



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİKLOASTRAGENOL'ÜN *Arabidopsis thaliana*'DA TELOMER/TELOMERAZ SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabiya Merve CEYLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

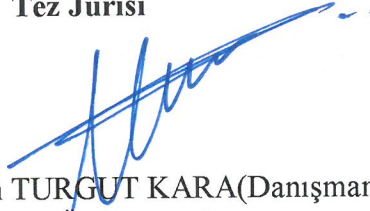
DANIŞMAN
Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Ekim, 2019

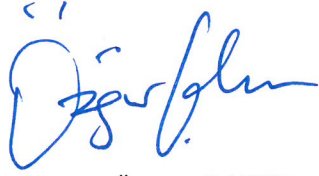
İSTANBUL

Bu çalışma, 25.10.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

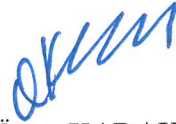
Tez Jürisi



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



Doç. Dr. Özgür ÇAKIR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Özge KARAKAŞ METİN
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



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.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 31512 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, her zaman desteğini hissettiğim ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum danışmanım Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya,

Deneyimlerini benimle paylaşan ve her daim destek olan sayın hocam Doç. Dr. Özgür ÇAKIR'a,

Bilimde yer edinmek için gerekli bilgi ve tecrübeyi kazanmaya başladığım ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum İstanbul Üniversitesi'ne,

Deney sürecinin birçok aşamasındaki yardımları için Burcu ARIKAN, Wissem MHİRİ, Aslıhan ŞENGELİN, Yunus AKSÜT ve konfokal mikroskobu ile hücre görüntüleme katkıları için Ümit KINA'ya,

Bilimsel ve çeşitli ilgi alanlarındaki sohbetleri ile laboratuvarı samimi bir ortama dönüştüren çalışma arkadaşlarım Burcu KARPUZ, Haluk ÇELİK ve Bekir Ahmet İLGAR'a,

Dostlukları ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Muhammed KOÇAK, Olcay ŞAHİN ve İlayda GÖKTEPE'ye,

“Geceleri dağlara yalnızlıkların gölgesi düşmüş,
Yalnızlıklar dağlara yalnız gölgeleri kadar büyüklermiş”
diye mırıldanan, beni her zaman cesaretlendiren çocukluk arkadaşlarıma,

Destekleri ile hayallerimi gerçekleştirmek için her zaman yanımda olan başta annem Kadriye CEYLAN ve babam Lütfü CEYLAN olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Ekim 2019

Rabiya Merve CEYLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. TELOMER-TARİHSEL PERSPEKTİF	3
2.2. TELOMERİK DİZİ.....	5
2.3. TELOMERE BAĞLANAN PROTEİNLER.....	7
2.4. TELOMERAZ ENZİMİ.....	10
2.4.1. Telomeraz Enziminin Düzenlenmesi	13
2.5. TELOMER HOMEOSTAZİSİ	15
2.5.1. Telomer Disfonksiyonu	18
2.6. SİKLOASTRAGENOL	19
2.7. TELOMER BİYOLOJİSİNE MODEL ORGANİZMA OLARAK <i>A. thaliana</i>	22
2.8. GEN ANLATIM ANALİZLERİ	23
2.9. HÜCRE CANLILIĞININ İZLENMESİ.....	23
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1 BİTKİ MATERYALİ.....	25
3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ VE SİKLOASTRAGENOL UYGULAMASI.....	25
3.2.1 Besiyerlerinin Hazırlanması	25
3.2.2 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	25
3.2.3 Tohumların Çimlendirilmesi ve Bitkilerinin Yetiştirilmesi	25
3.2.3.1 Total Klorofil Miktar Tayini	26
3.2.4 Kallus Kültürlerinin Kurulması	26
3.2.5 Sikloastragenol'ün Hazırlanması.....	26
3.3 GEN ANLATIMINDAKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ.....	27

3.3.1 Analizler İçin Seçilen Genler	27
3.3.2 Total RNA İzolasyonu.....	28
3.3.2.1 RNA Miktarının Ve Saflığının Belirlenmesi.....	28
3.3.2.2 Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	29
3.3.3 cDNA sentezi.....	30
3.3.4 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	31
3.4 HÜCRE CANLILIK ANALİZİ	33
3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	33
4. BULGULAR.....	34
4.1 <i>A. thaliana</i> BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ	34
4.2 KALLUS KÜLTÜRÜ	34
4.3 SİKLOASTRAGENOL UYGULAMASININ BİTKİ DOKULARI ÜZERİNDEKİ MORFOLOJİK ETKİLERİ.....	36
4.4 GEN ANLATIM ANALİZLERİ	39
4.4.1 Total RNA'nın İzolasyonu, Kalitatif ve Kantitatif Analizi	39
4.4.2 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları.....	40
4.5. SİKLOASTRAGENOL'ÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ	45
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	51
ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Telomer ve telomeraz biyolojisindeki gelişmelerin şematik gösterimi (Shay ve Wright, 2019).....	5
Şekil 2.2: t-ilmek yapısı (de Lange, 2005).....	7
Şekil 2.3: <i>A. thaliana</i> telomer kompleksinin şematik görünümü.....	8
Şekil 2.4: Bu tez çalışmasında gen anlatım analizi yapılan telomer proteinlerinin şematik gösterimi.....	10
Şekil 2.5: <i>A. thaliana</i> TER genlerinin RNA uzunlukları (a) ve görevleri (b).....	12
Şekil 2.6: Bitkilerde telomeraz regülasyonu.	14
Şekil 2.7: ALT mekanizmasının şematik gösterimi (Shay ve Wright, 2019).	16
Şekil 2.8: Telomer Hızlı Delesyonu mekanizmasının şematik gösterimi (Bucholc ve diğ.,2001).....	17
Şekil 2.9: Sikloastragenol sentezinin şematik gösterimi (Yu ve diğ., 2018).	20
Şekil 2.10: CAG ile ilişkili kuramsal mekanizmalar.	21
Şekil 4.1: MS besiyerinde kültürlenmiş olan 10,5 cm boyunda 30 günlük <i>A. thaliana</i> bitkisi (Bar:1 cm).....	34
Şekil 4.2: 1 mg/L 2,4-D içeren MS besiyerinde 9 ay boyunca alt kültürlenmiş <i>A. thaliana</i> kallus dokuları (Bar:1 cm).	35
Şekil 4.3: Üç hafta boyunca farklı dozlarda sikloastragenole maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitkileri.	36
Şekil 4.4: Farklı dozlarda CAG'e maruz kalan <i>A. thaliana</i> bitki ve kalluslarında meydana gelen morfolojik değişimler.	37
Şekil 4.5: Üç hafta boyunca farklı dozlarda sikloastragenole maruz kalan <i>A. thaliana</i> kallus dokuları.	38
Şekil 4.6: CAG uygulanmış <i>A. thaliana</i> bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü	39
Şekil 4.7: CAG uygulaması sonrası RT-PZR analizleri sonucunda <i>TERT</i> (a), <i>POT1a</i> (b), <i>CTC1</i> (c), <i>BT2</i> (d), <i>TAC1</i> (e), <i>TRB1</i> (f) ile <i>TER1</i> (g) genlerinin <i>A. thaliana</i> bitki ve kalluslarındaki anlatım seviyelerinin değişimi.	40

Şekil 4.8: CAG uygulanmış <i>A. thaliana</i> kök hücrelerinin konfokal mikroskop ile çekilen görüntüsü.	45
---	----



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Bazı model organizmalarda telomerik dizi ve ortalama uzunluğu.....	6
Tablo 3.1: Bitkilerde telomer ve/veya telomerazla ilişkili bazı proteinlerin işlevleri.	27
Tablo 3.2: %1'lik 40 mL formaldehit agaroz jel hazırlanması için gerekli bileşenler.	29
Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri (a) ve reaksiyon koşulları (b).....	30
Tablo 3.4: Gen anlatımı analizi için kullanılan primer dizileri.	31
Tablo 3.5: RT-PZR bileşenleri (a) ve koşulları (b).	32
Tablo 4.1: <i>A. thaliana</i> 'da CAG'ın morfolojik etkilerinin belirlenmesi.	38
Tablo 4.2: CAG uygulanmış <i>A. thaliana</i> bitki ve kallus dokularından izole edilen RNA'ların spektrofotometrik değerleri.	39
Tablo 4.3: <i>A. thaliana</i> bitki ve kalluslarına CAG uygulaması sonrasında <i>TERT</i> , <i>POT1a</i> , <i>CTC1</i> , <i>BT2</i> , <i>TAC1</i> , <i>TRB1</i> ile <i>TER1</i> genlerinin anlatımlarındaki değişimler.	44

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
~	: Yaklaşık olarak
°C	: Derece Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
atm	: Atmosfer
bç	: Baz çifti
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
L	: Litre
M	: Molar
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
sn	: Saniye
U	: Ünite
V	: Volt

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

2,4-D	: 2,4-diklorofenoksiasetik Asit
ALT	:Telomerlerin Alternatif Uzatılması, “Alternative Lengthening of Telomeres”
ASIV	: Astragalosit IV
cDNA	: Komplementer DNA
CAG	: Sikloastragenol

CREB	: “cAMP Response Element Binding”
DDR	: DNA hasar cevabı, “DNA Damage Response”
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile Su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid Trifosfat
ECTC	: Ekstra-Kromozomal Telomerik Daireler, “Extra-Chromosomal Telomeric Circles”
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum Bromür
FDA	: Floresan diasetat
<i>g</i>	: Rölatif Santrifüj Kuvveti, “RCF”
GRAS	: “Generally Recognized as Safe”
MS	: Murashige ve Skoog
MOPS	: 3-Morfolino Propansülfonik Asit, “3-Morpholino Propanesulfonic Acid”
MgCl₂	: Magnezyum Klorür
NaAc	: Sodyum Asetat
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NHEJ	: Homolog Olmayan Uç Birleştirme, “Non-Homologous End Joining”
PI	: Propidium iyodür
RT-PZR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu “Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction”
RPA	: Replikasyon Proteini A, “Replication Protein A”
RNA	: Ribonükleik Asit
TAE	: Tris-asetat EDTA
TRD	: Telomer Hızlı Delesyonu, “Telomere Rapid Deletion”
UV	: Ultra Viyole

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SİKLOASTRAGENOL'ÜN *Arabidopsis thaliana*'DA TELOMER/TELOMERAZ SİSTEMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Rabiya Merve CEYLAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA

Yaşlanma süreci, tek hücreli mayadan çok hücreli memelilere ve bitkilere kadar canlı organizmaların çoğunu etkilemektedir. Kompleks organizmalarda yaşlanma süreci, kromozomların sonunda bulunan telomer tekrar dizilerinin uzunluğuyla ilişkilidir. Telomerlerin uzunluğu her hücre bölünmesiyle kısalır, bu nedenle hücrelerin çoğalmasına sınırlı bir sayıya kadar olanak verir ve bu olay telomer kaybı hipotezi olarak açıklanır. Buna göre telomer uzunluğu, çoğu ökaryotta kromozomların sonuna telomerik tekrar dizilerinin sentezlenmesini sağlayan telomeraz aktivitesi ile düzenlenir. Bu bağlamda, telomeraz aktivitesinin kaybı ve doku sınırlı anlatımı yaşlanma sürecine dahil edilir. Yaşlanma süreci, bitkiler ve hayvanlar arasında oldukça farklı olmasına rağmen, telomer biyolojisi temelinde aynıdır.

Sikloastragenol (CAG), bazı *Astragalus* türlerinin sentezlediği triterpenoid saponin yapısında bir bileşiktir. Yapılan çalışmalar, CAG'ın telomeraz aktivasyonu, telomer uzaması, anti-enflamatuar ve anti-oksidatif özellikler dahil olmak üzere geniş ölçüde biyoaktiviteye sahip olduğunu göstermektedir. Klinik araştırmalar, CAG'ın insanlarda telomerazı aktive ettiğini göstermiş olmasına karşın henüz bitki telomer/telomeraz sistemi üzerindeki etkisini araştırmaya yönelik bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, model bitki *Arabidopsis thaliana*'nın tüm bitki ve kallus dokularında 1 μ M ve 10 μ M CAG'ın etkisi araştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda CAG'ın *A.thaliana*'da telomerazın katalitik alt birimini kodlayan *TERT* geni ile birlikte telomer/telomeraz sistemi

üzerinde pozitif düzenleyiciler olarak görev gören *TER1*, *CTC1*, *TRB1*, *POT1a*, *TAC1*, *BT2* transkript seviyelerinde artışa neden olduğu belirlenmiştir. CAG uygulaması, bitkilerde boy uzunluğunda 2 cm'lik bir artış ve klorofil miktarında azalışa neden olmasına karşın, kallusların büyüme indeksinde herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Ayrıca bitki kök dokusu hücrelerinde artan doza bağlı olarak hücre profilerasyonunda bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlar CAG'ın insanlarda olduğu gibi bitkilerde de telomeraz aktivatörü olarak rol oynadığı ve telomer/telomeraz sistemindeki artan aktivitenin hücre profilerasyonu üzerinde olumlu etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Ekim, 2019, 76 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Arabidopsis thaliana*, Sikloastragenol, Telomer, Telomeraz, Gen anlatımı.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

EFFECTS OF CYCLOASTRAGENOL ON TELOMERE/TELOMERASE SYSTEM OF *Arabidopsis thaliana*

Rabiya Merve CEYLAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

The aging process affects most living organisms, from unicellular yeast to multicellular mammals and plants. In complex organisms, the aging process is associated with the length of telomeric repeat sequences at the end of DNA. The length of telomeres shortens with each cell division, therefore limits proliferation of cells to a finite number, which is explained as telomere loss hypothesis. Accordingly, the length of telomeres are regulated by the telomerase activity which synthesizes the repeats at the end of chromosome in most eukaryotes. In this regard, loss of telomerase activity or its tissue limited expression is implicated in aging process. Although the process of aging, is quite different amongst plants and animals, telomere biology is essentially the same.

Cycloastragenol (CAG) is a triterpenoid saponin compound which is synthesized by some *Astragalus* species. Studies have shown that CAG has a wide range of bioactivity, including telomerase activation, telomere elongation, anti-inflammatory and anti-oxidative properties. While clinical studies have demonstrated that CAG activates human telomerase, no study has been conducted to investigate its effect on the plant telomere/telomerase system.

In this study, in order to test whether CAG has an effect on plants, 1 μ M and 10 μ M CAG were tested on all *in vitro* grown plant and callus tissues of a model plant *Arabidopsis thaliana*. Results revealed that CAG caused an increase in the transcript levels of TER1, CTC1, TRB1,

POT1a, TAC1, BT2 which act as positive regulators on the telomere/telomerase system together with the TERT gene encoding the catalytic subunit of telomerase in *A.thaliana*. While CAG application resulted in 2 cm increase in height and a decrease in chlorophyll amount, no remarkable effect on callus growth index was observed. Furthermore, an increase in cell proliferation was observed in plant root cells due to the increased CAG dose. These results suggest that CAG might have a role as a telomerase activator in plants as well as in humans, and it led us to conclude that increased activity in the telomere/telomerase system might create a positive effect on cell proliferation.

October 2019, 76 pages.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Cycloastragenol, Telomere, Telomerase, Gene expression.



1. GİRİŞ

Telomer bölgeleri, hücre bölünmesi sırasında kromozomların uygun bir şekilde ayrılmasını sağlayan ve genomik kararlılığı sürdürmek için gerekli olan kromozom uçlarındaki nükleoprotein yapılarıdır. 1939 yılında *Zea mays*'da keşfedildiklerinden beri, telomerler memelilerde kanser, yaşlanma ve kök hücre biyolojisi çalışmalarında merkezi bir öneme sahiptir (Sax ve Enzmann, 1939). Ökaryotlarda telomerik tekrarların telomeraz aracılığıyla sentezi ve devamlılığı yüksek oranda korunmaktadır. Kritik seviyede kısalan telomerler, hasarlı DNA olarak algılanmakta ve uçtan uca kromozom füzyonları ile kırılma-füzyon-köprü döngüsüne yol açabilen DNA hasar cevabını aktive etmektedir (O'Sullivan ve Karlseder, 2010; Murnane, 2012). Ayrıca çok fazla kısalan telomerler, normal hücre döngüsünden çıkmaya ve yaşlanma süreçlerinin başlamasına sebep olmaktadır. Telomeraz ise kök hücre ve üreme hücrelerinde telomer tekrarlarının devamlılığını sağlayarak replikatif yaşlanmayı önlemektedir. Farelerde telomeraz aktivitesindeki artışın, hücrelerin rejeneratif kapasitesi ile hem ömürlerini hem de sağlıklı yaşam sürelerini arttırabildiği gösterilmiştir (Tomás-Loba ve diğ., 2008; Bernardes de Jesus ve diğ., 2012).

Çoğu angiosperm için telomerik kromatin, kromozom uçlarını koruyan ve hayvanlardaki homologları ile yüksek yapısal ve işlevsel benzerliğe sahip olan bir dizi telomere bağlanan protein ile bağlanmış TTTAGGG DNA dizisinin ardışık tekrarlarından oluşmaktadır (Song ve diğ., 2008; Surovtseva ve diğ., 2009; Shakirov ve diğ., 2010). *Arabidopsis thaliana*, bitki biyolojisi çalışmaları için model organizmalardan biri olup, telomer biyolojisi çalışmalarında öncelikli olarak tercih edilmektedir. Hayvanlarda olduğu gibi, *Arabidopsis* de telomeraz ekspresyonu sıkı bir şekilde düzenlenir ve enzim aktivitesi, bölünen dokularda sınırlı olmaktadır (Watson ve Riha, 2010). Mutant TERT bitkileri ile yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinin yokluğunun sürekli telomer kısalmasına ve anormal kök gelişimine neden olduğunu göstermiştir (Riha ve diğ., 2001). Ayrıca bitkiler, diğer sistemlerde çok önemli olduğu gösterilen telomer bölgesi ile ilişkili bileşenlerin yokluğunda, birden fazla nesil boyunca hayatta kalma kapasitesine sahip ve genom kararsızlığına karşı yüksek oranda tolerans sergilemektedirler (Watson ve Riha, 2011). Benzer çalışmalar ile telomer devamlılığının bitki canlılığı için gerekli olduğu gösterilmiş olmasına karşın, telomerazın bitki büyümesi ve gelişmesinin en temel yönlerine olan katkıları büyük ölçüde keşfedilmemiştir.

CAG, *Astragalus membranaceus*'taki önemli bir saponin olan Astragalosit IV'ün hidrolizi ile oluşan bir sapogenindir. Çin'de 2000 yıldan fazla bir süredir *A. membranaceus*, şeker hastalığı ve ateroskleroz gibi metabolik ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde olumlu etkilere yol açtığı düşüncesiyle geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Ríos ve Waterman, 1997). CAG ise telomer kısalmasını geciktirmek için telomeraz aktivitesini arttırabilmekte ve bu sebeple telomeraz aktivatörü olarak tanımlanmaktadır. CAG ayrıca anti-inflamatuvar, antioksidan, anti-aging, anti-HIV, anti-viral, anti-tümöral vb. biyoaktivitelere sahiptir (Wang ve diğ., 2009). İnsan, hayvan ve memeli hücre kültürü çalışmalarına rağmen CAG'ın bitkiler üzerindeki etkisi ile ilgili bir çalışma literatürde yoktur. Bu tez çalışmasında, telomeraz aktivatörü olan CAG'ın model organizma *A. thaliana*'nın telomer/telomeraz sistemi üzerindeki etkisi, gen anlatımı ve hücre canlılık analizleri ile incelenmiştir.

Arabidopsis ince kökleri sayesinde konfokal mikroskopta kesit almaya gerek olmadan incelenebilmektedir. Bu tez çalışmasında CAG'ın hücre profilerasyonuna etkisinin belirlenmesi için, konfokal mikroskobunda floresan diasetat ve propidium iyodür boyaları kullanılarak *Arabidopsis* köklerindeki canlı ve ölü hücreler incelenmiştir. Artan CAG konsantrasyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Ayrıca telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesinden sorumlu olan *TER1*, *CTC1*, *TRB1*, *POT1a*, *TAC1*, *BT2* ve *TERT* genlerinin transkript seviyeleri ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile analiz edilmiş olup, gen anlatım profilinde genel olarak artış gözlenmiştir. Yapılan morfolojik analizler ile CAG'ın bitkilerde boy uzamasında artışa, klorofil miktarında ise azalışa neden olduğu gözlenmiştir. Ancak CAG'ın kallus dokularında büyüme üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

Model organizma olan *A. thaliana*'da yapılan bu çalışma ile önceki çalışmalarda hayvan ve insanlardaki iyileştirici özelliği gösterilmiş olan bitkisel kaynaklı telomeraz aktivatörü CAG'ın bitki telomer/telomeraz sistemi üzerindeki etkisi ilk kez araştırılmıştır. Çalışma sonucu ulaşılan veriler ile, CAG'ın bitki telomer biyolojisindeki etkilerinin belirlenmesi için yapılacak ileri çalışmalara katkıda bulunacak olması beklenmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

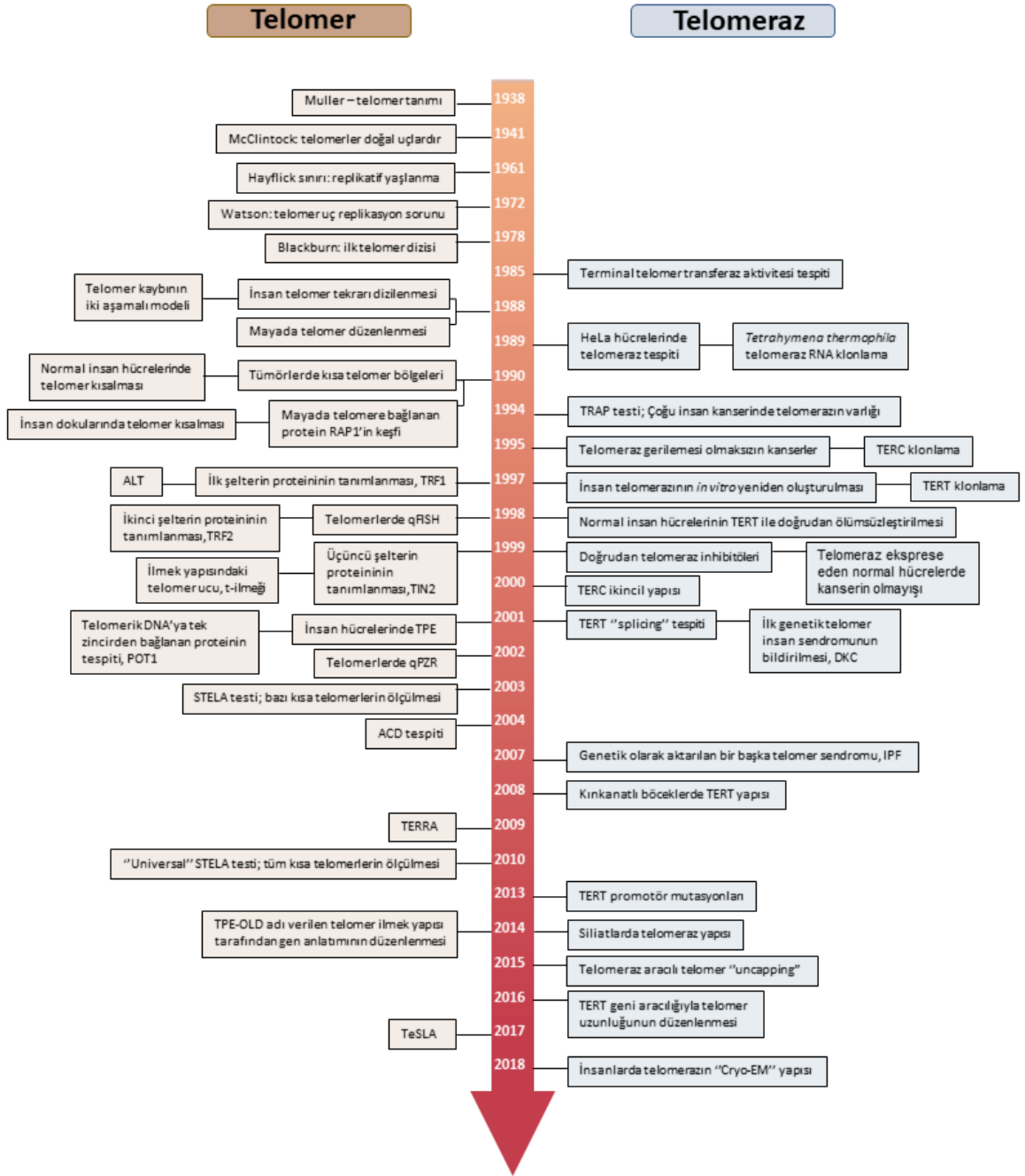
2.1. TELOMER-TARİHSEL PERSPEKTİF

Genetik materyalin kompozisyonunun henüz keşfedilmediği 1938’de, iki bağımsız araştırmacı, Hermann Muller ve Barbara McClintock kromozomların ucundaki özel bir yapının varlığı üzerine çalışmalar yapmış ve kromozom uç bölgelerinin genom kararlılığı açısından önemini ortaya koymuşlardır. Barbara McClintock *Zea mays* üzerinde mayotik anafazdaki kırık kromatit uçlarını gözlemlemiş ve kırılan bazı kromozomların uçlarının birleşebileceğini keşfetmiştir. Dahası normal kromozomların uç bölgelerinin doğal özellikleri ile bundan korunduğunu gözlemlemiştir (McClintock, 1938). Aynı zamanda Hermann Muller ise radyasyona maruz kalarak parçalanmış meyve sineği kromozomlarını araştırırken doğal uçların füzyon yolu ile birleşmediğini belirlemiştir. Bu uç bölge yapılarına atıfta bulunarak telomer (yunanca; telo-uç, mere-kısım) terimini türetmiş ve işlevlerinin “kromozom ucunun kapatılması” olduğunu belirtmiştir (Muller, 1938).

1953’te çift sarmal yapıdaki DNA’nın Francis Crick ve James Watson tarafından keşfedilmesinin ardından DNA replikasyon mekanizmaları açıklığa kavuşmuştur. Ardından 1970’lerin başında, Alexey Olovnikov ile James Watson uç replikasyon sorununu birbirlerinden bağımsız olarak tanımlamıştır. James Watson bu sorunun, DNA polimerazın sadece 5’-3’ doğrultusunda DNA replikasyonunu yapması, RNA primerinin uçtan kesilip çıkarılması ve primer olmadan nükleotidler ekleyememesi nedeniyle replikasyon sırasında DNA’nın kesintili zincirinin 3’ ucunda ortaya çıkan boşlukların tam olarak sentezlenememesi ile meydana geldiğini ileri sürmüştür (Watson, 1972). Alexey Olovnikov ise doğrusal DNA kromozomlarının uçlarının her hücre bölünmesinde kısaldığını, hatta bu kromozom uç bölgelerin kaybının Hayflick’in de ileri sürdüğü gibi hücresel yaşlanmanın, hücrelerin doğal bir özelliği olması ile ilişkilendirilebileceğini öne sürmüştür (Olovnikov, 1971, 1973).

1978’de Elizabeth Blackburn, tek hücreli ökaryotik silikat olan *Tetrahymena*’nın DNA dizi haritalama çalışmalarını sürdürürken kromozomların sonunda belirli tekrar dizi bölgeleri (TTGGGG) olduğunu gözlemlemiştir (Blackburn ve Gall, 1978). Doğrusal DNA’nın nükleazlar tarafından parçalanmasını önleyerek kromozom bütünlüğünü korumaya katkıda bulunan bu özel diziler 'telomer' olarak adlandırılmıştır. Szostack ve Blackburn, tomurcuklanan mayada doğrusallaştırılmış bir plazmidin uçlarına *Tetrahymena*’nın telomer dizilerini yerleştirmiştir.

Çalışma sonucunda, *Tetrahymena* dizilerinin kararlı kaldığı gözlenmiş olup, maya telomer dizileri ise *Tetrahymena* telomer dizisi tekrarlarının uçları üzerine sentezlenmiştir (Szostak ve Blackburn, 1982). Farklı bir türde de aynı bulgunun gözlemlenmesi, ökaryotlarda telomer dizilerinin türler arası korunduğunun düşünülmesine sebep olmuştur. Maya telomer dizileri, *Tetrahymena* telomer dizilerinden farklı hegzamerik tekrarlar oldukları için, bu sonuç mayanın DNA sentezini gerçekleştirirken *Tetrahymena* DNA'sını kalıp olarak kullanmadığını göstermiştir (Shampay ve diğ., 1984). 1985'de Greider ve Blackburn'un *Tetrahymena* ile yaptıkları çalışmalar terminal transferaz aktivitesi gösteren daha sonra telomeraz olarak adlandırılacak olan "telomer transferaz" enziminin keşfedilmesini sağlamıştır. Bu sayede Szostak, Greider ve Blackburn ile birlikte 2009 Nobel Tıp Ödülü'nü almaya hak kazanmıştır (Greider ve Blackburn, 1985). Şekil 2.1'de telomer/telomeraz biyolojisini açıklamada önemli rol oynayan çalışmaların tarihsel sıralaması görülmektedir.



Şekil 2.1: Telomer ve telomeraz biyolojisindeki gelişmelerin şematik gösterimi (Shay ve Wright, 2019).

2.2. TELOMERİK DİZİ

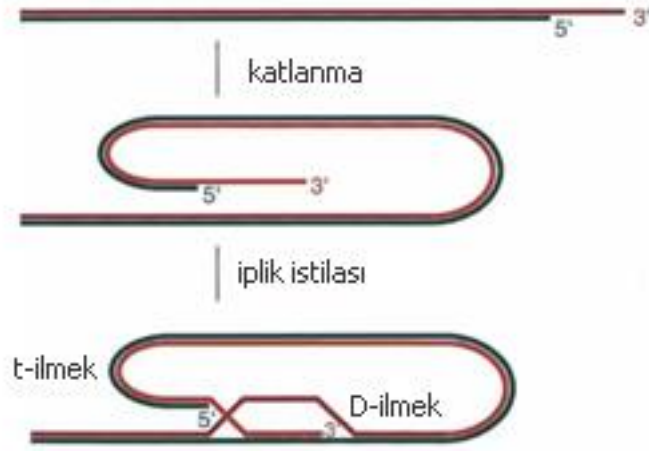
Farklı türler arasında telomerik dizi tekrarlarının içeriği çok az değişiklik göstermektedir. Telomerik tekrarların yüksek derecede korunma durumu, telomerik DNA ile telomere bağlanan proteinler arasındaki etkileşimin sonucudur. Birkaç tür dışında, bitkiler genellikle TTTAGGG telomerik dizi tekrarına sahiptir.

Telomer tekrarlarının uzunluğu türler arasında geniş aralıkta değişiklik göstermekteyken, tür içinde bu değişiklik oldukça dar aralıktadır (Tablo 2.1). İki temel yaklaşım kullanılarak telomerlerin işlevsel olduğu minimum uzunluk tanımlanmıştır. Bu yaklaşımlardan ilki, telomeraz içermeyen hücrelerdeki en kısa telomerlerin PZR temelli ölçümleridir. İkinci yöntem ise klonlanmış telomerik füzyonlardan geri kazanılan telomer tekrar sayısının analizidir (Heacock ve diğ., 2004; Capper ve diğ., 2007). Prensip olarak her iki yöntem, telomer tekrarlarının işlevsel olmayan bir uzunluğa kadar kısaldığında füzyon oluşturduğu için PZR ile çoğaltılamayacağı temeline dayanır. *Arabidopsis*'te yapılan çalışmalar ile telomer tekrarlarının işlevsel olduğu minimum uzunluğun ortalama 350 bç, bu tekrarlar arasında en kısa olanın ise 260 bç olduğu tespit edilmiştir. Füzyon temelli araştırmalarda ise, telomerik DNA uzunluğunun 120-450 bç aralığında değişiklik gösterdiği ve ortalama 260 bç uzunluğunda olduğu gösterilmiştir (Heacock ve diğ., 2004). Bu bulgular kromozomların uçtan uca füzyondan korunması için minimum telomerik DNA dizisinin 260-450 bç arasında olması gerektiğini göstermiştir.

Tablo 2.1: Bazı model organizmalarda telomerik dizi ve ortalama uzunluğu.

Telomerik tekrar dizisi	Telomer dizi uzunluğu (kb)	Organizma
TTTAGGG	2-7	<i>Arabidopsis thaliana</i>
TTTAGGG	2-40	<i>Maize</i>
TTTAGGG	40-160	<i>Nicotiana tabacum</i>
TTTTGGGG	0.25-0.4	<i>Tetrahymena</i>
TTAGGG	2-15	<i>Homo sapiens</i>
TTAGGG	20-150	<i>Mus musculus</i>
TTACAG ₂₋₃	0.3	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
G ₂₋₃ (TG) ₁₋₆	0.3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Kromozom yapısı ele alındığında, DNA'nın 3' zincirinin uç kısmının Guanince zengin olup diğer ucundan daha uzun olduğu görülmüş ve bu bölge G-çıkıntısı ("G-overloop") olarak adlandırılmıştır. G-çıkıntısı geriye doğru katlanarak t-ilmeği ("t-loop") adı verilen üçüncül bir yapı oluşturur ve bu kıvrım yapısı kromozomun ucunu koruyarak DNA hasarını önlemektedir (Şekil 2.2).



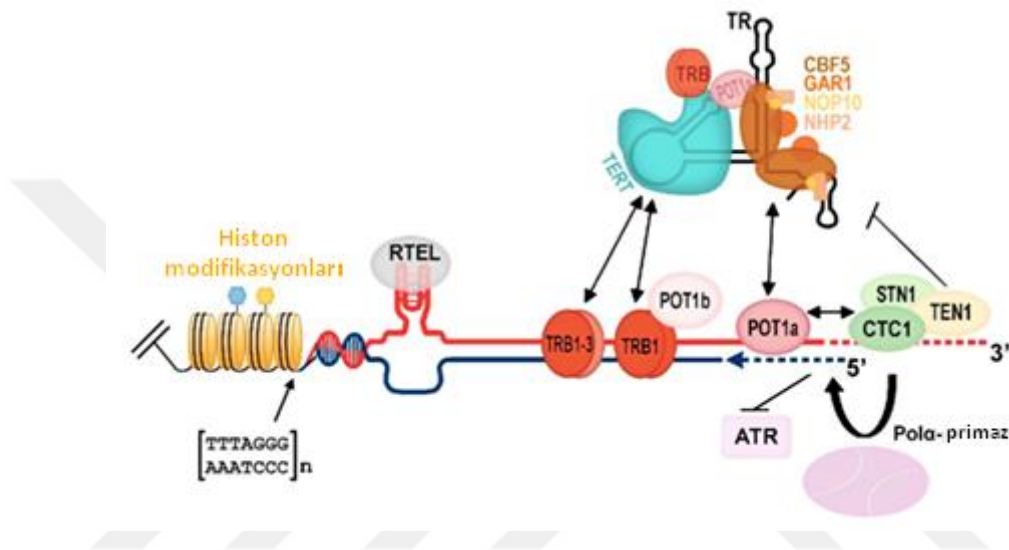
Şekil 2.2: t-ilmek yapısı (de Lange, 2005).

2.3. TELOMERE BAĞLANAN PROTEİNLER

Telomer-telomerase sisteminin düzenlenmesi ve kromozom ucunun korunması telomerler ile ilişkilendirilen pek çok proteinin birlikte çalışması ile gerçekleşmektedir. Telomerik kromatinin temel elemanları, özgün olarak telomere bağlanan proteinlerdir. Bu proteinler DNA'nın tek zincirine veya çift zincirine bağlanma özelliklerine göre ikiye ayrılmaktadır. Şelterin ("Shelterin") ve CST (Cdc13-Stn1-Ten1), telomere bağlanan iki temel protein kompleksi olarak tanımlanmıştır. Altı proteinden oluşan şelterin kompleksi omurgalılarda keşfedilmiş olup, maya ve bitkilerde de çeşitli bileşenleri tanımlanmıştır (de Lange, 2005). Şelterin, telomerik DNA'nın çift zincirine bağlanan protein olan TRF1 ve TRF2; TRF2 ile ilişkili ancak DNA'ya bağlanmayan RAP1; DNA'nın tek zincirine bağlanan heterodimer yapıdaki TPP1/POT1; DNA'nın tek zincir ve çift zincire bağlanan şelterin bileşenleri arasında köprü görevi gören TIN2'den meydana gelmektedir (Palm ve de Lange, 2008).

TRF1 ve TRF2, Myb domaini içermektedir ve bu domain DNA'nın çift zincirine bağlanan proteinlerin spesifik olarak telomerik DNA'ya bağlanmasına aracılık etmektedir (Broccoli ve diğ., 1997; Court ve diğ., 2005). RAP1, TRF2'ye bağlanmaktadır (Arat ve Griffith, 2012). TIN2, POT1 ile etkileşime giren TPP1'e bağlanmaktadır (Takai ve diğ., 2011). POT1, Guanin zengin DNA'nın tek zinciri ile oligonükleotit/oligosakkarit bağlayan katlama (OB katlama), ("oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold, OB-fold") yoluyla etkileşime girerek telomerik DNA'yı nükleazlardan korumaktadır (Baumann ve Cech, 2001). Sfeir ve de Lange

(2012), şelтерin kompleksinin tamamen uzaklaştırılmasının, uç koruma sorununa ("end-protection problem") yol açtığını ve bu nedenle de şelтерlerinin kromozomların uç koruma sorununu çözmek için DNA hasar cevabı faktörleriyle nasıl etkileşime girdiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak omurgalılarda herhangi bir şelтерin bileşeninin yokluğu, telomer bütünlüğü üzerinde ciddi bir negatif etkiye sahiptir ve bu bileşenlerin her biri kromozom uçlarının korunması için gerekli olduğundan eksiklikleri öldürücü olabilmektedir.



Şekil 2.3: *A. thaliana* telomer kompleksinin şematik görünümü.

Arabidopsis telomerazı, TRB proteinleri ve POT1a ile ilişkilidir. TRB proteinleri TERT ve POT1b ile etkileşime girer ve bu proteinler kromozomal uçlarda lokalize olduklarında bitki şelterin kompleksinin bileşenleri olarak işlev görebilir. Bitkiler, küçük nükleolar RNA'lara (CBF5, GAR1, NOP10, NHP2) sahiptir. POT1a, bu küçük RNA'lar içerisinde disklerin ortologu olan CBF5 ile etkileşime girmektedir. CST kompleksi, telomerik DNA'nın etkin bir şekilde replikasyonu için görev almaktadır. Ayrıca, bitki RTEL proteini de (Telomer uzama helikazı düzenleyicisi "Regulator of telomere elongation helicase") telomer homeostazına katkıda bulunmaktadır (Schrumpfová ve diğ., 2019).

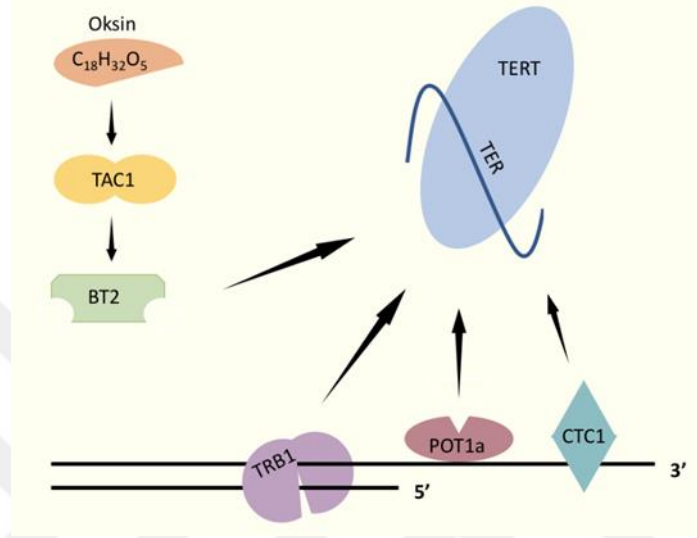
Arabidopsis genomunda yapılan bir araştırma, tek bir Myb domaini taşıyan 12 tane proteini ortaya çıkarmıştır (Karamysheva ve diğ., 2004). Bu proteinler, insan TRF1 ve TRF2 proteinlerinde olduğu gibi C-uç (“C-terminal”) bölgesinde bir Myb domaini içermektedirler ve bu nedenle TRF benzeri (TRFL) proteinler olarak adlandırılmaktadır. TRFL proteinleri, aile I ve aile II olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Aile I, *Arabidopsis*'te birbirine yakın ilişkili altı proteinden (TBP1, TRP1, TRFL1, TRFL2, TRFL4 ve TRFL9) oluşmaktadır (Chen ve diğ., 2001; Hwang ve diğ., 2001; Karamysheva ve diğ., 2004). Homolog proteinler ayrıca pirinçte (RTBP1) ve tütünde (NgTRF1) tanımlanmıştır (Yu ve diğ., 2000; Yang ve diğ., 2003). Bu ailenin karakteristik özellikleri, merkezi bölgede ubikitin benzeri bir domain taşıması ile

C-terminalinde Myb domaininin 40 amino asitlik uzantısını bulundurmasıdır. Aile I proteinleri homodimerler oluşturur ve hepsi telomerik DNA'nın çift zincirine bağlanmaktadır. Aile II proteinleri olan TRFL3, 5, 6, 7, 8, 10 ise homodimerler oluşturmaz ve telomerik DNA'ya *in vitro*'da bağlanamazlar (Karamysheva ve diğ., 2004). Memeli TRF proteinlerinin *Arabidopsis* ortologları olan TRFL proteinlerinde telomer-telomeraz sistemi ile ilişkili bir işlev bulunamamıştır (Fulcher ve Riha, 2016). Bununla birlikte, *A. thaliana*'da yapılmış yakın tarihli bir çalışmada, TRFL ailesinin üyeleri olan TRFL2 ve TRP1 ile TERT arasındaki protein-protein etkileşimleri ortaya konmuştur (Schrumpfová ve diğ., 2014; Dokládál ve diğ., 2018).

Şelterinden sonra temel telomere bağlanan ikinci kompleks olarak değerlendirilen CST kompleksinin başlangıçta mayalara özgü olduğu düşünülmüş, ancak yapılan araştırmalarla telomer-telomeraz sistemine katkıda bulunmak için çeşitli organizmalarda var olduğu bildirilmiştir. Mayalarda, CST kompleksi Cdc13, Stn1 ve Ten1'i içerirken; memelilerde CST kompleksi Ctc1, Stn1 ve Ten1'den oluşmaktadır (Price ve diğ., 2010). Üç CST geni de telomer devamlılığı için önemlidir (Garvik ve diğ., 1995; Nugent ve diğ., 1996; Grandin ve diğ., 1997; Grandin ve diğ., 2001). CST, çok işlevli, telomerik DNA'nın tek zincirine bağlanan kompleks olarak iş görür ve Cdc13 tarafından yapılan etkileşimler yoluyla telomer bölgesinin korunmasını sağlamak için G-çıkıntısı ile ilişkilidir (Gao ve diğ., 2007; Sun ve diğ., 2009). Daha sonra bitkilerde ve insanlarda yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar, CTC1'in işlevlerinin maya Cdc13 proteini ile çakıştığını göstermiştir (Nelson ve Shippen, 2012). CST kompleksinin, *Arabidopsis*'te telomerazın telomerik DNA'ya bağlanmasını, uç birleştirme rekombinasyon yollarını ve ATR-bağımlı DNA hasar cevabının aktivasyonunu kontrol ettiği gösterilmiştir (Amiard ve diğ., 2011; Leehy ve diğ., 2013).

CST kompleksindeki herhangi bir mutasyonun, *Arabidopsis*'te ciddi morfolojik kusurlara, telomer uzunluğunda düşüşe, kromozomal füzyonlara ve G-çıkıntısının uzamasına neden olabileceği bulunmuştur (Song ve diğ., 2008; Surovtseva ve diğ., 2009; Leehy ve diğ., 2013). Maya ve bitkilerde yapılan çalışmalar, CST bileşenlerinin kaybı ile ilgili oldukça zarar verici sonuçları ortaya koyarken, insan hücreleri ile yapılan çalışmalarda nispeten daha az zararlı etkilerle karşılaşmıştır. Bununla birlikte, kök hücre ile ilişkili iki önemli insan hastalığı *Coats* ve *diskeratozis konjenita* CTC1'deki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (Anderson ve diğ., 2012; Keller ve diğ., 2012).

Bitkiler hem şelternin hem de CST bileşenlerini içerse de, bu sistemlerin işlevleri omurgalılara kıyasla maya ile daha yakın olduğu bildirilmiştir (Nelson ve Shippen, 2012). Ayrıca, bitki genomlarında şelternin proteinlerinin sadece bir kısmı tanımlanabilmiştir ve bu durum bitki kromozom uçlarını korumak için alternatif yolların varlığını düşündürmektedir.



Şekil 2.4: Bu tez çalışmasında gen anlatım analizi yapılan telomer proteinlerinin şematik gösterimi.

Telomerazın düzenlenmesinde rol oynayan proteinlerden bazıları, TERT ve TER ile etkileşim halindedir. TAC1'in anlatımı oksin hormonu ile artış göstermektedir. Artan TAC1 anlatımı ise BT2'yi aktive etmektedir. Bu durum, TERT gen anlatımının artmasına ve telomeraz aktivitesinde artışa neden olur. TRB1, TERT ile etkileşime girerek telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesinde görev almaktadır. Şelternin kompleksinin bir üyesi olan POT1a ise telomerazın TER bölgesine bağlanır ve telomeraz aktivitesinin pozitif regülatörlerinden biri olarak işlev görür. CST kompleksinin üyesi olan CTC1 de telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesi için mutlak gerekli proteinlerden biridir.

A. thaliana'da telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesi ile ilişkili olan proteinler; katalitik alt birim TERT ile ilişkili olanlar (18 tane), RNA alt birimi TER ile ilişkili olanlar (9 tane), telomerik DNA'nın çift zincirine bağlananlar (10 tane) ve telomerik DNA'nın tek zincirine bağlananlar (10 tane) olmak üzere gruplandırılmıştır (Schrumpfová ve diğ., 2019). Bu dört protein grubunu temsil etmeleri için, telomer/telomeraz sistemi üzerindeki etkinlikleri göz önüne alınarak Şekil 2.4'de gösterilen proteinler bu tez çalışmasında kullanılmak üzere seçilmiştir.

2.4. TELOMERAZ ENZİMİ

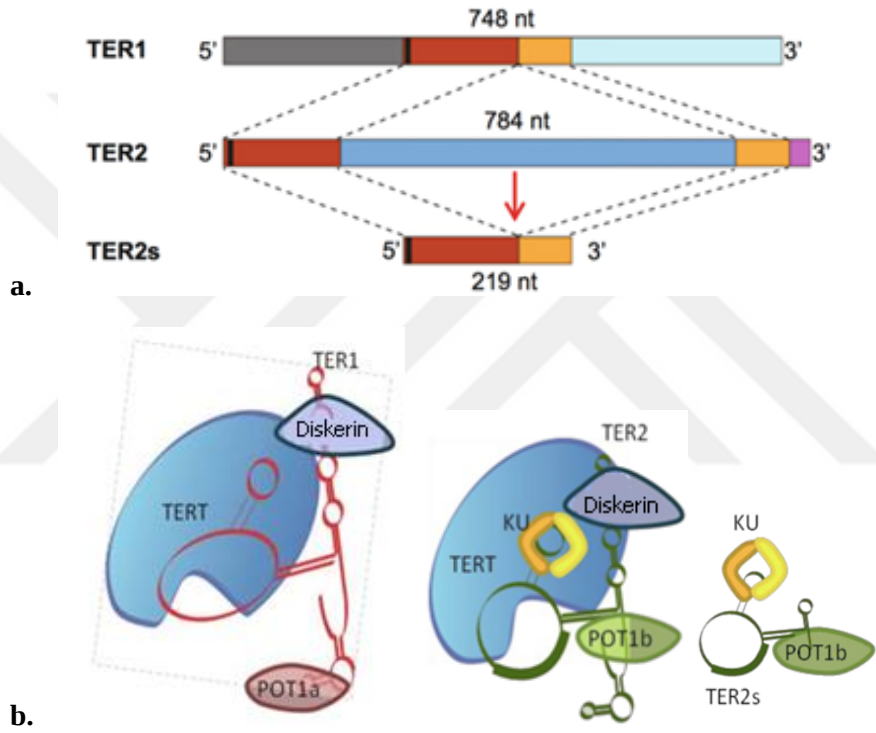
Telomerazın keşfi, kanser biyolojisinin yanı sıra hücrel kararlılığa katkısı ile telomer biyolojisine karşı olan ilgiyi arttırmıştır. Alexey Olovnikov ve James Watson'ın tahmin ettiği

gibi, hücrelerin uç replikasyon sorununun üstesinden gelmek için bir mekanizmaya sahip olması gerekmektedir. Telomer kısalmasının, telomerase yokluğunda sınırlı sayıda hücre bölünmeye bağlı olarak "replikatif" yaşlanmaya yol açabilmesinin mümkün olabileceği düşünülmüştür. Hayflick, insan hücre hatlarında, hücre bölünmesi durmadan önce oluşabilecek sınırlı sayıda popülasyon katlanması olduğunu göstermiştir (Hayflick ve Moorhead, 1961). Hayflick sınırı, normal bir insan hücre popülasyonunun hücre bölünmesi durmadan önce meydana gelen bölünme sayısı olarak tanımlanmıştır. Telomerlerin organizmanın yaşlanmasına katkıda bulunduğu fikri ise daha sonra önerilmiştir (Harley ve diğ., 1990). Sonuç olarak hücre yaşlanma, kritik bir telomer uzunluğu eşiği ile tanımlanmaktadır.

Bitkiler ve memeliler, yaklaşık 1,4 milyar yıl önce son ortak atalarından ayrılmasına rağmen, kromozom onarımının birçok temel yönü iki sistem arasında ortaktır. Bitki telomerase enzimi yapı olarak omurgalıların telomerase enzimi ile benzerlik göstermektedir. Telomerase katalitik alt birimi olan TERT bölgesinin, Penelope benzeri retroelementlerden türemiş olan ters transkriptaz ile ortak bir atayı paylaşmış olduğu belirlenmiştir (Autexier ve Lue, 2006). Bu gözlem, telomerlerin retrotranspozonlardan meydana geldiği hipotezini desteklemektedir. Retrotranspozonlar, RNA transkripti aracılığıyla "kopyala-ve-yapıştır" mekanizmasına dayalı retrotranspozisyon olayı ile genomda hareket edebilen genetik elementlerdir. Aslında, telomerlerdeki retrotranspozisyon olayı *Drosophila*'da hala devam etmektedir (Pardue ve DeBaryshe, 2003). *A. thaliana* ve *Oryza sativa* genomlarının dizileme çalışmalarından hemen sonra bitki TERT bölgesi ilk defa belirlenmiştir. Yaklaşık olarak 130kD ağırlığında olan AtTERT, büyüklüğü ile insan TERT proteinine benzemektedir. Bitki genomlarında TERT bölgesini kodlayan genlerin omurgalıların TERT'leriyle maya ve siliatlardakine kıyasla daha fazla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fitzgerald ve diğ., 1999; Oguchi ve diğ., 1999; Sýkorová ve diğ., 2006). Daha fazla TERT dizisi geri kazanıldıkça, proteinin yüksek derecede korunmuş olduğu ve telomerase spesifik motifleri içerdiği anlaşılmıştır. Toprak bitkilerinin TERT dizileri hizalanarak oluşturulan filogeniler, bitkiler aleminde tek bir atadan gelme TERT ortologunun var olduğunu doğrulamıştır.

TERT bölgesinden farklı olarak bitki TER bölgelerinin tanımlanması, düşük derecede korunmuşluk göstermesi ve düşük RNA miktarı ile oldukça problemli olmuştur. İlk bitki TER bölgesi, *Arabidopsis* telomerase'nin biyokimyasal olarak saflaştırılmasıyla elde edilmiştir.

Şaşırtıcı bir şekilde, *A. thaliana*, her ikisi de öngörülen telomer kalıbını içeren ancak farklı lokuslar tarafından kodlanan iki TER genini barındırmaktadır. Daha sonraki analizler ise TER1'in çekirdek bölgesine güçlü dizi benzerliğine sahip üçüncü bir TER izoformu olan TER2s'in varlığını göstermiştir (Nelson ve Shippen, 2012). TER2 gen anlatımının, TER2s'den çok daha düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Ayrıca TER1 ve TER2s gen anlatımı, çiçeklerde en üst düzeyde gözlenmiş olup, fideler ile hücre kültürü gibi hızlı bölünen diğer dokulardaki telomeraz aktivitesi ile doğru orantılı olmuştur (Nelson ve Shippen, 2012).



Şekil 2.5: *A. thaliana* TER genlerinin RNA uzunlukları (a) ve görevleri (b).

a: *A. thaliana* TER izoformlarının şema halinde gösterimi. Yüksek oranda benzerlik gösteren bölgeler (>%90) kesikli çizgiler ile gösterilmektedir. TER1 ve TER2, sırasıyla 1 ve 5 numaralı kromozomdaki diziler ile kodlanır, ancak TER2s 529 nükleotit uzunluğundaki araya giren dizinin (mavi) ve 3' 36 nükleotit uzunluğundaki uç bölgesinin (mor) çıkarılmasıyla TER2'den üretilir (Nelson, Beilstein ve Shippen, 2014). b: Üç tane TER ribonükleoprotein (RNP) yapısının şema halinde gösterimi. TER1 RNP telomer devamlılığından sorumludur. TER2 RNP, DNA hasar cevaplarını indükler ve TER1 RNP'yi baskılamaktadır. TER2s RNP'nin fonksiyonu bilinmese de POT1b ve Ku proteinini ile bağlandığı gösterilmiştir (Renfrew, 2014).

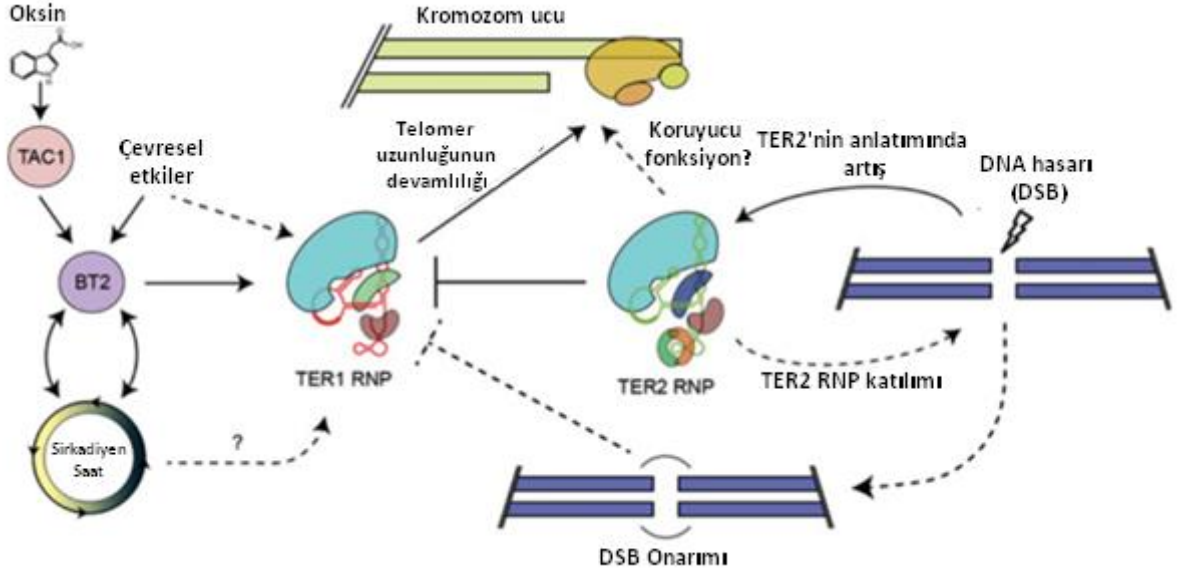
Arabidopsis'te TER1 geninin susturulması, telomeraz aktivitesinde bir azalmaya ve eşzamanlı bir telomer kısalma fenotipine yol açmıştır. Bununla birlikte *in vivo*'da TER1 geninde oluşan mutasyonlar, mutasyona uğramış telomer tekrarlarının eklenmesine yol açabilmektedir. Buna

karşın, TER2 *in vitro*'da TERT için bir kalıp görevi görmesine rağmen, *in vivo*'da telomer tekrarlarının eklenmesine katkı sağlamamaktadır. Ayrıca, TER2'nin T-DNA aracılığıyla susturulması telomer tekrarlarının uzunluğunu değiştirmemiştir. Bunun yerine, TER2 gen anlatım seviyesindeki azalış telomeraz aktivitesinde artışa neden olmuştur. TER2'nin telomerazı negatif olarak düzenlediği sonucu, *in vivo*'da artan TER2 gen anlatımının, TER1 aracılı telomeraz enzim aktivitesini azalttığını gösteren gen anlatımı deneyleriyle desteklenmiştir. Bu nedenle, TER1 telomeraz için fonksiyonel telomer kalıbı iken, TER2 telomeraz enzim aktivitesi için bir negatif regülatör olarak görev görmektedir (Nelson ve Shippen, 2012).

Omurgalılarda ve *Arabidopsis*'te görülen telomeraz enziminin bir diğer korunmuş üyesi, diskerindir. Diskerin, rRNA işleme ve üretiminde önemli fonksiyonlara sahip olan H/ACA snoRNP gen ailesinin bir üyesidir (Collins, 2006). İnsan diskerin genindeki mutasyonlar, anormal telomer onarımı ve düşük hTR seviyeleri ile ilişkili genetik bir hastalık olan *diskeratozis konjenita*'ya neden olmaktadır (Mitchell ve diğ., 1999). *Arabidopsis*'te ise diskerin, RNA bağımlı bir şekilde telomeraz ile ilişkilidir ve spesifik olarak POT1a geni ile etkileşime girmektedir (Kannan ve diğ., 2008). *Arabidopsis*'te diskerin gen bölgesinde *diskeratozis konjenita*'ya neden olan mutasyonlardan birinin kullanılması, *in vitro*'da telomeraz aktivitesinde azalma ile sonuçlanırken, *in vivo*'da ise kısa fakat stabil telomerlerin varlığına neden olmuştur (Watson ve Riha, 2010).

2.4.1. Telomeraz Enziminin Düzenlenmesi

Omurgalılarda telomeraz, hem normal kök hücrelerde hem de kanser hücrelerinde hücresel proliferasyona izin veren iki ucu keskin bir kılıç görevi görmektedir (Artandi ve DePinho, 2009). Bu bakımdan metastatik kanser, bitkiler için endişe konusu olmasa da, bitkiler de farklılaşmış hücrelerde telomeraz aktivitesini bastırmakta ve insanlardaki aktivitesine benzer şekilde, telomeraz enzimini yüksek oranda proliferatif dokular ile üreme hücrelerinde etkin halde tutmaktadır (Fitzgerald ve diğ., 1996; Doonan ve Sablowski, 2010). Bitki TERT mRNA seviyeleri, genç fideler, kök ve sürgünün meristematik bölgeleri, çiçekler ve süspansiyon kültürü dahil hücre popülasyonlarının bölünmesiyle karakterize edilen bitki dokularında doruk noktaya ulaşmaktadır. TERT'in yapraklar gibi düşük seviyelerde anlatımı yapıldığı organlarda ise enzim aktivitesi zorlukla saptanabilmiştir.



Şekil 2.6: Bitkilerde telomeraz regülasyonu.

Bitkilerde telomeraz aktivitesi birçok faktör tarafından düzenlenir. Oksin hormonu da bu faktörler arasında bulunur. Oksin, kalmodulin bağlayıcı protein olan BT2'yi aktive eden transkripsiyon faktörü TAC1'in anlatımını artırır, bu da TERT geninin anlatımının artmasına ve telomeraz aktivitesinde artışa neden olur. BT2, çevresel etkenlere ve sirkadiyen ritme duyarlıdır; bu durum telomeraz aktivitesinin bu uyarılara da duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Çift zincir kırıklarının oluşması, TER1 aracılı telomeraz aktivitesinde bir azalmaya neden olan TER2 mRNA'sının (en sağda) anlatımını artıracak şekilde uyarmaktadır. Telomeraz inhibisyonunun mekanizması bilinmemektedir, ancak TERT, TER2'ye karşı TER1'e kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bir afiniteye sahip olduğundan, rekabetçi inhibisyon söz konusu olabilir. Çift zincir kırıklarının ardından telomeraz aktivitesindeki azalma, kırılma bölgesinde *de novo* telomer oluşum olasılığını azaltır. TER2 proteini, telomer tekrarlarının oluşumunu yönetmez, ancak kromozom sonu korunmasında henüz tanımlanmamış bir rol oynayabilir (Nelson ve diğ., 2014).

TERT mRNA seviyeleri; hücre bölünmesi, hücre büyümesi ve çok çeşitli diğer hücresel aktiviteler için gerekli olan yaygın bir bitki hormonu oksin ile indüklenmektedir. Oksin'in telomeraz aktivitesi üzerindeki etkisi; oksine duyarlı transkripsiyon faktörü olan TAC1 aracılığıyla birçok çevresel etkene cevap verebilen bir sinyal proteini olan BT2'nin anlatımını kısmen arttırmıştır (Ren ve diğ., 2007). TERT mRNA miktarı, artan telomeraz aktivitesinden sorumlu olabilen TAC1 mutantlarında önemli ölçüde yükselmiştir. Şaşırtıcı olarak, BT2 sirkadiyen ritim tarafından düzenlenmektedir ve bu durum telomerazın sirkadiyen ritimden de etkilenebileceğini düşündürmüştür. Oksinin eksojen uygulaması, TAC1 veya BT2'nin aşırı ekspresyonu, artan telomeraz aktivitesine ve olgun dokularda telomeraz aktivitesinin varlığına sebep olmuştur. Tütün ve pirinçte, bu oksine bağlı telomeraz aktivitesindeki artış, telomeraz kompleksinin doğrudan fosforilasyonuna bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, pirinçte

çoklu TERT mRNA varyantlarının ve tütündeki bağımsız lokuslardan transkribe edilen farklı TERT paraloglarının varlığı, telomeraz düzenlemesinin ilave yollarının varlığını düşündürmektedir (Heller-Uszynska ve diğ., 2002; Oguchi ve diğ., 2004; Watson ve Riha, 2011).

Telomeraz aktivitesi, çift zincir kırıklarına cevap olarak hızlı bir şekilde baskılanmaktadır, ancak bu replikasyon çatalının durması veya telomer disfonksiyonu gibi diğer genotoksik stres türlerinden farklı olarak gerçekleşmektedir. Çift zincir kırıklarının tetiklediği telomeraz baskılanması, telomeraz aktivitesini geri getirmek için bir mekanizma sağlar ve enzimin çift zincir kırıklarında uygun olmayan bir şekilde hareket etme fırsatını azaltmaktadır. Bu tepki, kırık bölgenin onarımına yardım ederek genom kararlılığının devamlılığına katkı sağlamaktadır (Nelson ve Shippen, 2012).

2.5. TELOMER HOMEOSTAZİSİ

Telomer tekrarları, dizi ve yapı bakımından oldukça iyi korunmuş olmalarına rağmen telomer tekrarlarının uzunluğunda görülen çeşitlilik, telomer biyolojisinin en şaşırtıcı yönlerinden biri olmuştur. Telomerik dizi ve G-çıkıntısının uzunluğundaki çeşitlilikten neyin sorumlu olduğu ise henüz bilinmemektedir. Ancak her organizma telomer uzunluğu için kendine özgü bir değere sahiptir. Yetersiz telomer uzunluğunun hücresel sonuçları; yaşlanma ve hücre ölümüken, aşırı uzun telomer ise; telomeraz disregülasyonunun belirtileri olarak tanımlanmıştır (Teixeira ve diğ., 2004). Ayrıca, aşırı uzun G-çıkıntıları, ATR yolağı aracılığıyla DNA hasar cevaplarına neden olmaktadır (Denchi ve de Lange, 2007).

Telomer bölgeleri, kısalma ve uzama faaliyetlerine maruz kalabilmektedir. Telomer erozyonu ve replikatif yaşlanma, tümör baskılayıcı mekanizmalardır (Smith ve Pereira-Smith, 1996). Bu nedenle, telomeraz bileşenlerinin sınırlı anlatımı, hücrelerin korunmasına yönelik bir araç oluşturmaktadır. G-çıkıntısına bağlanan proteinler tarafından telomerazın G-çıkıntısına bağlanması, telomer uzamasını önlemek için fiziksel olarak bloke edilebilmektedir (Mitton-Fry ve diğ., 2004; Lei ve diğ., 2005; Zappulla ve diğ., 2009). Nükleazlar da ayrıca telomer-telomeraz sisteminin düzenlenmesi için gerekli enzimlerdir ve telomer uzunluğunu belirli bir noktada tutmaya yardımcı olmaktadır. Mayada, Ku, Rap1, Exo1 nükleaz ve Mre11-Rad50-Xrs2 (MRX) nükleaz kompleksinin karmaşık bir koordinasyonunun hassas bir dengeleyici rol oynamakta olduğu gösterilmiştir (Bonetti ve diğ., 2010).

Telomer tekrarları, birincil olarak telomeraz tarafından uç replikasyon sorununa karşı türe özgü uzunluklarda tutulmaktadır. Ayrıca, rekombinasyona dayalı iki mekanizma, telomer uzunluğunu hızlı bir biçimde değiştirmek için telomer üzerinde etkili olabilmektedir. Bu mekanizmaların her ikisi de telomer disfonksiyonuna cevap olarak aktive edilmektedir. Telomerlerin uzatılması ALT (Telomerlerin Alternatif Uzatılması, “Alternative Lengthening of Telomeres”) ile gerçekleşebilirken, uzun telomerler ise TRD (Telomer Hızlı Delesyonu, “Telomere Rapid Deletion”) ile aniden kısaltılabilmektedir (Murnane, 2012).

Telomerlerin alternatif uzatılması, ilk olarak tomurcuklanan mayada, Est1 proteini olmayan hücre popülasyonlarının bir kısmı yaşlanmadıklarında ve ölmediklerinde ortaya çıkarılmıştır (Lundblad ve Blackburn, 1993). Hayatta kalan hücrelerin Rad50 veya Rad51 rekombinasyonuna sahip olduğu bulunmuştur (McEachern ve Haber, 2006). İnsanlarda, füzyon mayasında ve bitkilerde ALT görülmüştür (Bryan ve diğ., 1997; Nakamura ve diğ., 1998; Akimcheva ve diğ., 2008).

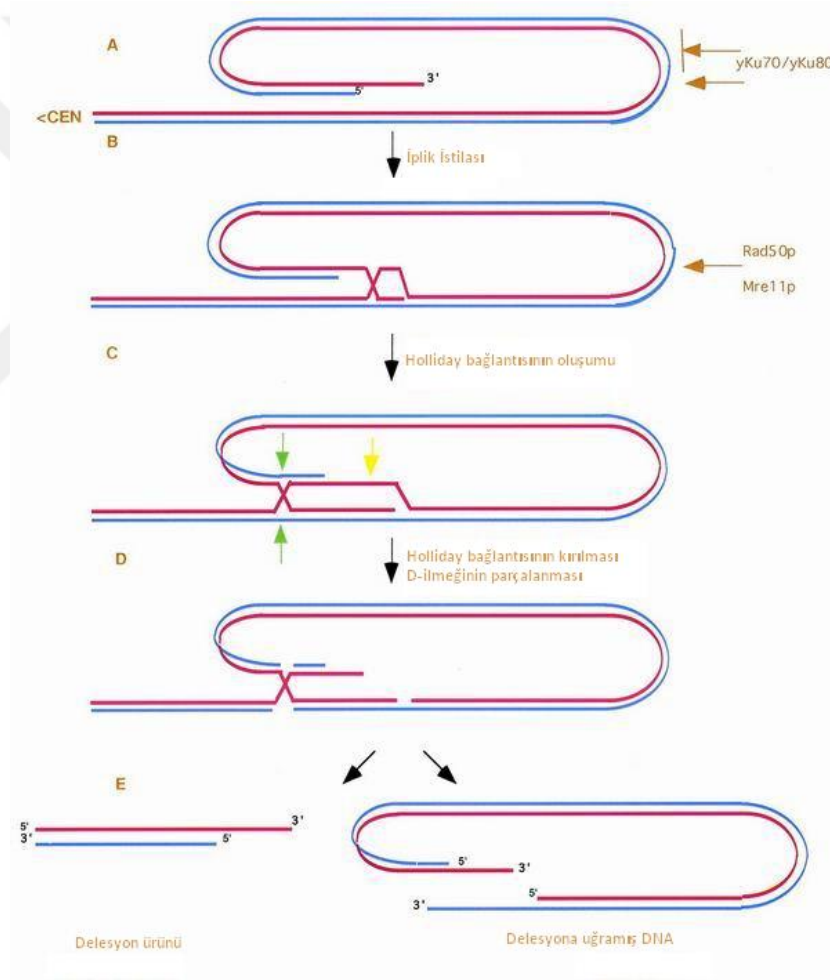


Şekil 2.7: ALT mekanizmasının şematik gösterimi (Shay ve Wright, 2019).

ALT, homolog olmayan kromozomun telomerlerinden birini telomerik DNA şablonu olarak kullanmaktadır. Bunun yanı sıra dairesel hatta doğrusal formlarda ekstrakromozomal telomerik DNA içerebilmektedir. Bu telomerik DNA tekrar dizileri, aynı telomerin başka bir bölgesine ilmek oluşumu ile veya bir kardeş kromatidinin telomeri üzerine eklenebilir.

Telomer hızlı delesyonu, rekombinasyon aracılığıyla telomer bölgelerinin hızlı bir şekilde delesyona uğrayabildiğini göstermektedir (Tomaska ve diğ., 2009). TRD, telomere bağlanan

bileşenlerin herhangi birinin yokluğu durumunda olduğu gibi telomerlerin korunması bozulduğunda gözlenmektedir. Bazı çalışmalar, TRD'yi aşırı uzun telomerlerin onarılması için bir araç olarak önermiş ve TRD'nin hücre tarafından telomer tekrarlarının uzunluklarını belirtilen bir aralıkta tutmak için kullanılan bir mekanizma olduğunu öne sürmüştür (Watson ve diğ., 2005; Pickett ve diğ., 2009). TRD'nin en belirgin özelliklerinden biri, homolog rekombinasyonun yan ürünleri olan ekstra-kromozomal telomerik dairelerin ("Extra-Chromosomal Telomeric Circles, ECTC") birikmesidir. Şaşırtıcı bir şekilde, ECTC'lerin ALT ile de ilişkili olduğu ve telomer bölgesini uzatmak için yuvarlanma halkasının replikasyonda bir kalıp görevi gördüğü öne sürülmüştür.



Şekil 2.8: Telomer Hızlı Delesyonu mekanizmasının şematik gösterimi (Bucholt ve diğ.,2001).

ALT ve TRD kombinasyonu, telomer tekrarlarının uzunluğunun düzenlenmesi için kritik birer araçtır. Ayrıca, rekombinasyon ve telomerazın rolleri, hücrelerin telomer uzunluğu homeostasisini sürdürmek için harcadıkları çabanın miktarını göstermektedir.

2.5.1. Telomer Disfonksiyonu

Telomer tekrarlarının; ekzonükleolitik aktivite, uçtan uca kromozom füzyonu ve kırılma-füzyon-köprü döngüsü olaylarından sakınması gerekmektedir. Bu durumlar, telomer ‘‘capping’’ proteinlerinin sürekli aktiviteleri ile önlenmektedir. DNA replikasyonunu takiben, her yeni kromozomun telomer bölgeleri üzerinde yeni bir protein kompleksi toplanmaktadır (Palm ve de Lange, 2008; Price ve diğ., 2010).

Telomer tekrarlarının hasarı, güçlü bir DNA hasar cevabının (‘‘DNA Damage Response, DDR’’) aktivasyonuna yol açmaktadır. Hücreler öncelikle ATM ve ATR yoluyla DNA hasarına karşı uyarılmaktadır. ATM, kırılma bağlayıcı kompleks olan Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) tarafından çift zincir DNA kırılmalarına cevap verirken, ATR ise DNA’nın tek zincirine bağlanan protein olan heterotrimer RPA’nın (‘‘Replication protein A’’) aktivitesi aracılığıyla DNA’nın tek zincirinin birikimini algılamaktadır (Riha, Heacock ve Shippen, 2006; Symington ve Gautier, 2011). Telomere bağlanan proteinler, DNA ile etkileşimlerine dayanarak DNA hasar cevabını önlemektedir. Şeltrin bileşeni olan TRF2 omurgalı telomerlerini ATM aracılı DNA hasar sinyallemeinden korunurken, POT1 ATR’yi bloke etmektedir (de Lange, 2009). Benzer şekilde, bitki telomerleri, ATR aracılı DNA hasar cevabından CST ile korunmaktadır.

Dikkate değer bir şekilde, TERT geni işlevsiz *Arabidopsis* ile yapılan bir çalışmada, bitkiler en fazla on bitki jenerasyonuna kadar telomeraz olmadan yaşamaya devam edebilmiş ve birleşmiş gövdeler, düzensiz yapraklar ve altıncı nesilden itibaren azalan seviyede fertilite dahil olmak üzere kötüleşen morfolojik kusurlar göstermiştir (Watson ve Riha, 2011). Mutantlar ayrıca korunmayan telomerlerin göstergesi olan yüksek derecede uçtan uca kromozom füzyon olayları sergilemiştir. *Arabidopsis*’teki telomer füzyon bağlantılarının dizi analizleri, telomer kararlılığı için minimum boyutun yaklaşık 1 kb olduğunu göstermiştir; bu uzunluğun altında kromozom uçlarında uç-birleştirme reaksiyonları gerçekleşmektedir (Nelson ve diğ., 2014).

Fonksiyonel olmayan telomerlerin kromozom füzyonlarına uğraması, homolog olmayan uç birleştirme (‘‘Non-homologous end joining, NHEJ’’) yolağındaki Ku ve MRN adlı (Mre11 /

Rad50 / Nbs1) iki kompleksin sorumluluğundadır (Riha ve diğ., 2006; Symington ve Gautier, 2011). Bitkilerde, MRE 11 veya RAD50 yokluğu, DNA hasarı duyarlılığı, gelişimsel kusurlar ve sterilitenin artmasına neden olmuştur. Ku'nun yokluğu, fertilite veya fenotipik anormalliklere yol açmasa da Ku mutantlarının uzatılmış telomer tekrarlarına sahip oldukları gösterilmiştir. Ku, MRE11 veya her iki proteinden yoksun olan bitkilerde, dizi analizi yapılmış ve NHEJ mekanizmasının “uncapped” bitki telomerleri üzerinde etkili olabileceği rolü ortaya konmuştur (Nelson ve diğ., 2014).

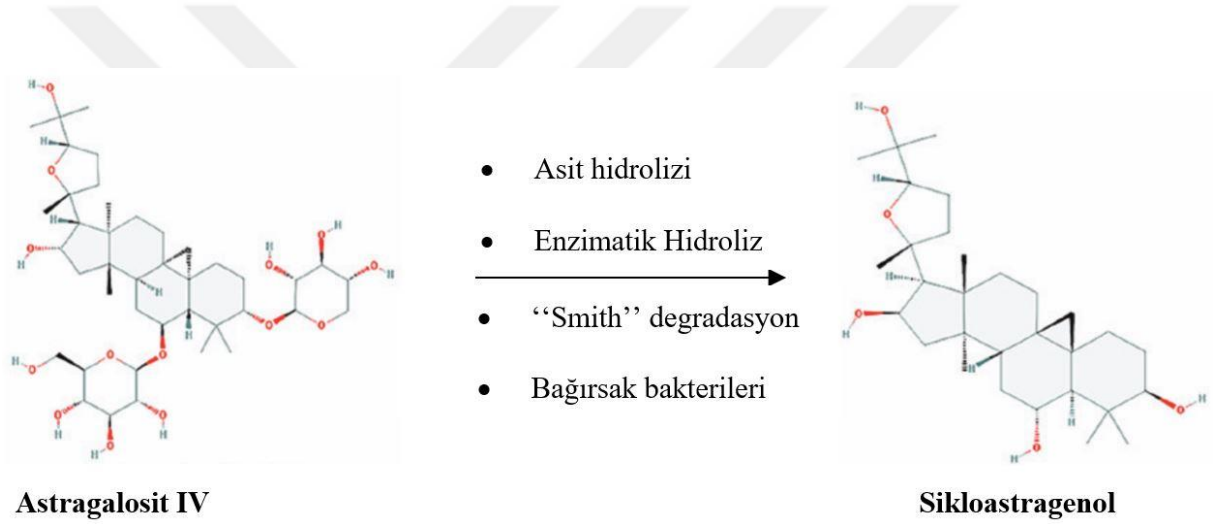
İnsan hücrelerinde, TERT yokluğu ALT mekanizmasını başlatmak için yeterli olmaktadır. Özellikle, insan tümörlerinin %5'i telomeraz reaktivasyonu yoluyla değil ALT yoluyla telomer bölgelerini korumaktadır (Artandi ve DePinho, 2009; Cifuentes-Rojas ve Shippen, 2012). Bitkiler ise yalnızca uzun süre telomeraz yokluğundan sonra ALT mekanizmasını kullanabilmektedir. Sekizinci nesil *TERT* mutantlarından türetilen kalluslar, laboratuvar ortamında süresiz olarak alt kültürlenebilmiştir. Bu dokudaki kromozom uç bölgesinin incelemesi, yaygın genom düzenlemeleri, füzyon olayları ve değişmiş ploidi ile birlikte tam bir telomerik DNA eksikliğini ortaya çıkarmıştır. Kromozom uçlarının korunması için bu telomerazdan bağımsız mekanizma, farklılaşmamış bitki hücrelerinin hayatta kalmasına izin verebilmesine rağmen organizma canlılığı için yeterli olması muhtemel değildir (Nelson ve diğ., 2014).

2.6. SİKLOASTRAGENOL

Astragalus membranaceus, 2.000 yıldan fazla bir süreden beri geleneksel Çin tıbbında kullanılan ve immunostimulan etkileriyle bilinen bir bitkidir. Karaciğeri koruyarak ve bir diüretik olarak işlev görerek bağışıklık fonksiyonlarını arttırdığı bilinmektedir. Ayrıca “anti-aging”, anti-stres, antihipertansif ve anti-bakteriyel özelliklere sahiptir (Shen ve diğ., 2017).

2007 yılında Geron Şirketi, Hong Kong Bilim ve Teknoloji Üniversitesi ile iş birliği içinde, *A. membranaceus* özütlerinde doğal bileşikleri taramış ve sikloastragenol (CAG), telomeraz aktivitesini destekleyen yaşlanma karşıtı bir bileşik olarak tanımlanmıştır. CAG, bir sapogenindir ve *Astragalus membranaceus*'taki ana etken bileşeni olan Astragalosit IV'ün (ASIV) hidroliz ürünüdür (Wang ve diğ., 2014). Artan sayıdaki kanıtlar, CAG'ın araştırma topluluğunda dikkat çeken geniş bir farmakolojik fonksiyon yelpazesine sahip olduğunu

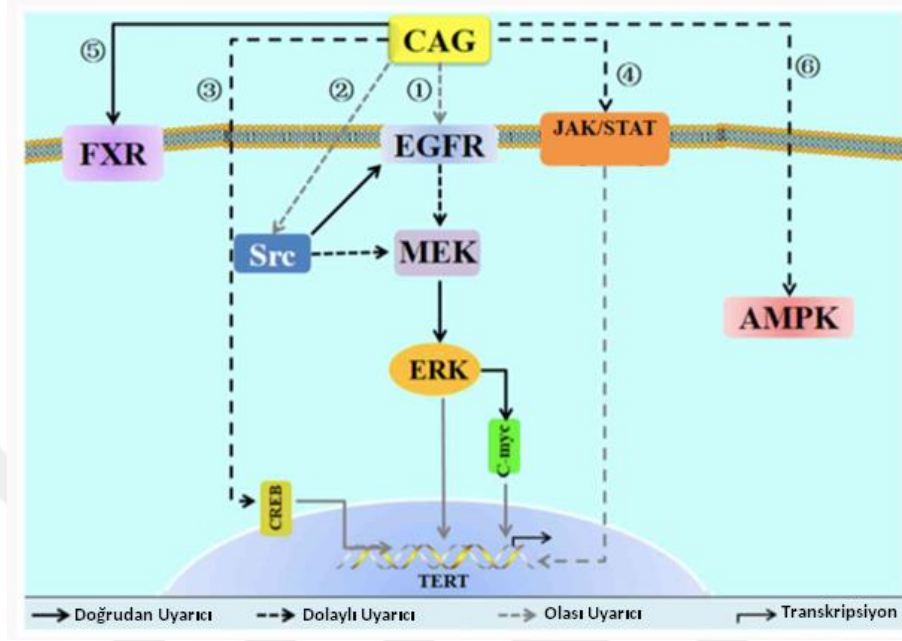
göstermiştir. CAG'ın, “anti-aging”, anti-HIV, anti-viral, anti-tümör ve benzeri dahil olmak üzere ASIV'ninkine benzer biyoaktivite sergilediği belirlenmiştir (Zhao ve diğ., 2015). CAG'ın, HIV ile enfekte hastalarda telomer kısalmasını geciktirmek ve insan CD8 T lenfositlerinin anti-viral fonksiyonunu güçlendirmek için telomeraz aktivitesini arttırabildiği gösterilmiştir (Alexander ve diğ., 2013; Kovalenko ve diğ., 2013). Bugüne kadar CAG insanlarda telomerazı aktive ettiği bilinen tek bileşiktir (Salvador ve diğ., 2016). Ayrıca, CAG gelecek vaat eden yeni nesil “anti-aging” ajanı olarak ticarileştirilmiştir (besin takviyesi, TA-65) (Ip ve diğ., 2014). Belirli bir doz aralığında oral CAG nispeten güvenli olsa da CAG ile ilişkili mekanizmaların altında yatan etkiler net olmadığı için ilişkili olabilecek potansiyel olumsuz reaksiyonların da farkında olunması gerektiği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır.



Şekil 2.9: Sikloastragenol sentezinin şematik gösterimi (Yu ve diğ., 2018).

CAG, Src/MEK/ ERK yolağını aktive ederek telomeraz dahil olmak üzere bazı hücrel olayları aktive edebilmektedir (Yung ve diğ., 2012). CAG'ın, JAK2 ve STAT5b transkripsiyonunun ekspresyonunu indüklediği ve TERT ekspresyonundaki bir artışın ardından STAT5b'nin fosforilasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, JAK/STAT sinyal yolağında “downstream” moleküllerinin anlatımını da arttırmıştır, bu da CAG'ın JAK/STAT sinyal yolağı aracılığıyla telomerazı aktive ettiğini göstermiştir (Yu ve diğ., 2018). Ek olarak, telomerazın CAG aracılı aktivasyonu, CREB (“cAMP Response Element Binding”) ile ilişkilendirilmiştir (Ip ve diğ., 2014). CAG ile bağlantılı mekanizmaların araştırıldığı bu çalışmalar, CAG'ın telomerazı aktive ettiğini ve CREB, MAPK ve JAK/STAT yolaklarıyla ilişkili olduğunu göstermiştir. Bununla

birlikte, mekanizmaları kapsamlı bir şekilde anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



Şekil 2.10: CAG ile ilişkili kuramsal mekanizmalar.

Şekilde ok başları, uyarıcı modifikasyonları temsil etmektedir. Kesintisiz çizgiler, literatüre dayalı doğrudan uyarıcı modifikasyonlardır. Kesik çizgiler, dolaylı uyarıcı değişimleri gösterir; gri kesikli çizgiler olası uyarıcı değişimleri gösterir. CAG 1, 2, 3 ve 4 numaralı yollardan telomerazı aktive edebilir. f5 numaralı yolak üzerinden CAG, hepatiti iyileştirmek için FXR'yi doğrudan uyarır. 6 numaralı yolak boyunca ise CAG, dolaylı olarak AMPK'yi inflamasyonu geliştirmesi için uyarır. CAG, sikloastragenol; FXR, "farnesoid" X reseptörü; AMPK, 5'adenozin monofosfatla aktive edilen protein kinaz; EGFR, epidermal büyüme faktörü reseptörü; ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; MEK, mitojenle aktive edilen protein kinazı; JAK, Janus kinaz; STAT, transkripsiyonun sinyal iletilicileri ve aktivatörleri; TERT, telomeraz ters transkriptaz (Yu ve diğ., 2018).

Mevcut araştırma bulgularına göre, CAG'ın belirli bir doz aralığında nispeten güvenli olduğu ve ciddi olumsuz yan etkileri olmadığı sonucuna varılmıştır. CAG, 19 Kasım 2014'te Gıda ve İlaç İdaresi'nin ("Food ve Drug Administration") bağımsız bir uzman paneli tarafından güvenli ("Generally Recognized as Safe, GRAS") olarak tanınmıştır. Ancak telomeraz aktivasyonu insan tümörlerinin % 80'inde gözlemlendiği için bu rakam telomerazın tümör gelişiminde göz ardı edilemez bir rol oynadığını düşündürmektedir (Shay ve Bacchetti, 1997). Bu nedenle, CAG'ün potansiyel yan etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır.

Sonuç olarak CAG, geniş uygulama olanakları vadeden ve klinik potansiyele sahip bir telomeraz aktivatörüdür. Bununla birlikte, etkinliğini ve potansiyel yan etkilerini tam olarak

anlamak ve hastalıkları tedavi etmek için CAG'ün doğru şekilde kullanılmasını sağlamak adına daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

2.7. TELOMER BİYOLOJİSİNE MODEL ORGANİZMA OLARAK *A. thaliana*

A. thaliana telomer biyolojisi için model organizma olarak kullanılmaktadır. *Arabidopsis*, bitkiler için referans bir bitkidir ve daha yüksek ökaryotlar için karşılaştırmalı bir model olarak araştırmalarda kullanılmaktadır. *Arabidopsis*, ~ 6 haftalık nispeten kısa bir ömre ve dizilemesi tamamlanmış ~ 130Mb'lık bir genoma sahiptir. *Arabidopsis*'te *Agrobacterium* aracılığıyla yapılan transformasyonlar, T-DNA insersiyon hatlarını içeren geniş kütüphanelerin oluşmasına yol açmıştır ve bu kütüphaneler telomerler ile ilgili bilinen genlerin birçok mutasyonunu taşımaktadır.

Arabidopsis telomer boyutlarının kısa (2-5kb) olması, klasik “Southern blot” prosedürleri kullanarak telomer uzunluğundaki bozulmaları incelemeyi mümkün kılmıştır (Shakirov ve Shippen, 2004). Ayrıca, telomer bölgelerinin üstündeki benzersiz diziler, bireysel kromozom kolu uzunluğunu ve kromozom uçtan uca füzyon olaylarını analiz etmek için farklı PZR primer bağlama bölgelerinin kullanımını sağlamıştır (Heacock ve diğ., 2007). Bitki moleküler biyolojisi ve biyokimya yöntemlerindeki gelişmeler telomer-telomeraz sistemi yolaklarının mekanik detaylarını analiz etmeyi mümkün kılmıştır.

Arabidopsis, diğer model organizmalardan farklı olarak telomer fonksiyon bozukluğuna karşı oldukça toleranslıdır. Diğer organizmalarda ölümcül sonuçlara neden olan, telomer “capping” bileşenlerinde veya ATM ve ATR gibi DDR mediatörlerindeki mutasyonlar *A. thaliana*'da öldürücü olmamaktadır (Watson ve Riha, 2010). Bununla birlikte, bitkiler insanlar ile karşılaştırıldıklarında telomer-telomeraz sisteminin düzenlenmesi bakımından birçok benzerliğe sahiptir. Telomerazın anlatımı, bölünen dokularla sınırlı olup vejetatif organlarda olmamaktadır (Fajkus ve diğ., 1996; Fitzgerald ve diğ., 1996; McKnight ve Shippen, 2004). Mayada olduğu gibi, TERT genindeki bozulmalar yaşlanma fenotiplerine neden olmuştur, ancak telomeraz içermeyen bitkilerin on nesile kadar yaşamlarını devam ettirebildikleri gösterilmiştir (Riha ve diğ., 2001). Bitkilerin telomer dizisi ve yapısı da memeli sistemlerine oldukça benzemektedir. Bu özellikler bir arada, *Arabidopsis*'i karşılaştırmalı biyoloji için önde gelen bir model organizma haline getirmiştir.

2.8. GEN ANLATIM ANALİZLERİ

1958'de Francis Crick, moleküler biyoloji de santral dogmanın temelini açıklamış ve bu sayede DNA'dan RNA adı verilen bir ara molekülün sentezlendiği ve bu molekülün de hücrelerdeki fonksiyonları gerçekleştiren proteinler ile sonuçlandığının anlaşılmasını sağlamıştır. Günümüzde, biyomedikal araştırmalar belirli bir hastalığı geliştiren mekanizmaları açıklamaya çalışmaktadır ve bu nedenle gen anlatım çalışmalarının bu çalışmalar için büyük bir kaynak olduğu kanıtlanmıştır. Gen anlatım çalışmaları, belirli bir genin haberci RNA (mRNA) seviyelerini saptamaya ve ölçmeye yöneliktir. RNA-bazlı gen anlatım çalışmalarının geliştirilmesi, 1977'de Alwine ve diğerleri tarafından “Northern Blot” ile başlamıştır. 1969'da Gall ve Pardue, ile John ve ark. bağımsız olarak *in situ* hibridizasyonu geliştirmiştir. Ancak bu teknik yaklaşık 20 yıl sonra mRNA'yı saptamak için kullanılmaya başlanmıştır (Coghlan ve diğ., 1984). Günümüzde ise transkriptom analizi için en yaygın kullanılan teknikler; ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR), gerçek zamanlı PZR (“qPCR”), DNA “microarray”, ve RNA dizileme (“RNAseq”)’dir. Yapılacak araştırmaların amacına göre hangi yöntemin daha avantajlı olduğu farklılık göstermektedir.

RT-PZR; hücre ve dokulardan izole edilen RNA moleküllerinin, ters transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA sentezinin gerçekleştiği ardından PZR’da kalıp olarak kullanıldığı ve dolayısıyla gen anlatım analizlerinin yapılabilirdiği bir yöntemdir. Bu metod hassas, hızlı ve kolay uygulanan bir yöntem olarak değerlendirilmektedir.

2.9. HÜCRE CANLILIĞININ İZLENMESİ

Hücrelerin canlılık düzeyleri ve proliferasyon oranları, hücre sağlığının iyi birer belirteçidir. Kimyasal maddeler, hücre sağlığını ve metabolizmasını olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu maddelerin hücre canlılığı üzerindeki etkisinin analizi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Kullanılan yöntemler, kolorimetrik (Kristal viyole testi), florometrik (Alamar mavisi testi) ve luminometrik (ATP biyoluminesans testi) olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Aslantürk, 2018).

Florometrik yöntemde, canlı ve canlı olmayan hücreleri ayırmak için çift renkli floresan boyama kullanılmaktadır. Canlı hücreler, sağlam plazma membranına sahip olan hücrelerdir ve hücre içi esteraz aktivitesinin varlığı ile ölü hücrelerden ayırt edilebilmektedir. Bu aktivite, floresan diasetatin veya ilgili bileşiklerin (karboksifloresan vb.) enzimatik hidrolizi yoluyla

gerçekleşmektedir. Bu bileşikler membran geçirgendir ve floresan ışıma yapmazlar. Bitki hücresi içerisinde bu maddelerin, yüksek polar floresan bileşiklere hidrolizi gerçekleşmektedir. Polar yapıları nedeniyle, bu bileşikler plazma zarını geçemediklerinden canlı hücrelerde tutulurlar ve sitoplazma içinde yoğun bir yeşil floresan ışıma oluştururlar. Propidium iyodür ve etidyum homodimeri-I gibi ilgili bileşikler ise ancak hasar görmüş plazma membranına sahip hücrelere girebilmektedir ve çift zincirli nükleik asitlere bağlanmaktadır. Bu durum canlı olmayan hücrelerde, özellikle de nükleik asit konsantrasyonunun en yüksek olduğu nukleusda parlak kırmızı bir floresan ışıma ile sonuçlanmaktadır. Sonuç olarak hücre canlılığı analizi, çalışılan tür ve dokulara bağlı olarak boya konsantrasyonu, boyama süresi gibi değişkenler optimize edildikten sonra konfokal mikroskobu aracılığıyla değerlendirilmektedir.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada model organizma olan *A. thaliana*'nın tohumları *Colombia (Col-0)*, Bielefeld Üniversitesi, Biyoteknoloji Merkezi, Genom Araştırma Bölümü'nden Dr. Ralf Stracke tarafından temin edilmiş ve bu tohumlar steril koşullar altında bitkilerin yetiştirilmesi ve kallus kültürlerinin oluşturulması için kullanılmıştır.

3.2. BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ VE SİKLOASTRAGENOL UYGULAMASI

3.2.1 Besiyerlerinin Hazırlanması

A. thaliana bitki doku kültürü çalışmalarında Murashige ve Skoog (MS) besiyeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). Toplamda 500 mL besiyeri hazırlamak için; 2,2 g MS temel tuz karışımı (Sigma, M5519) ve karbon kaynağı olarak 15 g sukroz (Sigma, 84097) 400 mL distile su içerisinde çözdürüldü. 5 M NaOH (Merck, 1.06462.1000) kullanılarak çözeltinin pH'ı 5,7-5,8 aralığında olacak şekilde ayarlandı. Ardından 4,5 gram agar (Sigma, A1296) eklendikten sonra çözelti hacmi distile su kullanılarak 500 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan besiyeri 121 °C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavda (Nüve, OT 012) steril edildi. Besiyeri 55 °C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine steril 1 mg/mL konsantrasyondaki MS vitamin çözeltisinden (Sigma, M3900) 0,5 mL ilave edilerek 9 cm'lik petri kaplarına 25 mL olacak şekilde paylaştırıldı. Ayrıca deney grubuna ait besiyerlerine, CAG son konsantrasyonu 1 µM ve 10 µM olacak şekilde eklendi.

3.2.2 Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

A. thaliana tohumları 1,5 mL'lik kolonlu mikrosantrifüj tüplere konuldu. Yüzey sterilizasyonu için, tohumlar %70'lik etil alkol (Sigma, 32221) içerisinde 1 dakika bekletilip ardından 1 dakikalık santrifüj ile alkol uzaklaştırıldı. Bu işlem üç kez tekrar edildikten sonra tohumlar %100'lük etil alkol içerisinde 1 dakika boyunca bekletilip santrifüj yapıldı.

3.2.3 Tohumların Çimlendirilmesi ve Bitkilerinin Yetiştirilmesi

Steril edilen tohumlar, MS besiyeri içeren 9 cm çaplı petri kaplarına 30'ar adet ekilip, bitki büyütme kabini içinde çimlenmeye bırakıldı. Bitkilerin çimlendirilmesi ve gelişimi için 25 °C'de 16 saat ışık/8 saat karanlık periyoduna sahip 1400 lux bitki büyütme kabini (Sanyo, MLR-352H) kullanıldı. Tohumların çimlenmesi sonucu elde edilen 7 günlük bitkicikler kontrol grubu

için MS besiyeri içeren, deney grubu için ise 1 µM ve 10 µM CAG içeren cam tüplere (C5916, Sigma) aktarıldı. Bitki büyüme kabinde 21 gün boyunca tutulan bitkilerin boyları ve klorofil miktarı belirlenip fotoğraflandı. Deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

3.2.3.1 Total Klorofil Miktar Tayini

Üç hafta boyunca sikloastragenole maruz bırakılan *A.thaliana* bitkilerinin klorofil miktarı Wiedemann ve diğ.'nin (2007) kullandığı yöntem referans alınarak yapıldı. 100 mg bitki sıvı nitrojenle homojenize edilerek üzerine 2 mL %80 (v/v) aseton (Sigma, 24201) eklendi. Örnekler 5 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvılardan 200 µL'si 96 kuyucuklu plakalara (SARSTEDT, 83.3924) konularak 645 ve 663 nm dalga boyundaki absorbans değerleri spektrometre cihazı (Eon, Biotek) ile belirlendi. Santrifüj sonrası elde edilen pelletler 105°C'de (WiseTherm, HB-48P) 2 saat boyunca kurumaya bırakıldı ve pelletlerin kuru ağırlıkları hassas terazi (Shimadzu, ATX224) ile tartıldı. Klorofil miktarı Denklem 3.1'e göre hesaplandı.

$$T = [(A_{663} \times 0.00802) + (A_{645} \times 0.0202)] \times 2/\text{g kuru ağırlık} \quad (\text{Denklem 3.1})$$

3.2.4 Kallus Kültürlerinin Kurulması

Kallus kültürü oluşturmak için *in vitro* yetiştirilmiş 30 günlük bitkilerin kök kısımları eksplant olarak kullanıldı. Kallus oluşumunu indüklemek üzere 1 mg/L 2,4-D içeren petri kaplarındaki MS besiyerine, her petri kabında yaklaşık 1-2 cm boylarında 10 eksplant olacak şekilde ekim yapıldı ve eksplantlar bitki büyüme kabinde gelişmeye bırakıldı. Bu eksplantlardan elde edilen kallus dokuları, 3 hafta aralıklarla 1 mg/L 2,4-D içeren taze besiyerlerine aktararak alt kültürlendi. Deney grubu örnekleri (9 aylık kallus dokuları) 1 µM ve 10 µM sikloastragenol içeren petri kaplarında 21 gün boyunca bekletildikten sonra ağırlıkları ölçülüp fotoğraflandı. Aşağıdaki Denklem 3.2'den yararlanılarak büyüme indeksleri hesaplandı (Mendonça ve diğ., 2012). Deneyler 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

$$\% \text{Büyüme} : \frac{W_f - W_i}{W_f} \times 100 \quad (\text{Denklem 3.2})$$

W_i : başlangıç kallus ağırlığı W_f : final kallus ağırlığı

3.2.5 Sikloastragenol'ün Hazırlanması

Telomeraz aktivatörü olan sikloastragenol (SMB00372, Sigma) DMSO içersinde çözündürülerek, 10 mM stok solüsyon olacak şekilde hazırlandı ve -20 °C'de muhafaza edildi.

Sikloastragenol'un *A. thaliana* tüm bitki ve kallus dokularına son konsantrasyonları 1 μ M ve 10 μ M olmak üzere iki farklı dozda uygulaması yapıldı.

3.3 GEN ANLATIMINDAKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

3.3.1 Analizler İçin Seçilen Genler

Bitkilerde telomer/telomeraz sistemi üzerine sikloastragenolün etkileri *TER1*, *CTC1*, *TRB1*, *POT1a*, *TAC1*, *BT2* ile *TERT* genlerindeki anlatım seviyesi değişimleri incelenerek değerlendirildi (Sováková ve diğ., 2018). Yöntem olarak RT-PZR kullanıldı. Aktin geni referans gen olarak kullanıldı. Seçilen genlerin özellikleri Tablo 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: Bitkilerde telomer ve/veya telomerazla ilişkili bazı proteinlerin işlevleri.

PROTEİN	İŞLEV	+/T+ *	MUTANTLARDAKİ İŞLEV KAYBINDA TELOMER/TELOMERAZ	REFERANS
TER1	Telomer uzaması için kullanılan kalıp alt birim	+	Telomeraz aktivitesinde düşme, telomer kısalması	(Cifuentes-Rojas ve diğ., 2011)
CTC1	CST kompleksinin üyesi, telomerik DNA'nın sentezi	+	Telomer kısalması	(Surovtseva <i>et al.</i> , 2009)
TRB1	<i>A.thaliana</i> telomer bölgesinin bir bileşeni ve telomeraz ile etkileşim halinde	+	Telomer kısalması	(Schrumpfová ve diğ., 2014)
POT1A	TER1 altbirimi ile etkileşim halinde ve pozitif telomeraz düzenleyicisi	+	Telomer kısalması	(Cifuentes-Rojas ve diğ., 2011)
TAC1	Pozitif telomeraz düzenleyicisi, telomeraz ile oksin sinyallenmesi arasında bağlantı	T+	Belirgin etki yok	(Ren ve diğ., 2004)
BT2	Pozitif telomeraz düzenleyicisi, TAC1 yolağının üyesi	T+	TAC1- telomeraz aktivasyon yolağının etkisizleşmesi	(Ren ve diğ., 2007)
TERT	Telomerazın katalitik alt birimi	+	Telomer kısalması, fertilitenin azalması	(Watson ve Riha, 2011)

* '+' işareti, telomer uzunluğunun pozitif düzenleyicilerini göstermektedir. Eğer mutantlarda protein işlev kaybında telomer fenotipi değişmemiyorsa, proteinlerin telomeraz aktivitesi ile ilişkisi 'T +' ile belirtilmiştir (Sováková ve diğ., 2018).

RT-PZR analizlerinde kullanılmak üzere öncelikle örneklerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.3.2 Total RNA İzolasyonu

Bu çalışmada telomeraz aktivatörü olan sikloastragenolün etkisinde gen anlatım seviyesindeki değişikliklerin analizi için tüm bitki ve kallus dokularından total RNA izolasyonu TRIzol® (Invitrogen, 15596026) kullanılarak gerçekleştirildi.

1. 100 mg olarak hassas terazi de tartılan bitki ve/veya kallus dokuları, soğutulmuş havana sıvı azot eklenerek ezilip toz haline getirildi.
2. Toz haline gelen örneklerin üzerine 1 mL TRIzol eklenerek 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Örnekler 5 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için bekletildi.
3. İnkübasyonun ardından her bir örneğe 0,2 mL kloroform eklenerek mikrosantrifüj tüpleri 10-15 sn boyunca yavaşça ters-düz edilip karıştırıldı. Örnekler 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için bekletildikten sonra 4°C 12.000 x g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi.
4. Santrifüj işleminin ardından üstte kalan renksiz sıvı faz yeni bir 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılıp üzerine 0,5 mL izopropanol eklenip 5 defa yavaşça ters-düz edilip karıştırıldı. Örnekler 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyon için bekletildikten sonra 4°C 12.000 x g'de 10 dakika boyunca santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası RNA tüpün dip kısmında beyaz bir pellet halinde gözlemlendi ve renksiz üst sıvı atılarak pellet 1 mL %75 etanol ile yıkandı ve örnekler 4°C 7500 x g'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrasında etanol uzaklaştırıp, RNA pelleti kuruması için 5-10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
7. Kuruyan RNA pelletlerinin üzerine 50 µL DEPC-dH₂O eklendi. Örnekler ısıtıcı blokta (Biosan, TS-100C) 55°C'de 10-15 dakika tutularak RNA'ların çözünmesi sağlandı.

3.3.2.1 RNA Miktarının Ve Saflığının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların DEPC-dH₂O'da çözünmesi tamamlandıktan sonra µg/µl cinsinden miktarı Denklem 3.3'ye ve saflıkları ise A₂₆₀/A₂₈₀ oranına göre, nanodrop spektrofotometre (Thermo Scientific, Nanodrop 2000) kullanılarak belirlendi.

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

(Denklem 3.3)

3.3.2.2 Formaldehit Agaroz Jel Elektrofözezi

İzole edilen RNA örneğlerinin kalitatif analizi için %1 'lik formaldehit agaroz jel elektrofözezi yapıldı (Tablo 3.2). %1'lik formaldehit agaroz jelin hazırlanması için 0,4 g agaroz (Invitrogen, 16500-500) tartıldıktan sonra DEPC'li ultra saf su içerisine eklenerek ısıtıcıli manyetik karıştırıcıda çözöndüröldü. Çözelti 50-60 °C aralığına kadar soğöduğıunda içerisine 20X MOPS solösyonu ve çekör ocakta formaldehit eklendi. Ardından 3 µL ‘‘SYBR safe’’ jel boyası (Hibrogen, 0117-KK-240) eklendi. Homojen çözelti, jel kasetine dökölerek polimerize olması için 15 dakika boyunca bekletildi. Ardından formaldehit jel, yürötmö tamponu içeren tanka yerleştirilip, 200 ng olacak şekilde sulandırılan RNA örneğleri (5 µl) ile 5 µL denatürasyon tamponu karıştırılarak 10 dakika 65°C'de su banyosunda bekletildi. Denatürasyonun ardından 2 dakika buzda bekletilen örneğlere 2 µL RNA yükleme boyası (R0641, Thermo Fisher Scientific) eklendi. Daha sonra örneğler jel kuyucuklarına yüklendi ve 40 V sabit güğte 2 saat kaset boyunca yürötöldü. Sonuçlar UV jel göröntöleme sistemi (Avegene-Xlite 30R) aracılığıyla bant profillerinin göröntösüne göre değörlendirildi.

Tablo 3.2: %1'lik 40 mL formaldehit agaroz jel hazırlanması için gereklö bileşönlör.

Formaldehit Agaroz Jeli	20 X MOPS (100 mL, pH:7)	Yürötmö Tamponu	RNA Denatürasyon Tamponu
0,4 g Agaroz	8,3704 g MOPS (Sigma, 11K5420)	30 mL 10X MOPS	10 mL Formamid (Sigma,75127)
29,6 mL DEPC'li ultra saf su	0,744 g EDTA (TITRIPLE X 3, K03559321)	5,4 mL Formaldehit (Sigma, 086K3472)	3,5 mL Formaldehit
2 mL 20 X MOPS	2,1776 g NaAc (Sigma, 38F0277)	264,6 mL DEPC'li ultra saf su	1,5 mL 10X MOPS
7 mL %37'lik Formaldehit	80+20 mL DEPC'li ultra saf su		

3.3.3 cDNA sentezi

RNA örneklerinden cDNA'ların sentezi High Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Applied Biosystem, 00709629) kullanılarak gerçekleştirildi. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve cDNA sentez reaksiyon koşulları Tablo 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.3: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri (a) ve reaksiyon koşulları (b).

a

Bileşen adı	Miktarı
10 X RT Buffer	2 µL
25X dNTP Mix (100mM)	0,8 µL
10X RT Random Primer	2 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase 50U/µL	1 µL
Kalıp RNA	2000 ng
Nükleaz içermeyen dH ₂ O	20 µL'ye tamamlanır

b

Sıcaklık (°C)	Süre
25	10 dk
37	120 dk
85	5 dk

Seçilen genlerin ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu için kullanılan primer dizileri Tablo 3.4’de verildi.

Tablo 3.4: Gen anlatımı analizi için kullanılan primer dizileri.

Primer adı	Hedef Primer Nükleotid Dizisi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Beklenen PZR ürün boyutu (bp)
TERT-F	GCGCTAGCTGGCTTTTTTTAGAGATTGTC	57	626
TERT-R	TATGGAACAGTTGATGTGAATC		
POT1a-F	TGTCGCAACAATGATTGGAT	55	169
POT1a-R	CAAATCAAGAACCACGACGA		
CTC1-F	GCCCTGTGTCTGTTGTTCT	62	181
CTC1-R	CAACTCGCAGCCTCTAAACC		
BT2-F	CAGACACAACCCTTGTCACC	60	669
BT2-R	ACATGGTCACCCAGCTGAAG		
TAC1-F	ATGGAAAACATCAAAAACCCTAA	55	209
TAC1-R	ACTCAGACAAAAGCTTATGGAAG		
TER1-F	ACAGAGAACGATGTTCCAAC	55	60
TER1-R	ACAGAGAACGATGTTCCAAC		
TRB1-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGG CTCCATGGGTGCTCCTAAGCAGAAA	57	357
TRB1-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG GTCTTTAGGAAGGGAGAACGTCCTTTT		
AKTİN-F	TGCTGACCGTATGAGCAAA	57	100
AKTİN-R	CTCCGATCCAGACACTGTA		

3.3.4 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Seçilen genlerin primerleri için optimum bağlanma sıcaklığı ve koşulları gradient PZR ile belirledikten sonra gen anlatım analizleri gerçekleştirildi. cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak gerçekleştirilen RT-PZR analizlerinin reaksiyon bileşenleri ve koşulları Tablo 3.5’de verildi.

Tablo 3.5: RT-PZR bileşenleri (a) ve koşulları (b).

a			b			
Bileşen adı	Miktarı (μL)	Son Konsantrasyon	Döngüler	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Steril dH ₂ O	17,8		İlk denatürasyon	94	3dk	1
10X PZR Tamponu	2,5	1X	Denatürasyon	94	30sn	35
25mM MgCl₂	2	2,0 mM	Bağlanma	Primere özgü sıcaklık	30sn	
10mM dNTP	0,5	0,04 mM	Uzama	72	50sn	
10μM ileri primer	0,5	0,2μM	Son Uzama	72	5’	1
10μM geri primer	0,5	0,2μM				
Taq DNA Polimeraz (5U/μL)	0,2	0,4U				
cDNA (1000ng/μL)	1	40ng/μL				

RT-PZR örnekleri, agaroz jel sonrası görüntüledikten sonra ImageJ programı kullanılarak optik densitometreleri ölçüldü (Antiabong, John F ve diğ., 2016). Bu veriler kullanılarak gen anlatım grafikleri çizildi.

3.4 HÜCRE CANLILIK ANALİZİ

A. thaliana kök dokusu hücrelerinin canlılığı, yeşil floresan diasetat ve kırmızı propidium iyodür içeren bitki hücresi canlılık analizi kiti (“Plant Cell Viability Assay Kit”, Sigma PA0100) kullanılarak belirlendi. Hücre canlılık analizi kitinde belirtildiği şekilde hücrelerin boyaması gerçekleştirildikten sonra konfokal mikroskop (Leica SP8) kullanılarak canlı ve ölü hücreler tespit edildi. FDA'nın uyarılması için dalga boyu 488 nm ve 500-550 nm arasında belirlendi. PI uyarılması için ise dalga boyu 552 nm ve 560-650 nm arasında belirlendi.

3.5 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

A. thaliana bitki ve kallus dokuları kullanılarak gerçekleştirilen morfolojik bulgular ile gen anlatım analizlerinin değerlendirilmesi için t-testi kullanıldı. $p < 0.05$ olarak bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Morfolojik deneyler ve gen anlatım analizleri 3 biyolojik tekrarla yapıldı.

4. BULGULAR

4.1 *A. thaliana* BİTKİLERİNİN YETİŞTİRİLMESİ

MS besiyeri içeren petri kaplarına ekimi yapılan 50 adet *A. thaliana* tohumları, bitki büyütme kabininde çimlenmeye bırakıldı. Tohumların %90'ının çimlenmesi sonucu elde edilen 7 günlük bitkicikler MS besiyeri içeren cam tüplere aktarıldı. Cam tüplere aktarılan bitkiler 30 gün (Şekil 4.1) boyunca kültürlendi ve ardından kallus kültürlerinin başlatılması için eksplant olarak kullanıldı.

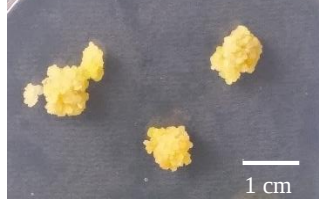


Şekil 4.1: MS besiyerinde kültürlenmiş olan 10,5 cm boyunda 30 günlük *A. thaliana* bitkisi (Bar:1 cm).

4.2 KALLUS KÜLTÜRÜ

Kallus kültürü oluşturmak için 30 günlük bitkilerin kökleri eksplant olarak kullanıldı. Kökler 2'şer cm'lik parçalar halinde kesilip, kallus oluşumunu indüklemek için 1 mg/L 2,4-D içeren MS besiyerine aktarıldı. İlk kallus oluşumu yaklaşık olarak 4 hafta sonra gözlemlendi. Kallus

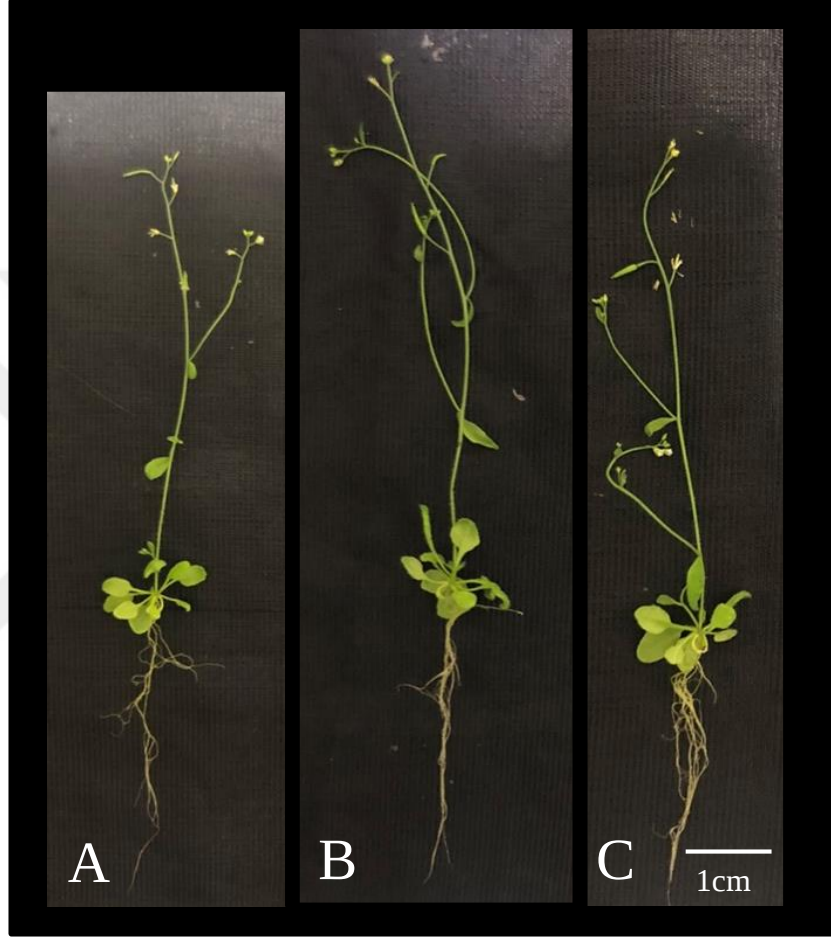
dokuları, 3 hafta aralıklarla 1 mg/L 2,4-D içeren taze besiyerlerine aktarılarak alt kültürlendi. Bu eksplantlardan elde edilen kallusların genel görünümü Şekil 4.2’de verildi.



Şekil 4.2: 1 mg/L 2,4-D içeren MS besiyerinde 9 ay boyunca alt kültürlenmiş *A. thaliana* kallus dokuları (Bar:1 cm).

4.3 SİKLOASTRAGENOL UYGULAMASININ BİTKİ DOKULARI ÜZERİNDEKİ MORFOLOJİK ETKİLERİ

Üç hafta boyunca 0 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında sikloastragenol içeren MS besiyerlerinde yetişen bitkilerde, klorofil miktarı ve boy uzunlukları incelendi. Sikloastragenol uygulaması sonrası bitkilerin genel görünümü Şekil 4.3'te verildi.

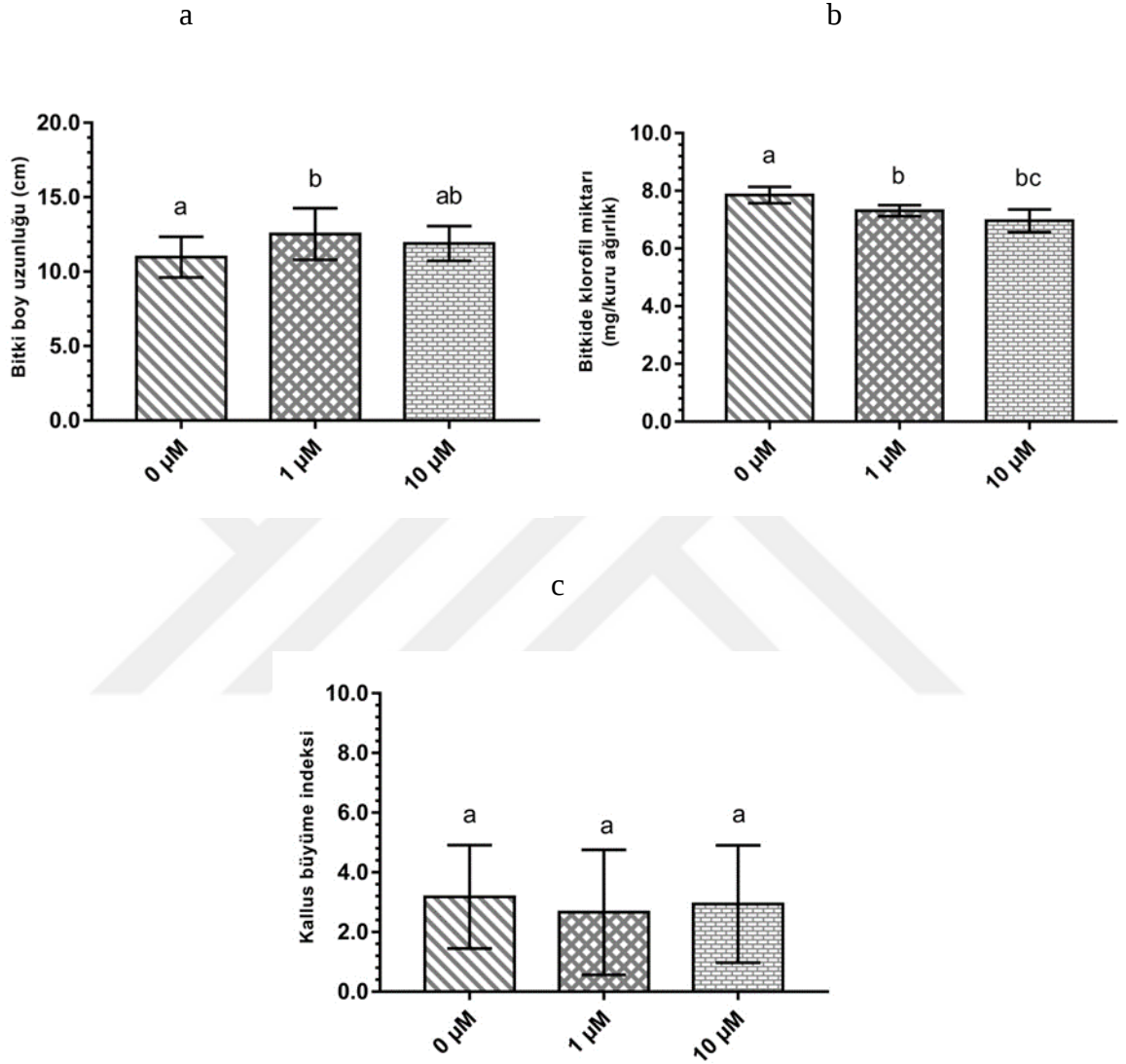


Şekil 4.3: Üç hafta boyunca farklı dozlarda sikloastragenole maruz kalan *A. thaliana* bitkileri.

A, 0 μM konsantrasyonda büyüyen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen bitkileri; B, 1 μM konsantrasyonda büyüyen bitkileri; C, 10 μM konsantrasyonda büyüyen bitkileri temsil etmektedir (Bar:1 cm).

Şekil 4.3'te sikloastragenole maruz kalarak yetişen toplam 33 adet *A. thaliana* bitkilerinin morfolojik analizleri sonucunda ortalama boy uzunluğu, kontrol CAG grubunda $10,844 \pm 1,37$ cm; 1 μM CAG grubunda $12,750 \pm 1,73$ cm; 10 μM CAG grubunda ise $11,688 \pm 1,17$ cm olarak belirlendi. Boy uzunluğu verileri ile yapılan t-testi sonucunda yalnızca kontrol grubu ile 1 μM CAG uygulaması arasında anlamlı şekilde bir artış tespit edildi (Şekil 4.4 a). Deney grupları arasında klorofil miktarı ise kontrol CAG grubunda $7,855 \pm 0,28$ mg; 1 μM CAG grubunda

7,315±0,19 mg; 10 µM CAG grubunda ise 6,965±0,39 mg olarak belirlendi. Bu veriler ile yapılan t-testi sonucunda kontrol ile 1 µM CAG ve kontrol ile 10 µM CAG grupları arasında anlamlı şekilde bir azalış belirlendi (Şekil 4.4 b).



Şekil 4.4: Farklı dozlarda CAG'e maruz kalan *A. thaliana* bitki ve kalluslarında meydana gelen morfolojik değişimler.

a; bitkilerdeki boy uzunluğu değişimleri, b; bitkilerdeki klorofil miktarlarındaki değişimleri, c; kalluslardaki büyüme indeksi değişimlerini göstermektedir.

Kallus kültürleri de bitkilerle benzer şekilde 0 μM , 1 μM ve 10 μM konsantrasyonlarında sikloastragenol içeren MS besiyerlerinde 3 hafta boyunca kültürlendi. Kallus büyüme indeksinin kontrol CAG grubunda $3,180 \pm 1,73$ kat; 1 μM CAG grubunda $2,659 \pm 2,1$ kat; 10 μM CAG grubunda ise $2,941 \pm 1,97$ kat olduğu gözlemlendi. t-testi sonucu gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.4 c). Şekil 4.5'te verildiği gibi sikloastragenol uygulaması sonrası kallusların büyüme oranında anlamlı bir değişim gözlemlenmedi.



Şekil 4.5: Üç hafta boyunca farklı dozlarda sikloastragenole maruz kalan *A. thaliana* kallus dokuları.

A, 0 μM konsantrasyonda kültürlenen ve kontrol grubu olarak değerlendirilen kallusları; B, 1 μM konsantrasyonda kültürlenen kallusları; C, 10 μM konsantrasyonda kültürlenen kallusları temsil etmektedir.

Yapılan analizlerden elde edilen değerlerin ortalamaları ve standart hataları Tablo 4.1'de verilmiştir. Her bir grup için verilen değer, 3 tekrarlı olarak yapılan deney sonuçlarının ortalamasını ve standart hatayı ($\pm\text{SH}$) göstermektedir.

Tablo 4.1: *A. thaliana*'da CAG'ın morfolojik etkilerinin belirlenmesi.

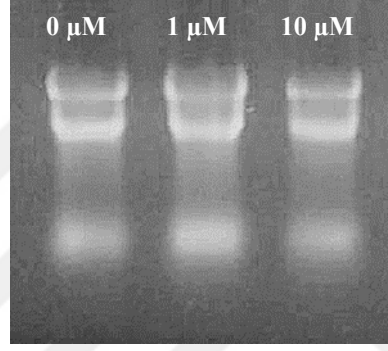
CAG (μM)	Bitki Boy Uzunluğu (cm)	Klorofil Miktarı (mg/kuru ağırlık)	Kallus Büyüme İndeksi
0	$10,844 \pm 1,37$	$7,855 \pm 0,28$	$3,180 \pm 1,73$
1	$12,750 \pm 1,73$	$7,315 \pm 0,19$	$2,659 \pm 2,1$
10	$11,688 \pm 1,17$	$6,965 \pm 0,39$	$2,941 \pm 1,97$

4.4 GEN ANLATIM ANALİZLERİ

Bitkilerde telomer/telomeraz düzenlenmesi ile ilişkili *TER1*, *CTC1*, *TRB1*, *POT1a*, *TAC1*, *BT2* ile *TERT* genlerinin CAG varlığındaki gen anlatım seviyeleri RT-PZR ile analiz edildi.

4.4.1 Total RNA'nın İzolasyonu, Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Telomeraz aktivatörü olan sikloastragenol'un etkisinde seçilen genlerin anlatım seviyelerindeki değişikliklerin analizi için bitki ve kallus dokularından total RNA izolasyonu yapılarak, Şekil 4.6'da gösterildiği gibi bütünlükleri (18S, 16S, 5S olmak üzere 3 bant görüntüsü) agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.



Şekil 4.6: CAG uygulanmış *A. thaliana* bitkilerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü.

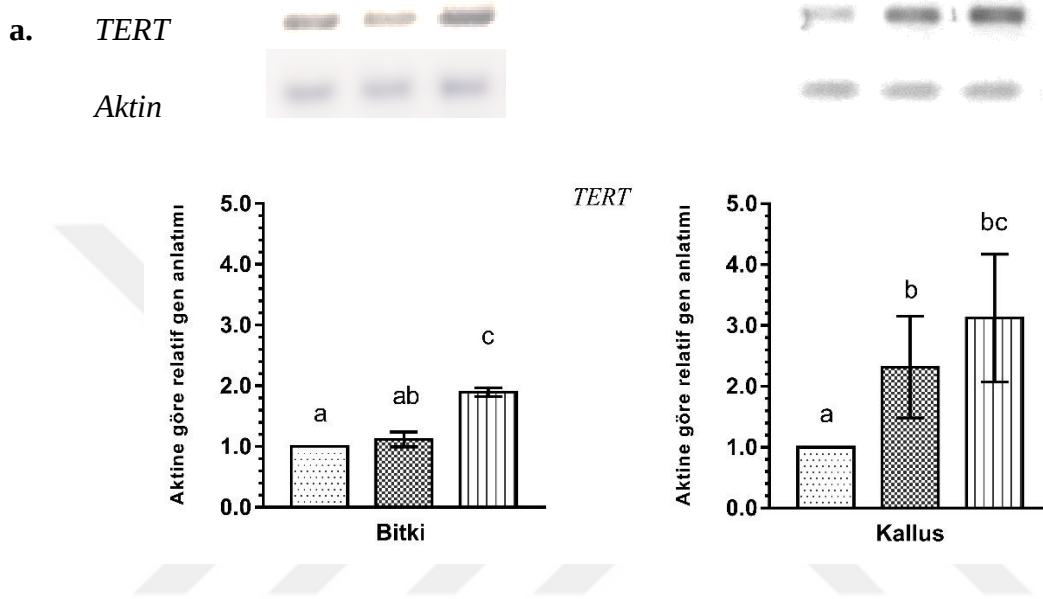
cDNA sentezinde kullanılan tüm bitki ve kallus RNA'larına ait konsantrasyon ve A260/A280 değerleri Tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2: CAG uygulanmış *A. thaliana* bitki ve kallus dokularından izole edilen RNA'ların spektrofotometrik değerleri.

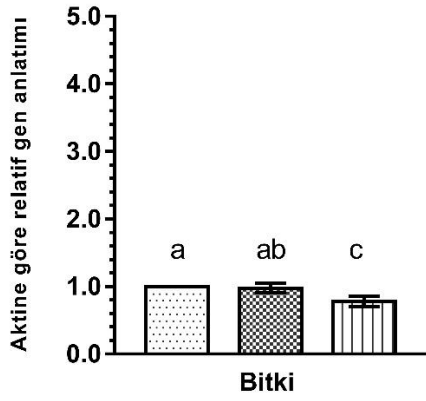
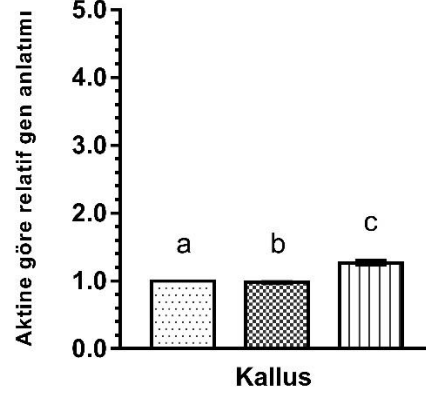
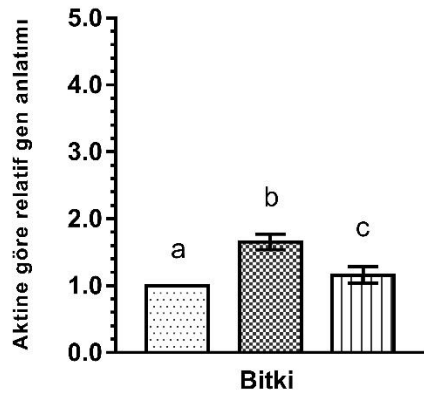
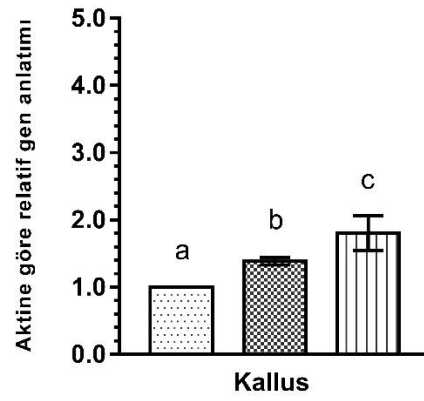
CAG deney grupları	BİTKİ		KALLUS	
	Konsantrasyon (µg/mL)	A260/A280	Konsantrasyon (µg/mL)	A260/A280
0 µM CAG- 1.tekrar	1806,6	2,09	2182,5	2,08
0 µM CAG- 2.tekrar	745,0	1,95	3890,60	2,13
0 µM CAG- 3.tekrar	1389,1	2,04	1496,40	2,04
1 µM CAG- 1.tekrar	1600,5	2,10	2061,5	2,09
1 µM CAG- 2.tekrar	848,6	2,01	3842,9	2,12
1 µM CAG- 3.tekrar	2056,1	2,07	6177,2	2,11
10 µM CAG- 1.tekrar	1240,7	2,08	5872,8	2,09
10 µM CAG- 2.tekrar	2111,6	2,08	2168,9	2,10
10 µM CAG- 3.tekrar	2788,5	2,12	7033,3	2,05

4.4.2 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

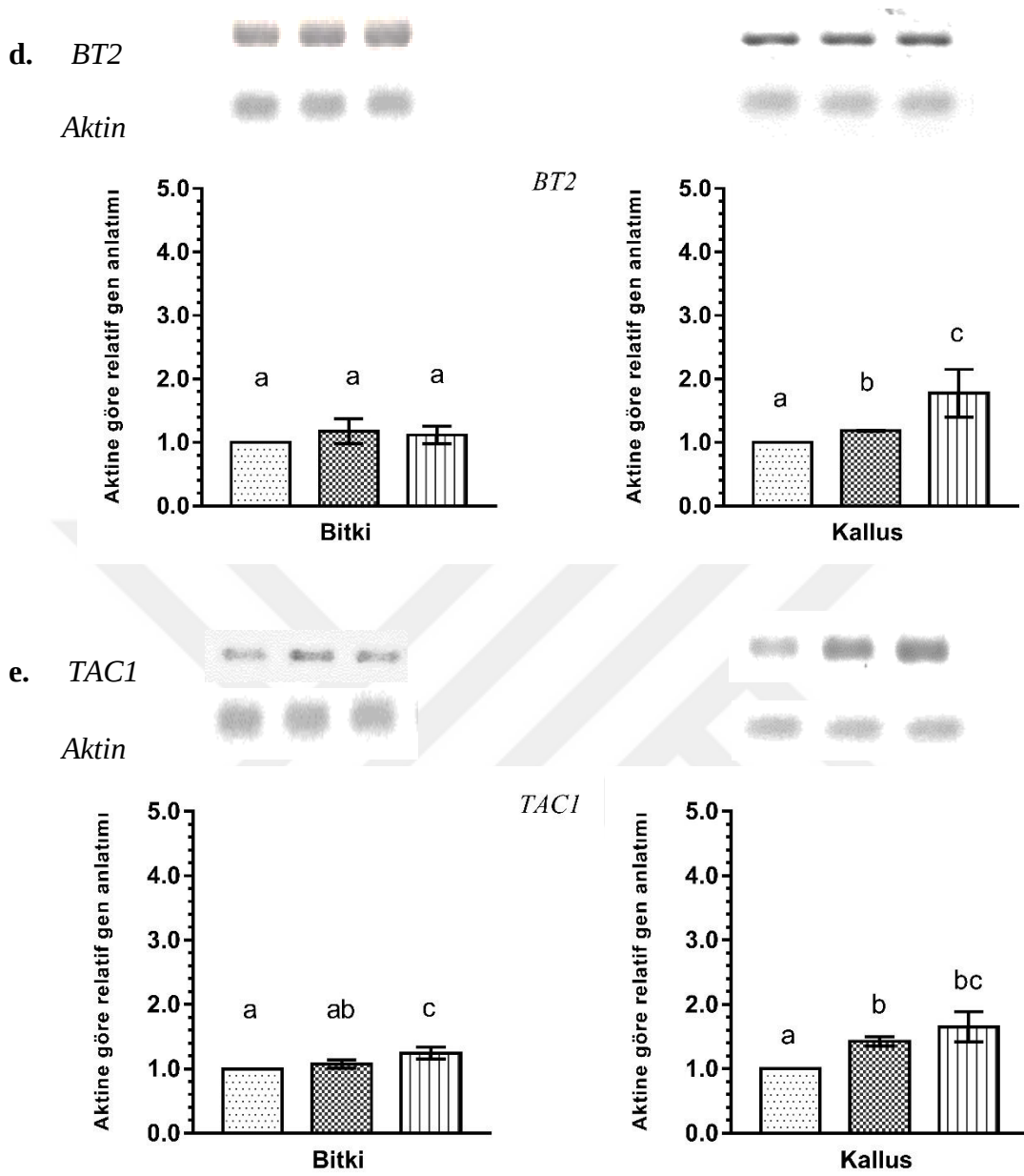
CAG uygulanmış *A. thaliana* bitki ve kalluslarında telomer/telomerase düzenlenmesi ile ilişkili olduğu bilinen genlerden seçilen *TER1*, *CTC1*, *TRB1*, *POT1a*, *TAC1*, *BT2* ile *TERT* genlerinin anlatım seviyeleri RT-PZR ile analiz edildi. Gen anlatımlarının değişimi Şekil 4.7’de verilen grafiklerde gösterilmiştir.



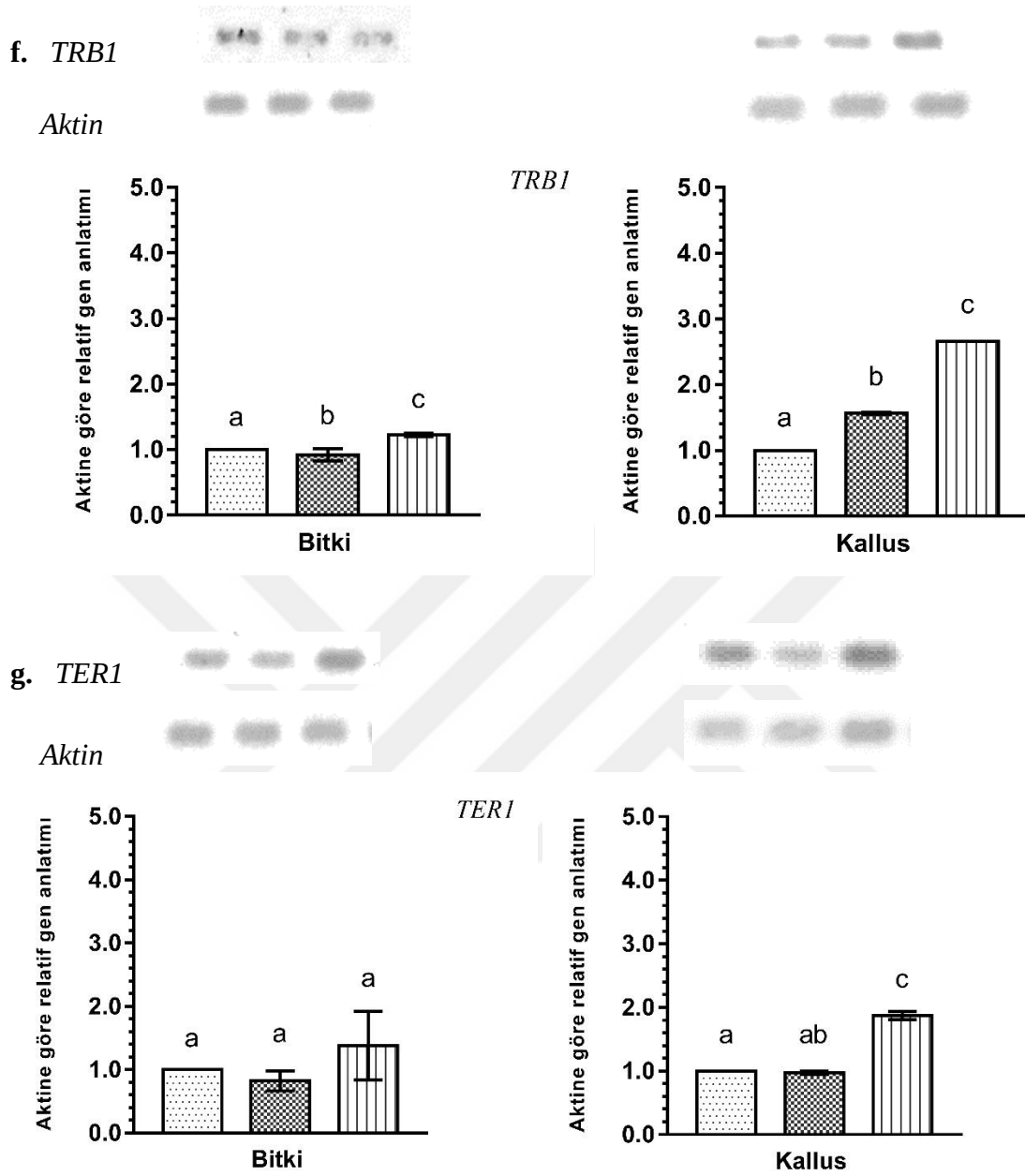
Şekil 4.7: CAG uygulaması sonrası RT-PZR analizleri sonucunda *TERT* (a), *POT1a* (b), *CTC1* (c), *BT2* (d), *TAC1* (e), *TRB1* (f) ile *TER1*(g) genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım seviyelerinin değişimi.

b. *POT1a**Aktin**POT1a*c. *CTC1**Aktin**CTC1*

Şekil 4.7 devamı: CAG uygulaması sonrası RT-PZR analizleri sonucunda *TERT* (a), *POT1a* (b), *CTC1* (c), *BT2* (d), *TAC1* (e), *TRB1* (f) ile *TER1*(g) genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım seviyelerinin değişimi.



Şekil 4.7 devamı: CAG uygulaması sonrası RT-PZR analizleri sonucunda *TERT* (a), *POT1a* (b), *CTC1* (c), *BT2* (d), *TAC1* (e), *TRB1* (f) ile *TER1*(g) genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım seviyelerinin değişimi.



Şekil 4.7 devamı: CAG uygulaması sonrası RT-PZR analizleri sonucunda TERT (a), POT1a (b), CTC1 (c), BT2 (d), TAC1 (e), TRB1 (f) ile TER1(g) genlerinin *A. thaliana* bitki ve kalluslarındaki anlatım seviyelerinin değişimi.

CAG uygulamasının aktin genine göre seçilen genlerdeki anlatım değişiminin katsayıları Tablo 4.3’de verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı olan sonuçlar arasında kallus dokularında sikloastragenol’e bağlı olarak tüm genler için anlatım seviyelerinde artış gözlenirken, bitkilerde *POT1a* ve *TRB1* genleri dışındaki genlerin anlatım seviyelerinde artış gözlenmiştir.

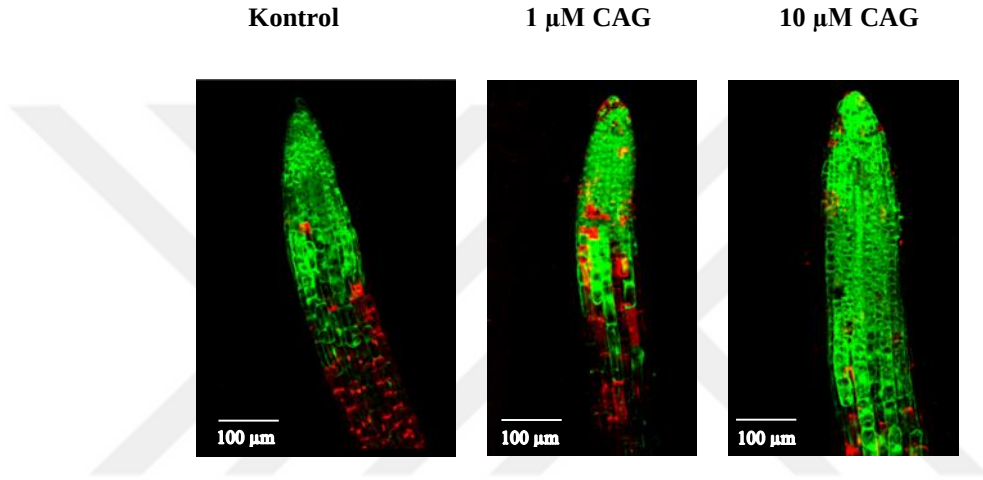
Tablo 4.3: *A. thaliana* bitki ve kalluslarına CAG uygulaması sonrasında *TERT*, *POT1a*, *CTC1*, *BT2*, *TAC1*, *TRB1* ile *TER1* genlerinin anlatımlarındaki değişimler.

CAG	TERT		POT1a		CTC1		BT2		TAC1		TRB1		TER1	
	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus	Bitki	Kallus
0 μ M CAG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1 μ M CAG	1,12	2,32	0,98	0,98	1,66	1,38	1,18	1,18	1,07	1,43	0,92	1,56	0,82	0,97
10 μ M CAG	1,90	3,12	0,78	1,27	1,16	1,80	1,12	1,78	1,25	1,65	1,23	2,66	1,38	1,87

CAG uygulaması bitkilerde *TERT* anlatımını 10 μ M da 1,90 arttırırken; kalluslarda ise 1 μ M da 2,32 ve 10 μ M da ise 3,12 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir. CAG bitkilerde *POT1a* anlatımını, 10 μ M da 0,78 kat azaltırken; kalluslarda ise 10 μ M da 1,27 kat arttırmıştır. *CTC1* geni için bitkilerde 1 μ M da 1,66 ve 10 μ M da 1,16 kat artış gözlenirken; kalluslarda ise artış oranları 1 μ M ve 10 μ M da sırasıyla 1,38 ve 1,80'dir. Bitkilerde CAG uygulaması *BT2* geni üzerinde bir etki göstermezken; kalluslarda 1 μ M ve 10 μ M da sırasıyla 1,18 ve 1,78 kat artış gözlenmiştir. Benzer şekilde bitkilerde CAG uygulaması *TER1* geni üzerinde bir etkiye neden olmazken, kalluslarda ise 10 μ M da 1,87 katlık artış göstermiştir. *TAC1* gen anlatımı bitkilerde 10 μ M da 1,25 kat artış gösterirken; kalluslarda ise artış oranları 1 μ M ve 10 μ M da sırasıyla 1,43 ve 1,65 kat olmuştur. *TRB1* gen anlatımı kalluslarda 1 μ M için 1,56 ve 10 μ M için 2,66 kat artış olarak belirlenmişken, bitkilerde 1 μ M için 0,92 kat azalış ve 10 μ M için 1,23 kat artış gözlenmiştir.

4.5. SİKLOASTRAGENOL'ÜN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Bu çalışmada sikloastragenol'ün *A. thaliana* kök dokusu hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi için konfokal mikroskobunda iki çeşit floresan boya (Floresan diasetat, Propidium iyodür) kullanılarak analizler yapılmıştır. Konfokal mikroskobu ile çekilen fotoğraflarda yeşil floresan ışımaya canlı hücreleri, kırmızı floresan ışımaya ise ölü hücreleri göstermektedir. Hücre canlılık analizi verileri, gruplar arasında karşılaştırıldığında CAG konsantrasyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısında önemli derecede bir artış gözlemlendi.



Şekil 4.8: CAG uygulanmış *A. thaliana* kök hücrelerinin konfokal mikroskop ile çekilen görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Telomer bölgeleri, hücre bölünmesi sırasında kromozomların uygun bir şekilde ayrılmasına aracılık eden ve genomik kararlılığı sürdürmek için gerekli olan kromozom uçlarında bulunan nükleoprotein yapılarıdır. Telomer tekrarları *Zea mays*'da ilk defa keşfedildikten sonra; memelilerde kanser, yaşlanma ve kök hücre biyolojisi çalışmalarında odak merkezi haline gelmiştir (Sax ve Enzmann, 1939). Çoğu angiospermiler için ise telomerik kromatin, hayvanlardaki homologları ile yüksek yapısal ve işlevsel benzerliğe sahip olan bir dizi telomere bağlanan proteinler ile TTTAGGG DNA dizisinin ardışık tekrarlarından oluşmaktadır (Song ve diğ., 2008; Surovtseva ve diğ., 2009; Shakirov ve diğ., 2010). Hayvanlarda olduğu gibi, *Arabidopsis* bitkisinde telomeraz anlatımını sıkı bir şekilde düzenler ve enzim aktivitesi, bölünen doku ve organlar ile sınırlıdır (Watson ve Riha, 2010). TERT mutanlığı bitkilerle yapılan çalışmalar, telomeraz aktivitesinden yoksun bitkilerin, ilerleyen telomer kısalması ve anormal sürgün gelişimine maruz kaldıklarını ve bu nedenle de telomer devamlılığının bitki canlılığı için gerekli olduğunu göstermiştir (Riha ve diğ., 2001).

Hayvanlarda, telomeraz yokluğunda meydana gelen kademeli telomer kısalmasının hücre çoğalma kapasitesini sınırlayan mitotik bir saat gibi davrandığı ileri sürülmektedir (Harley ve diğ., 1990). Bu tür bir mekanizma, tümörlerin hızlı büyümesini engellemek için faydalı olsa da, kök hücrelerdeki telomer yıpranması organizmanın çoğalma kapasitesini sınırlamakta ve yaşlanmasına katkıda bulunmaktadır (Blasco ve diğ., 1997). Bitkilerde telomeraz aktivitesi, tüm proliferatif organlarla ilişkilidir ancak kök ve yapraklar gibi tamamen farklılaşmış dokularda görülmez (Riha ve diğ., 1998). Bu durum, telomerazın değişiklik gösteren anlatımının, bitki gelişimini etkilediğini öne sürmektedir (Gan, 2003; Thomas, 2013).

Telomerlerin bitkilerde hücre yaşlanmaya katkıda bulunup bulunmadığı, uzun zaman boyunca devam eden bir tartışma konusu olmuştur (Gan, 2003; Watson ve Riha, 2011). 2015 yılında Garcia ve arkadaşlarının *A. thaliana*'da yaptığı araştırmalar; telomer uzunluğu, kök hücre fonksiyonu ve bitkilerin ömrünün uzaması arasında kritik bir ilişki olduğunu göstermiştir (González-García ve diğ., 2015). Bitkilerde meristem doku, organizma ömrü boyunca hücrelerin üretimini sürdürmektedir. Bu çalışmada, telomer uzunluğu dinamiğinin bitki meristemi gelişimiyle ilişkisinin analizi için *Arabidopsis* birincil kökleri deneylerde kullanılmıştır. Telomeraz aktivitesinin, meristemdeki belirli hücrelerde TERT mRNA'sının

transkripsiyonuyla birlikte (Brady ve diğ., 2007) devam ettiği gösterilmiş ve bu durum telomerazın rolünün meristem büyümesinin sürdürülmesindeki önemini desteklemiştir. Köklerdeki telomer uzunluğu, kök büyüme ve gelişiminin iki önemli özelliğini tanımlamaktadır: meristem bölünmesi ve kök hücre yenilenmesi. Her ikisi de bitkilerde üreme evresi ve yaşam ömrünün devamlılığı için gereklidir (Mencuccini ve diğ., 2005). Ayrıca Garcia ve arkadaşları bu çalışmalarda, *Arabidopsis* köklerinde telomer kısalmasının; meristem hücre sayısında belirgin bir azalma, azalmış mitotik aktivite ve hücre döngüsü inhibitörlerinden ICK2/KRP2 birikimi gibi kök büyümesinin azalmasına neden olan fenotipik değişikliklerle hücre döngüsünün durmasına neden olduğunu gözlemlemiştir. Bu araştırma, bitkilerde meristem aktivitesi ile kök hücre fonksiyonunun, telomerlerin genomik kararlılığı sürdürme yetenekleriyle yakından ilişkili olduğunu kanıtlamıştır. Toplu olarak değerlendirildiğinde bu araştırmadaki veriler, bitkilerde telomer uzunluğunun kök büyümesi boyunca sürekli olarak kök dokusu hücresi yenilenmesini sağladığını göstermiştir ve telomer uzunluğunun, bitkilerde işlevsel ve canlı meristem doku için çoğalma sınırını belirlediğini vurgulanmıştır. Tüm bu nedenlerle telomeraz aktivitesinin, kök büyümesi sırasında hücre bölünmesini korumak için bir gereksinim olduğu belirtilmiştir (González-García ve diğ., 2015).

Bu tez çalışmasında ise *A. thaliana* bitki ve kallus kültürleri kullanılarak telomeraz aktivatörü olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan sikloastragenol uygulamasının; bitki telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesinde önemli olduğu bilinen *TERT*, *POT1a*, *CTC1*, *BT2*, *TAC1*, *TRB1* ile *TER1* genlerinin anlatım düzeyleri, morfolojik değişimler ve hücre canlılığı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Sikloastragenol'un mevcut araştırma sonuçlarına göre; telomeraz aktivasyonu, telomer uzaması, anti-oksidasyon, anti-viral özellikler dahil olmak üzere geniş farmakolojik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca insanlarda ve hayvan modellerinde CAG üzerine yapılan çalışmalar; toksisite belirtileri olmadan, immün, kardiyovasküler, metabolik, kemik ve enflamatuvar belirteçleri içeren yaşlanma biyobelirteçlerinde iyileşmeleri destekleyen araştırmaları içermektedir (Harley ve diğ., 2013). Bununla birlikte, şimdiye kadar CAG'ın bitki telomer/telomeraz sistemi ile bitki büyümesi ve gelişimi üzerine olabilecek etkisi araştırılmamıştır (Yu ve diğ., 2018).

Bu tez çalışmasında, bir haftalık *A. thaliana* bitkileri ve kallus kültürleri 21 gün boyunca 0 μ M, 1 μ M ve 10 μ M konsantrasyonlarında CAG'e maruz bırakılarak gerçekleşen morfolojik

değişimler değerlendirilmiştir. Yapılan morfolojik analizlerin sonucunda yalnızca 1 μ M CAG'a maruz kalan bitkilerin boylarının anlamlı olarak 2 cm uzadığı, klorofil miktarının ise anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, *Arabidopsis* kallus kültürlerinin büyüme oranları karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Bu tez çalışması kapsamında CAG uygulamasının telomer/telomeraz sisteminin düzenlenmesi üzerine etkileri, gen anlatım analizleri gerçekleştirilerek yapılmıştır. Telomeraz ters transkriptaz, kromozom uçlarında bulunan telomerik DNA tekrarlarının sentezlenmesi ve korunmasından sorumludur. Telomeraz enziminin katalitik ters transkriptaz alt birimini, *TERT* geni tarafından kodlanmaktadır. *TERT* geninin CAG'e maruz kaldığı koşullar altındaki anlatım düzeyi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. Bitkilere 10 μ M CAG uygulaması sonucunda *TERT* gen anlatımının 2 kat arttığı; kalluslarda ise 1 μ M CAG uygulamasının yaklaşık 2,5 kat, 10 μ M CAG uygulamasının ise 3 kat arttırdığı belirlenmiştir. CAG'ün, JAK2 ve STAT5b transkripsiyonunun anlatımını indüklediği ve *TERT* anlatımındaki bir artışın ardından STAT5b'nin fosforilasyonunu arttırdığı bu sinyal yolağı aracılığıyla telomerazı aktive ettiği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir (Li J, 2017; Yu ve diğ., 2018).

Telomeraz, telomer tekrar sentezi için bir kalıp olarak işlev gören RNA alt birimini (TER) kullanmaktadır. *A. thaliana*'da TER1, TER2, TER2s olmak üzere üç farklı TER tanımlanmıştır. TER1 ve TER2'nin her ikisinde, telomeraz için kalıp olarak işlev görse de, TER1'in yokluğu, *in vivo* da telomeraz aktivitesinin azalmasına ve devam eden telomer kısalmasına neden olmasına karşın TER2 yokluğunda aynı etki gözlenmemiştir. Dahası, TER1'de meydana gelen mutasyonlar, kromozom uçlarında mutant telomer tekrarlarının eklenmesine yol açmaktadır. Bu sebeple, TER1 *in vivo* telomeraz için ana kalıbı sağlamakta olduğu sonucuna varılmıştır (Cifuentes-Rojas ve diğ., 2011; Nelson ve Shippen, 2012). Bu çalışmada *TER1* geninin CAG'a maruz kaldığı koşullar altındaki anlatım düzeyi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. Bitkilere CAG uygulaması sonucunda *TER1* anlatımının değişmediği; ancak kalluslarda 10 μ M CAG uygulamasının *TER1* gen anlatımını yaklaşık 2 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Kromozom uç bölgesine telomerazın erişimi, telomere bağlanan proteinler tarafından kontrol edilmektedir. Bu proteinlerden biri de şeltrin kompleksinin üyesi olan POT1'dir. POT1, telomer replikasyonunun kontrolü (hem pozitif hem de negatif telomeraz düzenlenmesi), DNA hasar tepkisinin baskılanması, kromozom uçlarının uygun olmayan rekombinasyondan korunması, nükleaz atakları ve uçtan uca füzyon gibi telomer biyolojisi ile ilişkili birçok olayda

rol oynamaktadır (Palm ve de Lange, 2008; Xin ve diğ., 2008). *A. thaliana*, iki tane POT1 benzeri paraloglar olan *AtPOT1a* ve *AtPOT1b*'yi kodlamaktadır (Shakirov ve diğ., 2005). *AtPOT1a*, fiziksel olarak telomerazın RNP'si ile birleşir ve *in vivo* da telomeraz aktivitesinin pozitif bir regülatörü olarak görev yapmaktadır (Surovtseva ve diğ., 2007). Bu çalışmada *POT1a* geni üzerine CAG'a etkisi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. 10 μ M CAG uygulamasının bitkilerde *POT1a* anlatımını yaklaşık 0,75 kat azalttığı, kalluslarda ise 1,25 kata kadar arttırdığı belirlenmiştir.

Bitkilerde CST kompleksinin bir bileşeni olan CTC1 ("Conserved Telomere Maintenance Component 1), kromozom sonu korumasında ve telomer replikasyonunda işlev görmektedir. *AtCTC1* yokluğu, gelişim ve morfolojik kusurlara, ani telomer kaybına, telomer rekombinasyonuna ve genom kararsızlığına neden olmaktadır (Surovtseva ve diğ., 2009). Bu çalışmada bitkilere 1 μ M CAG uygulaması sonucunda *CTC1* gen anlatımını 1,7 kat ve 10 μ M CAG uygulamasının 1,2 kat arttırdığı; kalluslarda ise 1 μ M CAG uygulamasının yaklaşık 1,4 kat, 10 μ M CAG uygulamasının ise 1,8 kat arttırdığı belirlenmiştir.

TAC1, telomeraz anlatımı ile oksin iletişimini sağlayan yolağın bir parçasıdır. Pozitif telomeraz regülatörü olan TAC1 mRNA'sının yokluğunda, telomeraz anlatımı üzerinde belirgin bir etki olmadığı görülmüştür (Ren ve diğ., 2004). Bu çalışmada *TAC1* geninin CAG'a maruz kaldığı koşullar altındaki anlatım düzeyi bitki ve kallus kültürlerinde incelenmiştir. Bitkilere 10 μ M CAG uygulaması sonucunda *TAC1* gen anlatımını 1,25 kat arttırdığı; kalluslarda ise 1 μ M CAG uygulamasının yaklaşık 1,4 kat, 10 μ M CAG uygulamasının ise 1,65 kat arttırdığı belirlenmiştir.

BT2, TAC1 aracılı telomeraz aktivasyon yolağının temel bir bileşenidir ve BT2 mRNA'sı konsantrasyonunun, TAC1 ekspresyonuna cevap olarak arttığı gösterilmiştir. Ayrıca BT2'deki mutasyonlar, TAC1 aracılı telomeraz teşvikini ortadan kaldırmaktadır (Ren ve diğ., 2007). *Arabidopsis* tüm bitkilerinde CAG uygulaması sonucunda *BT2* anlatımının değişmediği; ancak kalluslarda 1 μ M CAG uygulamasının yaklaşık 1,2 kat, 10 μ M CAG uygulamasının ise 1,8 kat *BT2* gen anlatımını arttırdığı belirlenmiştir.

TRB1 proteininin bitki telomer/telomeraz sisteminin bir bileşeni olarak değerlendirilmesi, *TRB1* gen mutant bitkilerinde telomerlerin kısaldığının gözlemlenmesiyle olmuştur. Ayrıca, TRB proteinlerinin fiziksel olarak bitki telomeraz katalitik alt birimi ile etkileşime girdiği de

gösterilmiştir (Schrumpfová ve diğ., 2014). Bitkilere 1 μ M CAG uygulaması sonucunda *TRB1* gen anlatımını 0,90 kat azalttığı ve 10 μ M CAG uygulamasının 1,2 kat arttırdığı; kalluslarda ise 1 μ M CAG uygulamasının yaklaşık 1,6 kat, 10 μ M CAG uygulamasının ise 2,7 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Gen anlatım değişimleri toplu olarak değerlendirildiğinde, telomeraz aktivitesi üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu bilindiği için çalışılan genlerin transkript seviyesi kalluslarda CAG konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmıştır. Bu veriler ile, CAG'ın insan hücre doku kültürü çalışmalarında olduğu gibi, bitkilerde de telomeraz aktivitesini arttırdığı sonucu çıkarılabilmektedir. Bitkilerin CAG'a bağlı transkript seviye değişimlerinde ise düzensiz bir artış-azalış gözlenmiş ya da anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu sonuç, CAG'ın kallus gibi proliferatif dokularda telomeraz aktivitesi üzerine bir pozitif regülatör olarak görev alabileceğini, ancak tüm bitki genel olarak değerlendirildiğinde ise telomeraz aktivitesi sınırlı olan dokularda etkisinin olmayabileceğini düşündürmüştür.

Telomer uzunluğunun, bitkilerde işlevsel ve canlı meristem doku için çoğalma sınırını belirlediği daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında ise *A. thaliana* kök doku hücrelerinde yapılan hücre canlılık analizi verileri karşılaştırıldığında, CAG konsantrasyonuna bağlı olarak canlı hücre sayısında artış gözlenmiştir. Bu veriler, sikloastragenolün telomer/telomeraz sistemi üzerine pozitif bir düzenleyici olarak etki ederek kök büyüme ve gelişimi açısından olumlu etkilerinin olabileceğini düşündürmüştür.

Sikloastragenol'ün bitki telomer/telomeraz sistemi üzerindeki etkisinin araştırılması ve bununla birlikte, CAG'nin potansiyel yan etkilerinin olup olmadığını değerlendirmek ve muhtemel etki mekanizmalarını incelemek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

- Akimcheva, S., Zellinger, B., Riha, K., 2008, Genome stability in Arabidopsis cells exhibiting alternative lengthening of telomeres, *Cytogenetic and Genome Research*, 122 (3-4), 388-395.
- Alexander, S. P. H., Benson, H. E., Faccenda, E., Pawson, A. J., Sharman, J. L., Spedding, M., Peters, J.A., Harmar, A. J., 2013, The concise guide to PHARMACOLOGY 2013/14: Transporters, *British Journal of Pharmacology*, 170, 1459-1581.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., Stark, G. R., 1977, Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (12), 5350-5354.
- Amiard, S., Depeiges, A., Allain, E., White, C. I., Gallego, M. E., 2011, Arabidopsis ATM and ATR kinases prevent propagation of genome damage caused by telomere dysfunction, *Plant Cell*, 23 (12), 4254-4265.
- Anderson, B. H., Kashner, P. R., Mayer, J., Szykiewicz, M., Jenkinson, E. M., Bhaskar, S. S., ... Yanick, J., 2012, Mutations in CTC1, encoding conserved telomere maintenance component 1, cause Coats plus, *Nature Genetics*, 44 (3), 338-342.
- Antiabong, J. F., Ngoepe, M. G., Abechi, A. S., 2016, Semi-quantitative digital analysis of polymerase chain reaction-electrophoresis gel: Potential applications in low-income veterinary laboratories. *Veterinary world*, 9 (9), 935-939.
- Arat, N. Ö., Griffith, J. D., 2012, Human Rap1 interacts directly with telomeric DNA and regulates TRF2 localization at the telomere, *Journal of Biological Chemistry*, 287 (50), 41583-41594.
- Artandi, S. E., DePinho, R. A., 2009, Telomeres and telomerase in cancer, *Carcinogenesis*, 31 (1), 9-18.
- Aslantürk, Ö. S., 2018, *In vitro* cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages, *Genotoxicity-A Predictable Risk to Our Actual World*, IntechOpen, London, 1-17.
- Autexier, C., Lue, N. F., 2006, The structure and function of telomerase reverse transcriptase, *Annual Review of Biochemistry*, 75, 493-517.
- Baumann, P., Cech, T. R., 2001, Pot1, the putative telomere end-binding protein in fission yeast and humans, *Science*, 292 (5519), 1171-1175.
- Bernardes de Jesus, B., Vera, E., Schneeberger, K., Tejera, A. M., Ayuso, E., Bosch, F., Blasco, M. A., 2012, Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer, *EMBO Molecular Medicine*, 4, 691-704.

- Blackburn, E. H., Gall, J. G., 1978, A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*, *Journal of Molecular Biology*, 120 (1), 33-53.
- Blasco, M. A., Lee, H. W., Hande, M. P., Samper, E., Lansdorp, P. M., DePinho, R. A., Greider, C. W., 1997, Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA, *Cell*, 91 (1), 25-34.
- Bonetti, D., Clerici, M., Anbalagan, S., Martina, M., Lucchini, G., Longhese, M. P., 2010, Shelterin-like proteins and Yku inhibit nucleolytic processing of *Saccharomyces cerevisiae* telomeres, *PLoS Genetics*, 6, p.e. 1000966.
- Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J. Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., Mace, D., Ohler, U., Benfey, P. N., 2007, A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns, *Science*, 318 (5851), 801-806.
- Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T., 1997, Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2, *Nature Genetics*, 17, 231-235.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham, M. A., Reddel, R. R., 1997, Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines, *Nature Medicine*, 3, 1271-1274.
- Bucholc, M., Park, Y., Lustig, A. J., 2001, Intrachromatid excision of telomeric DNA as a mechanism for telomere size control in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and cellular biology*, 21 (19), 6559-6573.
- Capper, R., Britt-Compton, B., Tankimanova, M., Rowson, J., Letsolo, B., Man, S., Haughton, M., Baird, D. M., 2007, The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells, *Genes and Development*, 21, 2495-2508.
- Chen, C. M., Wang, C. T., Ho, C. H., 2001, A plant gene encoding a myb-like protein that binds telomeric gggttag repeats *in vitro*, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 16511-16519.
- Cifuentes-Rojas, C., Kannan, K., Tseng, L., Shippen, D. E., 2011, Two RNA subunits and POT1a are components of Arabidopsis telomerase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (1), 73-78.
- Cifuentes-Rojas, C., Shippen, D. E., 2012, Telomerase regulation, *Mutation Research*, 730 (1-2), 20-27.
- Coghlan, J. P., Penschow, J. D., Hudson, P. J., Niall, H. D., 1984, Hybridization histochemistry: Use of recombinant DNA for tissue localizations of specific mRNA populations, *Clinical and Experimental Hypertension*, 6, 63-78.
- Collins, K., 2006, The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7, 484-494.

- Court, R., Chapman, L., Fairall, L., Rhodes, D., 2005, How the human telomeric proteins TRF1 and TRF2 recognize telomeric DNA: A view from high-resolution crystal structures, *EMBO Reports*, 6, 39-45.
- de Lange, T., 2005, Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres, *Genes and Development*, 19: 2100-2110.
- de Lange, T., 2009, How telomeres solve the end-protection problem, *Science*, 326 (5955), 948-952.
- Denchi, E. L., de Lange, T., 2007, Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1, *Nature*, 448, 1068–1071.
- Dokládál, L., Benková, E., Honys, D., Dupl'áková, N., Lee, L. Y., Gelvin, S. B., Sýkorová, E., 2018, An armadillo-domain protein participates in a telomerase interaction network, *Plant Molecular Biology*, 97 (4-5), 407–420.
- Doonan, J. H., Sablowski, R., 2010, Walls around tumours -why plants do not develop cancer, *Nature Reviews Cancer*, 10 (11), 794-802.
- Fajkus, J., Kovařík, A., Královics, R., 1996, Telomerase activity in plant cells, *FEBS Letters*, 391 (3), 307-309.
- Fitzgerald, M. S., Mcknight, T. D., Shippen, D. E., 1996, Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (25), 14422-14427.
- Fitzgerald, M. S., Riha, K., Gao, F., Ren, S., McKnight, T. D., Shippen, D. E., 1999, Disruption of the telomerase catalytic subunit gene from *Arabidopsis* inactivates telomerase and leads to a slow loss of telomeric DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (26), 14813-14818.
- Crick, F. H. C., 1958, On protein synthesis, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 12, 138-163.
- Fulcher, N., Riha, K., 2016, Using centromere mediated genome elimination to elucidate the functional redundancy of candidate telomere binding proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Genetics*, 6, 349.
- Gall, J. G., Pardue, M. L., 1969, Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 63 (2), 378-383.
- Gan, S., 2003, Mitotic and postmitotic senescence in plants, *SAGE KE*, 2003 (38), re7.
- Gao, H., Cervantes, R. B., Mandell, E. K., Otero, J. H., Lundblad, V., 2007, RPA-like proteins mediate yeast telomere function, *Nature Structural and Molecular Biology*, 14, 208–214.

- Garvik, B., Carson, M., Hartwell, L., 1995, Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint, *Molecular and Cellular Biology*, 15 (11), 6128-6138.
- González-García, M. P., Pavelescu, I., Canela, A., Sevillano, X., Leehy, K. A., Nelson, A. D. L., Ibañez, M., Shippen, D.E., Blasco, M.A., Caño-Delgado, A. I., 2015, Single-cell telomere-length quantification couples telomere length to meristem activity and stem cell development in *Arabidopsis*, *Cell Reports*, 11 (6), 977-989.
- Grandin, N., Damon, C., Charbonneau, M., 2001, Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13, *EMBO Journal*, 20, 1173-1183.
- Grandin, N., Reed, S. I., Charbonneau, M., 1997, Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with CDc13, *Genes and Development*, 11, 512-527.
- Greider, C. W., Blackburn, E. H., 1985, Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts, *Cell*, 43 (2), 405-413.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W., 1990, Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature*, 345, 458-460.
- Harley, C. B., Futcher, A. B., Greider, C. W., 2013, A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: Metabolic and cardiovascular response, *Rejuvenation Research*, 16 (5), 386-395.
- Hayflick, L., Moorhead, P. S., 1961, The serial cultivation of human diploid cell strains, *Experimental Cell Research*, 25 (3), 585-621.
- Heacock, M., Spangler, E., Riha, K., Puizina, J., Shippen, D. E., 2004, Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: Multiple pathways for chromosome end-joining, *EMBO Journal*, 23, 2304-2313.
- Heacock, M. L., Idol, R. A., Friesner, J. D., Britt, A. B., Shippen, D. E., 2007, Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV, *Nucleic Acids Research*, 35 (19), 6490-6500.
- Heller-Uszynska, K., Schnippenkoetter, W., Kilian, A., 2002, Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing patterns, *Plant Journal*, 31 (1), 75-86.
- Hwang, M. G., Chung, I. K., Kang, B. G., & Cho, M. H., 2001, Sequence-specific binding property of *Arabidopsis thaliana* telomeric DNA binding protein 1 (AtTBP1), *FEBS Letters*, 503 (1), 35-40.
- Ip, F. C. F., Ng, Y. P., An, H. J., Dai, Y., Pang, H. H., Hu, Y. Q., Chin A.C., Harley C.B., Wong Y.H., Ip, N. Y., 2014, Cycloastragenol is a potent telomerase activator in neuronal cells: Implications for depression management, *NeuroSignals*, 22 (1), 52-63.

- John, H. A., Birnstiel, M. L., Jones, K. W., 1969, RNA-DNA hybrids at the cytological level, *Nature*, 223, 582–587.
- Kannan, K., Nelson, A. D. L., Shippen, D. E., 2008, Dyskerin is a component of the *Arabidopsis* telomerase RNP required for telomere maintenance, *Molecular and Cellular Biology*, 28 (7), 2332-2341.
- Karamysheva, Z. N., Surovtseva, Y. V., Vespa, L., Shakirov, E. V., Shippen, D. E., 2004, A C-terminal Myb extension domain defines a novel family of double-strand telomeric DNA-binding proteins in *Arabidopsis*, *Journal of Biological Chemistry*, 279, 47799-47807.
- Keller, R. B., Gagne, K. E., Usmani, G. N., Asdourian, G. K., Williams, D. A., Hofmann, I., Agarwal, S., 2012, CTC1 mutations in a patient with dyskeratosis congenita, *Pediatric Blood and Cancer*, 59 (2), 311-314.
- Kovalenko, N. A., Zhdanov, D. D., Kovalenko, T. F., 2013, Possibilities and effects of telomerase activation, *Molekuliarnaia biologii*, 47 (4), 544.
- Leehy, K. A., Lee, J. R., Song, X., Renfrew, K. B., Shippen, D. E., 2013, MERISTEM DISORGANIZATION1 encodes TEN1, an essential telomere protein that modulates telomerase processivity in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 25 (4), 1343-1354.
- Lei, M., Zaug, A. J., Podell, E. R., Cech, T. R., 2005, Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro, *Journal of Biological Chemistry*, 280, 20449-20456.
- Lundblad, V., Blackburn, E. H., 1993, An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence, *Cell*, 73 (2), 347-360.
- Matthew Watson, J., Bulankova, P., Riha, K., Shippen, D. E., Vyskot, B., 2005, Telomerase-independent cell survival in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal*, 43 (5), 662-674.
- McClintock, B., 1938, The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behavior of ring-shaped chromosomes, *Genetics*, 23 (4), 315–376.
- McClintock, B., 1939, The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 25 (8), 405-416.
- McEachern, M. J., Haber, J. E., 2006, Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast, *Annual Review of Biochemistry*, 75, 111-135.
- McKnight, T. D., Shippen, D. E., 2004, Plant telomere biology, *Plant Cell*, 16 (4), 794-803.
- Mencuccini, M., Martínez-Vilalta, J., Vanderklein, D., Hamid, H. A., Korakaki, E., Lee, S., Michiels, B., 2005, Size-mediated ageing reduces vigour in trees, *Ecology Letters*, 8 (11), 1183-1190.

- Mendonça, E. G., Paiva, L. V., Stein, V. C., Pires, M. F., Santos, B. R., Pereira, F. J., 2012, Growth curve and development of the internal calli structure of *Eucalyptus camaldulensis* dehn, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55 (6), 887-896.
- Mitchell, J. R., Wood, E., Collins, K., 1999, A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita, *Nature*, 402, 551–555.
- Mitton-Fry, R. M., Anderson, E. M., Theobald, D. L., Glustrom, L. W., Wuttke, D. S., 2004, Structural basis for telomeric single-stranded DNA recognition by yeast Cdc13, *Journal of Molecular Biology*, 338 (2), 241-255.
- Muller, J. H., 1938, The remaking of chromosomes, *Collecting Net*, 13, 182–198.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bio assays with Tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 473-497.
- Murnane, J. P., 2012, Telomere dysfunction and chromosome instability, *Mutation Research*, 730 (1-2), 28-36.
- Nakamura, T. M., Cooper, J. P., Cech, T. R., 1998, Two modes of survival of fission yeast without telomerase, *Science*, 282 (5388), 493-496.
- Nelson, A. D. L., Beilstein, M. A., Shippen, D. E., 2014, *Plant telomeres and telomerase*, Molecular Biology, In: Howell, S. (ed.), 2, Springer, New York, NY, 25-49.
- Nelson, A. D. L., Shippen, D. E., 2012, Surprises from the chromosome front: Lessons from Arabidopsis on telomeres and telomerase, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 77, 7-15.
- Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F., Lundblad, V., 1996, Cdc13p: A single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance, *Science*, 274 (5285), 249-252.
- O'Sullivan, R. J., Karlseder, J., 2010, Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11, 171–181.
- Oguchi, K., Liu, H., Tamura, K., & Takahashi, H., 1999, Molecular cloning and characterization of AtTERT, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Letters*, 457 (3), 465-469.
- Oguchi, K., Tamura, K. and Takahashi, H., 2004, Characterization of *Oryza sativa* telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity, *Gene*, 342 (1), 57-66.
- Olovnikov, A. M., 1971, Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides, *Doklady Akademii nauk SSSR*, 201 (6), 1496-1499.
- Olovnikov, A. M., 1973, A theory of marginotomy: The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *Journal of Theoretical Biology*, 41 (1), 181-190.

- Palm, W., de Lange, T., 2008, How shelterin protects mammalian telomeres, *Annual Review of Genetics*, 42, 301-334.
- Pardue, M. L., DeBaryshe, P. G., 2003, Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annual Review of Genetics*, 37, 485-511.
- Pickett, H. A., Cesare, A. J., Johnston, R. L., Neumann, A. A., Reddel, R. R., 2009, Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles, *EMBO Journal*, 28 (7), 799-809.
- Price, C. M., Boltz, K. A., Chaiken, M. F., Stewart, J. A., Beilstein, M. A., Shippen, D. E., 2010, Evolution of CST function in telomere maintenance, *Cell Cycle*, 9 (16), 3177-3185.
- Procházková Schrumpfová, P., Fojtová, M., Fajkus, J., 2019, Telomeres in plants and humans: not so different, not so similar, *Cells*, 8 (1), 58.
- Ren, S., Johnston, J. S., Shippen, D. E., McKnight, T. D., 2004, TELOMERASE ACTIVATOR1 induces telomerase activity and potentiates responses to auxin in Arabidopsis, *Plant Cell*, 16 (11), 2910-2922.
- Ren, S., Mandadi, K. K., Boedeker, A. L., Rathore, K. S., McKnight, T. D., 2007, Regulation of telomerase in Arabidopsis by BT2, an apparent target of TELOMERASE ACTIVATOR, *Plant Cell*, 19 (1), 23-31.
- Renfrew, K. B., 2014, *Telomere dynamics in Arabidopsis thaliana*, Thesis (PhD), Texas A&M University.
- Riha, K., Fajkus, J., Siroky, J., Vyskot, B., 1998, Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants, *Plant Cell*, 10 (10), 1691-1698.
- Riha, K., McKnight, T. D., Griffing, L. R., Shippen, D. E., 2001, Living with genome instability: Plant responses to telomere dysfunction, *Science*, 291 (5509), 1797-1800.
- Riha, K., Heacock, M. L., Shippen, D. E., 2006, The role of the nonhomologous end-joining DNA double-strand break repair pathway in telomere biology, *Annual Review of Genetics*, 40, 237-277.
- Ríos, J. L., Waterman, P. G., 1997, A review of the pharmacology and toxicology of Astragalus, *Phytotherapy Research*, 11 (6), 411-418.
- Salvador, L., Singaravelu, G., Harley, C. B., Flom, P., Suram, A., Raffaele, J. M., 2016, A natural product telomerase activator lengthens telomeres in humans: a randomized, double blind, and placebo controlled study, *Rejuvenation Research*, 19 (6), 478-484.
- Sax, K., Enzmann, E. V., 1939, The effect of temperature on X-Ray induced chromosome aberrations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 25 (8), 397-405.
- Schrumpfová, P. P., Vychodilová, I., Dvořáčková, M., Majerská, J., Dokládál, L., Schořová, Š., Fajkus, J., 2014, Telomere repeat binding proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase, *Plant Journal*, 77, 770-781.

- Sfeir, A., de Lange, T., 2012, Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem, *Science*, 336 (6081), 593-597.
- Shakirov, E. V., Surovtseva, Y. V., Osbun, N., Shippen, D. E., 2005, The Arabidopsis Pot1 and Pot2 proteins function in telomere length homeostasis and chromosome end protection, *Molecular and Cellular Biology*, 25 (17), 7725-7733.
- Shakirov, Eugene V., Perroud, P. F., Nelson, A. D., Cannell, M. E., Quatrano, R. S., Shippen, D. E., 2010, Protection of telomeres 1 is required for telomere integrity in the moss *Physcomitrella patens*, *Plant Cell*, 22 (6), 1838-1848.
- Shakirov, E. V., Shippen, D. E., 2004, Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type Arabidopsis, *Plant Cell*, 16 (8), 1959-1967.
- Shampay, J., Szostak, J. W., Blackburn, E. H., 1984, DNA sequences of telomeres maintained in yeast, *Nature*, 310 (5973), 154-157.
- Shay, J. W., Bacchetti, S., 1997, A survey of telomerase activity in human cancer, *European Journal of Cancer*, 33 (5), 787-791.
- Shay, J. W., Wright, W. E., 2019, Telomeres and telomerase: three decades of progress, *Nature Reviews Genetics*, 20, 299-309.
- Shen, C. Y., Jiang, J. G., Yang, L., Wang, D. W., Zhu, W., 2017, Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery, *British Journal of Pharmacology*, 174 (11), 1395-1425.
- Smith, J. R., Pereira-Smith, O. M., 1996, Replicative senescence: Implications for *in vivo* aging and tumor suppression, *Science*, 273 (5271), 63-67.
- Song, X., Leehy, K., Warrington, R. T., Lamb, J. C., Surovtseva, Y. V., Shippen, D. E., 2008, STN1 protects chromosome ends in *Arabidopsis thaliana*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (50), 19815-19820.
- Sováková, P. P., Magdolenová, A., Konečná, K., Rájecká, V., Fajkus, J., Fojtová, M., 2018, Telomere elongation upon transfer to callus culture reflects the reprogramming of telomere stability control in Arabidopsis, *Plant Molecular Biology*, 98 (1-2), 81-99.
- Sun, J., Yu, E. Y., Yang, Y., Confer, L. A., Sun, S. H., Wan, K., Lue, N.F., Lei, M., 2009, Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres, *Genes and Development*, 23, 2900-2914.
- Surovtseva, Y. V., Churikov, D., Boltz, K. A., Song, X., Lamb, J. C., Warrington, R., Leehy, K., Heacock, M., Price, C. M., Shippen, D. E., 2009, Conserved telomere maintenance component 1 interacts with STN1 and maintains chromosome ends in higher eukaryotes, *Molecular Cell*, 36 (2), 207-218.

- Surovtseva, Y. V., Shakirov, E. V., Vespa, L., Osburn, N., Song, X., Shippen, D. E., 2007, Arabidopsis POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance, *EMBO Journal*, 26 (15), 3653-3661.
- Sýkorová, E., Leitch, A. R., Fajkus, J., 2006, Asparagales telomerases which synthesize the human type of telomeres, *Plant Molecular Biology*, 60 (5), 633–646.
- Symington, L. S., Gautier, J., 2011, Double-strand break end resection and repair pathway choice, *Annual Review of Genetics*, 45, 247-271.
- Szostak, J. W., Blackburn, E. H., 1982, Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors, *Cell*, 29 (1), 245-255.
- Takai, K. K., Kibe, T., Donigian, J. R., Frescas, D., de Lange, T., 2011, Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2, *Molecular Cell*, 44 (4), 647-659.
- Teixeira, M. T., Arneric, M., Sperisen, P., Lingner, J., 2004, Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states, *Cell*, 117 (3), 323-335.
- Thomas, H., 2013, Senescence, ageing and death of the whole plant, *New Phytologist*, 197 (3), 696-711.
- Tomás-Loba, A., Flores, I., Fernández-Marcos, P. J., Cayuela, M. L., Maraver, A., Tejera, A., Borrás, C., Matheu, A., Klatt, P., Flores, J.M., Viña J., Serrano M., Blasco, M. A., 2008, Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice, *Cell*, 135 (4), 609-622.
- Tomaska, L., Nosek, J., Kramara, J., Griffith, J. D., 2009, Telomeric circles: Universal players in telomere maintenance, *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 1010–1015.
- Wang, Shifeng, Zhai, C., Liu, Q., Wang, X., Ren, Z., Zhang, Y., Wu, Q., Sun, S., Li, S., Qiao, Y., 2014, Cycloastragenol, a triterpene aglycone derived from *Radix astragali*, suppresses the accumulation of cytoplasmic lipid droplet in 3T3-L1 adipocytes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450 (1), 306-311.
- Wang, Shuguang, Li, J., Huang, H., Gao, W., Zhuang, C., Li, B., Zhou, P., Kong, D., 2009, Anti-hepatitis B virus activities of astragaloside IV isolated from *Radix Astragali*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32 (1), 132-135.
- Watson, J. D., 1972, Origin of concatemeric T7 DNA, *Nature New Biology*, 239, 197–201.
- Watson, J. M., Riha, K., 2010, Comparative biology of telomeres: Where plants stand, *FEBS Letters*, 584 (17), 3752-3759.
- Watson, J. M., Riha, K., 2011, Telomeres, aging, and plants: From weeds to Methuselah - A mini-review, *Gerontology*, 57, 129-136.

- Wiedemann, G., Koprivova, A., Schneider, M., Herschbach, C., Reski, R., Kopriva, S., 2007, The role of the novel adenosine 50-phosphosulfate reductase in regulation of sulfate assimilation of *Physcomitrella patens*, *Plant Molecular Biology*, 65 (5), 667- 676.
- Xin, H., Liu, D., Songyang, Z., 2008, The telosome/shelterin complex and its functions, *Genome biology*, 9 (9), 232.
- Yang, S. W., Kim, D. H., Lee, J. J., Chun, Y. J., Lee, J. H., Kim, Y. J., Chung I. K., Kim, W. T., 2003, Expression of the telomeric repeat binding factor gene NgTRF1 is closely coordinated with the cell division program in *tobacco* BY-2 suspension culture cells, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 21395-21407.
- Yu, E. Y., Kim, S. E., Kim, J. H., Ko, J. H., Cho, M. H., Chung, I. K., 2000, Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 24208-24214.
- Yu, Y., Zhou, L., Yang, Y., Liu, Y., 2018, Cycloastragenol: An exciting novel candidate for age-associated diseases, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16 (3), 2175-2182.
- Yung, L. Y., Lam, W. S., Ho, M. K. C., Hu, Y., Ip, F. C. F., Pang, H., Chin, A. C., Harley, C. B., Ip, N. Y., Wong, Y. H., 2012, Astragaloside IV and cycloastragenol stimulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in multiple cell types, *Planta Medica*, 78 (2), 115-121.
- Zappulla, D. C., Roberts, J. N., Goodrich, K. J., Cech, T. R., Wuttke, D. S., 2009, Inhibition of yeast telomerase action by the telomeric ssDNA-binding protein, Cdc13p, *Nucleic Acids Research*, 37 (2), 354–367.
- Zhao, Y., Li, Q., Zhao, W., Li, J., Sun, Y., Liu, K., Liu, B., Zhang, N., 2015, Astragaloside IV and cycloastragenol are equally effective in inhibition of endoplasmic reticulum stress-associated TXNIP/NLRP3 inflammasome activation in the endothelium, *Journal of Ethnopharmacology*, 169, 210-218.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Rabiya Merve CEYLAN
Doğum Yeri	Bakırköy/İSTANBUL
Doğum Tarihi	08.07.1993
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	05363299493
E-Posta Adresi	merveceylan@ogr.iu.edu.tr
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	01.07.2015

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

Makale ve Bildiriler
1. Arikan, B., Ceylan. R.M., Yuzbasioglu. İ.S., Turgut. N.K., Determination of Total Antioxidant Activity and Flavonoid Content of Aubrieta ekimi, 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, Konya, Turkey, 9-12 May 2017. (Poster) 2. Erbilgin Y., Tuncer F. N., Haryanyan G., Khodzhaev K., Ozdemir C., Ceylan R.M., Iseri Ugur S.A., Ozbek U., “Investing in the Future: BIOBANK”, Europe Biobank Week, Vienna, 13-16 September 2016. (Poster) 3. Ceylan. R.M. AIP geninin ailesel izole hipofiz adenomu (FIPA) üzerindeki rolü, 2016 IUDETAE Genç Araştırmacılar Günü, İstanbul, Türkiye, 7-8 Nisan 2016. (Sözlü sunum)