Nature Reviews Genetics*, 11(3), 204-220.
- Lee, W. K., Cho, M. H., 2016, Telomere-binding protein regulates the chromosome ends through the interaction with histone deacetylases in *Arabidopsis thaliana*, *Nucleic acids research*, 44(10), 4610-4624.
- Liu, B., Soundararajan, P., Manivannan, A., 2019, Mechanisms of Silicon-Mediated Amelioration of Salt Stress in Plants, *Plants*, 8 (9), 307.
- Lisch, D., 2009, Epigenetic regulation of transposable elements in plants, *Annual review of plant biology*, 60, 43-66.
- Ma, Y., Dai, X., Xu, Y., Luo, W., Zheng, X., Zeng, D., ... Xiao, J., 2015, COLD1 confers chilling tolerance in rice, *Cell*, 160(6), 1209-1221.
- Mahajan, S., Tuteja, N., 2005, Cold, salinity and drought stressess: an overview, *Archieves of Biochemistry and Biophysics*, 444 (2), 139-158.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mathieu, O., Probst, A. V., Paszkowski, J., 2005, Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis, *The EMBO journal*, 24(15), 2783-2791.
- Matzke, M. A., Mosher, R. A., 2014, RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity, *Nature Reviews Genetics*, 15(6), 394-408.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., Koornneef, M., 1998, *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis, *Science*, 282(5389), 662-682.
- Meinke, D. W., 2020, Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in Arabidopsis, *New Phytologist*, 226(2), 306-325.
- Molinier, J., Ries, G., Zipfel, C., Hohn, B., 2006, Transgeneration memory of stress in plants, *Nature*, 442(7106), 1046-1049.
- Munns, R., Tester, M., 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annual Review of Plant Biology*, 59: 651–681.

- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Naydenov, M., Baev, V., Apostolova, E., Gospodinova, N., Sablok, G., Gozmanova, M., Yahubyan, G., 2015, High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in Arabidopsis, *Plant Physiology and Biochemistry*, 87, 102-108.
- NASA, 2018, *Graphic: Global warming from 1880 to 2017*, https://climate.nasa.gov/climate_resources/139/, [Ziyaret Tarihi: 09 Haziran 2020].
- NCBI, 2020, *MET1 methyltransferase1 [Arabidopsis thaliana (thale cress)]*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/834975>, [Ziyaret Tarihi: 11 Ekim 2020].
- Ngara, R., Ndimba, B.K., 2014, Understanding the complex nature of salinity and drought-stressresponse in cereals using proteomics technologies, *Proteomics*, 14 (4-5), 611-621.
- Osmond, C.B., Austin, M.P., Berry, J.A., Billings, W.D., Boyer, J.S., Dacey, J.W.H., Nobel, P.S., Smith, S.D., Winner, W.E., 1987, Stress physiology and the distribution of plants, *BioScience*, 37(1),38-48.
- Palmgren, G., Mattsson, O., Okkels, F. T., 1991, Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*, *Plant Physiology*, 95(1), 174-178.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P., Prasad, S. M., 2015, Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review, *Environmental Science and Pollution Research*, 22(6), 4056-4075.
- Park, K., Kim, M. Y., Vickers, M., Park, J. S., Hyun, Y., Okamoto, T., ... Scholten, S., 2016, DNA demethylation is initiated in the central cells of Arabidopsis and rice, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(52), 15138-15143.
- Parle-Mcdermott, A., Harrison, A., 2011, DNA methylation: a timeline of methods and applications, *Frontiers in genetics*, 2, 74.
- Pfaffl, M. W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Peck, S., Mittler, R., 2020, *Plant signaling in biotic and abiotic stress*, Journal of Experimental Botany, Lunn J. (ed), 71(5), 1649–1651, Oxford Academic, ISSN 0022-0957.
- Quadrana, L., Colot, V., 2016, Plant transgenerational epigenetics, *Annual Review of Genetics*, 50, 467-491.
- Raghavachari, N., Garcia-Reyero, N., 2018, *Overview of gene expression analysis: transcriptomics*, Gene Expression Analysis, 1-6, Humana Press, New York, NY.
- Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., Jackson, R. B., 2013, *Bitki Yapı ve İşlev*, Campbell Biyoloji, Gündüz, E. (ed.), Türkan, İ. (ed.), Bölüm 6, Palme

- Yayıncılık, MRK Matbaacılık, Sıhhiye, Ankara, Türkiye, ISBN: 978-605-355-147-8, 736-846.
- Ross, G. S., Elder, P. A., McWha, J. A., Pearce, D., Pharis, R. P., 1987, The development of an indirect enzyme linked immunoassay for abscisic acid, *Plant physiology*, 85(1), 46-50.
- Rubenstein, P. A., 1990, The functional importance of multiple actin isoforms, *Bioessays*, 12(7), 309-315.
- Sahu, P. P., Pandey, G., Sharma, N., Puranik, S., Muthamilarasan, M., Prasad, M., 2013, Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation, *Plant cell reports*, 32(8), 1151-1159.
- Sako, K., Sunaoshi, Y., Tanaka, M., Matsui, A., Seki, M., 2018, The duration of ethanol-induced high-salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant signaling & behavior*, 13(8), e1500065.
- Sáenz-Mata, J., Jiménez-Bremont, J. F., 2012, HR4 gene is induced in the Arabidopsis-Trichoderma atroviride beneficial interaction, *International journal of molecular sciences*, 13(7), 9110-9128.
- San Segundo-Val, I., Sanz-Lozano, C. S., 2016, Introduction to the gene expression analysis, *In Molecular Genetics of Asthma*, 29-43, Humana Press, New York, NY.
- Sánchez-Romera, B., Aroca, R., 2020, Plant Roots—The Hidden Half for Investigating Salt and Drought Stress Responses and Tolerance. In Salt and Drought Stress Tolerance in Plants, 137-175, *Springer*, Cham.
- Saze, H., Scheid, O. M. ve Paszkowski, J., 2003, Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis, *Nature genetics*, 34(1), 65-69.
- Schmittgen, T. D., Livak, K. J., 2008, Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method, *Nature protocols*, 3(6), 1101.
- Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., ... Satou, M., 2002, Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray, *The Plant Journal*, 31(3), 279-292.
- Shah, K., Maghsoudlou, P., 2016, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics, *British journal of hospital medicine*, 77(7), C98-C101.
- Shrivastava, P., Kumar, R., 2015, Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation, *Saudi journal of biological sciences*, 22(2), 123-131.
- Song, L., James, S. R., Kazim, L., Karpf, A. R., 2005, Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 77(2), 504-510.

- Soppe, W. J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M. S., ... Frasz, P. F., 2002, DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis, *The EMBO journal*, 21(23), 6549-6559.
- Sudan, J., Raina, M., Singh, R., 2018, Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability, *3 Biotech*, 8(3), 172.
- Stoller, 2020, *Get your crops back on track!*, <https://stoller.com.au/get-your-crops-back-on-track/>, [Ziyaret tarihi: 10 Eylül 2020].
- Swarbreck, S. M., Colaço, R., Davies, J. M., 2013, Plant calcium-permeable channels, *Plant Physiology*, 163(2), 514-522.
- TAIR, 2008, *About Arabidopsis*, <https://www.arabidopsis.org/portals/education/aboutarabidopsis.jsp>, [Ziyaret Tarihi: 10 Haziran 2020].
- Tarhan, Ç., Turgut-Kara, N., 2016, *Epigenetics and Applications in Plants*, Plant Omics: Trends and Applications, In: Hakeem, K.R., Tombuloğlu, H., Tombuloğlu, G. (ed.), Chapter 10, Springer, ISBN: 978-3-319-31701-4, 255-270.
- Tariq, M., Saze, H., Probst, A. V., Lichota, J., Habu, Y., Paszkowski, J., 2003, Erasure of CpG methylation in Arabidopsis alters patterns of histone H3 methylation in heterochromatin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(15), 8823-8827.
- Tanveer, M., Ahmed, H.A.I., 2020, *ROS Signalling in Modulating Salinity Stress Tolerance in Plants*, Salt and Drought Stress Tolerance in Plants, In: Hasanuzzaman, M., Tanveer, M (eds.), Springer Nature Switzerland AG, ISBN 978-3-030-40277-8, 299-314.
- Tellez-Plaza, M., Tang, W. Y., Shang, Y., Umans, J. G., Francesconi, K. A., Goessler, W., ... Guallar, E., 2014, Association of global DNA methylation and global DNA hydroxymethylation with metals and other exposures in human blood DNA samples, *Environmental health perspectives*, 122(9), 946-954.
- Tester, M., Davenport, R., 2003, Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants, *Annals of botany*, 91(5), 503-527.
- The National Science Foundation, 2002, *Arabidopsis: The Model Plant*, https://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/2010report_8.pdf, [Ziyaret Tarihi: 26 Mayıs 2020].
- Tuteja, N., 2007, *Mechanisms of high salinity tolerance in plants*, Methods in enzymology, In: Häussinger, D., Sies, H., (ed.), Chapter 24, Academic Press, Vol. 428, ISBN: 978-0-12-373921-6, 419-438.
- UN DESA, 2019, World Population Prospects: The 2019 Revision, *Population Facts*, 2019/6, ISBN: 978-92-1-148316-1, 1-4.
- Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., Van Dongen, J. J. M., 2003, Detection of minimal residual disease in hematologic

- malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia*, 17(6), 1013-1034.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome biology*, 3(7), 0034-1.
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M., 2008, Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis, *Biotechniques*, 44(5), 619-626.
- Waddington, C. H., 1942, The epigenotype, *Endeavour*, 1, 18-20.
- Wixon, J., 2001, Featured organism: *Arabidopsis thaliana*, *Comparative and functional genomics*, 2(2), 91-98.
- Wong, M. L., Medrano, J. F., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39(1), 75-85.
- Yadav, S., Irfan, M., Ahmad, A., Hayat, S., 2011, Causes of salinity and plant manifestations to salt stress: a review, *Journal of Environmental Biology*, 32(5), 667.
- Yao, Y., Bilichak, A., Golubov, A., Kovalchuk, I., 2012, ddm1 plants are sensitive to methyl methane sulfonate and NaCl stresses and are deficient in DNA repair, *Plant cell reports*, 31(9), 1549-1561.
- Yang, Y., Guo, Y., 2018a, Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses, *New Phytologist*, 217(2), 523-539.
- Yang, Y., Guo, Y., 2018b, Unraveling salt stress signaling in plants, *Journal of integrative plant biology*, 60(9), 796-804.
- Yokoi, S., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., 2002, Salt stress tolerance of plants, *JIRCAS working report*, 23(1), 25-33.
- Yuan, F., Yang, H., Xue, Y., Kong, D., Ye, R., Li, C., ... Johnson, D. M., 2014, OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca^{2+} increases vital for osmosensing in Arabidopsis, *Nature*, 514(7522), 367-371.
- Zangi, M., Najjar, M. B. B., Golalipour, M., Aghdasi, M., 2020, MET1 DNA Methyltransferase Controls TERT Gene Expression: A New Insight to The Role of Telomerase in Development, *Cell journal*, 22(1), 71-74.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sunderasan, A., Cokus, S., Chan, S.W., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., Ecker, J.R., 2006, Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis, *Cell*, 126 (6), 1189-1201.
- Zhang, H., Zhu, J. K., 2011, RNA-directed DNA methylation, *Current opinion in plant biology*, 14(2), 142-147.

- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J. K., 2018, Dynamics and function of DNA methylation in plants, *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(8), 489-506.
- Zhou, M., Law, J. A., 2015, RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules, *Current opinion in plant biology*, 27, 154-164.
- Zhong, L., Xu, Y. H., Wang, J. B., 2009, DNA-methylation changes induced by salt stress in wheat *Triticum aestivum*, *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
- Zhu, J. K., 2000, Genetic analysis of plant salt tolerance using Arabidopsis, *Plant physiology*, 124(3), 941-948.
- Zhu, J. K., 2009, Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases, *Annual review of genetics*, 43, 143-166.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Yağmur Vecide YEŞİLDİREK
Doğum Yeri	Bahçelievler
Doğum Tarihi	10.09.1995
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	+905384589749
E-Posta Adresi	yagmurvecide@hotmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Balıkesir Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Mezuniyet Yılı	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

Makale ve Bildiriler
Yeşildirek, Y.V., Aydoğan Türkoğlu S., Baysal, S., 2020, Expression of The Y-Box Binding Protein 1 (YB-1, YBX1) in Different Cancer Cell Lines, <i>ICHES-IDU 2020 International Congress of Health Sciences</i> , 20-21 June 2020 Online, ISBN: 978-605-69933-6-7, 555-555.