



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*Hordeum vulgare* L.) KÜLTÜR VARYETELERİNDE
TRANSPOZON VE KROMOZOM
ANALİZLERİ**

Sevgi MARAKLI
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman
Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
Nisan, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ARPA (*Hordeum vulgare* L.) KÜLTÜR VARYETELERİNDE
TRANSPOZON VE KROMOZOM
ANALİZLERİ**

Sevgi MARAKLI
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

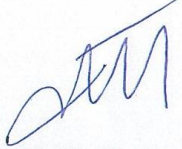
Danışman
Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI

Nisan, 2012

İSTANBUL

Bu çalışma 20/04/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

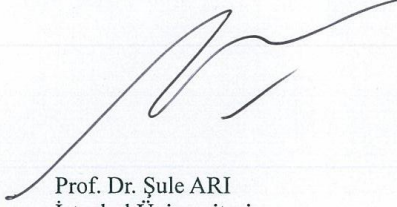
Tez Jürisi



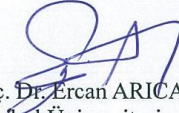
Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



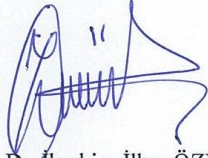
Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Şule ARI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT
Marmara Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięi'nin 14042 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda benden sevgi, destek ve ilgisini esirgemeyen, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım dersler aracılığıyla, eğitimime katkıda bulunan, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine, 35. madde kapsamında bu tez çalışmamın gerçekleşmesi için görevlendirilmemi sağlayan Amasya Üniversitesi Rektörlüğü, Amasya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığı ve Biyoloji Bölümü Başkanı'na,

Tez çalışmalarım sırasında dostluk ve yardımlarından yararlandığım MSc. Sibel YILMAZ'a, Araştırma Görevlisi Dr. Aslıhan TEMEL'e, MSc. Kaniye ŞAHİN'e ve tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca bana güvenen, gerek maddi gerekse manevi destekte bulunan AİLEME sonsuz teşekkür ederim.

Nisan, 2012

Sevgi MARAKLI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2. 1. ARPA	4
2.1.1. Arpanın Taksonomisi ve Arpa Genetiği	5
2.2. TRANSPOZONLAR.....	6
2.2.1. Transpozonların Biyolojik Önemleri ve Fonksiyonları	8
2.2.2. Transpozonların Sınıflandırılması, Hareket Mekanizmaları ve Yapıları	10
2.2.3. Otonom ve Otonom Olmayan Transpozabl Elementler	16
2.2.3.1. Otonom LTR Retroelementleri	17
2.2.3.2. Otonom Olmayan LTR Retroelementleri	18
2.2.4. LTR Retrotranspozonlarının Yapısı ve Yaşam döngüsü.....	20
2.2.4.1. Retrotranspozonların Yapısı.....	20
2.2.4.2. Retrotranspozonların Yaşam Döngüsü.....	20
2.3. EPİGENETİK	21

2.3.1. Epigenetik ve Transpozonlar.....	24
2.4. <i>BARE1 (BARLEY RETROELEMENT 1)</i> TRANSPOZONU	25
2.4.1. <i>BARE1</i> Yapısı.....	25
2.4.2. <i>Hordeum</i> Genom Evriminde <i>BARE1</i> 'in Rolü.....	26
2.5. <i>BAGY2 (BARLEY GYPSY ELEMENT 2)</i> TRANSPOZONU	27
2.6. IRAP 'INTER-RETROTRANSPOSON AMPLIFIED POLYMORPHISM'	28
2.7. KROMOZOM	29
2.7.2. Kromozomların Özel Yapıları.....	29
2.7.2.1. <i>Sentromer</i>	29
2.7.2.2. <i>Telomer</i>	30
2.7.2.3. <i>NOR ("Nucleolus Organizing Region") - Nükleolar Organize Edici Bölge</i>	30
2.7.3. Kromozomların Elde Edilmesi.....	31
2.8. KLASİK BANTLAMA YÖNTEMLERİ	31
2.9. DİZİ ANALİZİ	33
3. MALZEME VE YÖNTEM	34
3.1. BİTKİ MATERYALİNİN YETİŞTİRİLMESİ	34
3.2. GENOMİK DNA VE TOTAL RNA İZOLASYONU	35
3.3. DNA ve RNA JEL ELEKTROFOREZİ.....	37
3.4. DNaz I UYGULAMASI ve cDNA SENTEZİ	38
3.5. IRAP- PCR	40
3.6. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ.....	41
3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	42
3.8. <i>BAGY2</i> ve <i>BARE1</i> RETROTRANSPOZONLARININ İÇ DOMENLERİNİN ÇOĞALTILMASI.....	42
3.9. PCR ÜRÜNLERİNİN JELDEN GERİ KAZANILMASI.....	44

3.10. KLONLAMA ÇALIŞMALARI	44
3.10.1. Ligasyon	45
3.10.2. Kompetent <i>E. coli</i> Hücrelerin Hazırlanması	46
3.10.3. Transformasyon.....	47
3.10.4. Koloni PCR.....	48
3.10.5. Plazmit İzolasyonu ve Restriksiyon Kesimi	49
3.10.6. Dizi Analizi.....	50
3.11. KROMOZOM ANALİZLERİ	50
4. BULGULAR	52
4.1. GENOMİK DNA VE RNA İZOLASYONLARI	52
4.2. IRAP-PCR SONUÇLARI	53
4.3. <i>BARE1</i> VE <i>BAGY2</i> İÇ DOMENLERİNİN ÇOĞALTILMASI	56
4.2.1. <i>Gag</i> Domeninin PCR Sonuçları	56
4.2.2. <i>Env</i> Domeninin PCR sonuçları	57
4.2.3. <i>Rt</i> Domeninin PCR sonuçları	58
4.3. KLONLAMA ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	59
4.4. DİZİ ANALİZİ	61
4.5. KROMOZOM ANALİZLERİ.....	63
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
KAYNAKLAR.....	69
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: LTR ve TIR dizileri.....	10
Şekil 2.2	: LTR dizilerinin yapısı	11
Şekil 2.3	: Transpozonların sınıflandırılması.....	14
Şekil.2.4	: LTR retrotranspozonları.....	17
Şekil 2.5	: <i>Ty3/Gypsy</i> LTR retroelement yapısı	18
Şekil 2.6	: LARD ve TRIM retroelementlerinin yapısı	19
Şekil 2.7	: LTR retrotranspozonlarının hücre içi teorik yaşam döngüsü	21
Şekil 2.8	: <i>BARE1</i> retrotraspozonunun yapısı.....	25
Şekil.2.9	: <i>BAGY2</i> retrotranspozonunun yapısı	28
Şekil.2.10	: IRAP markır çalışma prensibi	28
Şekil 2.11	: Bir bitki kromozomunun organizasyonu ve özellikleri	30
Şekil 3.1	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan markırlar.....	38
Şekil.3.2	: Klonlamada kullanılan vektör haritası.....	45
Şekil 4.1	: <i>BARE1</i> IRAP-PCR sonuçları.....	54
Şekil 4.2	: <i>BAGY2</i> IRAP-PCR sonuçları	55
Şekil 4.3	: <i>BARE1 gag</i> domeni için yapılan PCR sonuçları	56
Şekil 4.4	: <i>BAGY2 env</i> domeni için yapılan PCR sonuçları.....	57
Şekil 4.5	: <i>BAGY2 rt</i> domeni için yapılan PCR sonuçları	58
Şekil 4.6	: Genomik DNA'lardan çoğaltılan PCR ürünlerinin saflaştırılması	59
Şekil 4.7	: Koloni PCR	60
Şekil 4.8	: Restriksiyon endonükleaz analizi	61
Şekil 4.9	: Dizi analizlerinin BLAST sonuçları	62
Şekil 4.10	: Arpa kromozomlarının metafaz evresinde DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskopta görünümü.....	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1	: Agaroza jel elektroforezinde ve FA (formaldehit agaroza) jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	38
Tablo 3.2	: DNaz I reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.....	39
Tablo 3.3	: cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler	39
Tablo 3.4	: cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler	40
Tablo 3.5	: IRAP-PCR bileşenleri ve miktarları.....	40
Tablo 3.6	: IRAP-PCR döngüleri.....	41
Tablo 3.7	: IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri ve T _m sıcaklıkları.....	41
Tablo 3.8	: %6’lık PAGE bileşenleri ve miktarları.....	41
Tablo 3.9	: 5X TBE tamponunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları	42
Tablo 3.10	: İç domenlerin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve hedef büyüklükleri	43
Tablo 3.11	: İç domenlerin çoğaltılmasında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları	43
Tablo 3.12	: <i>BARE1/gag</i> ve <i>BAGY2/env</i> iç domenlerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR döngüleri	43
Tablo 3.13	: <i>BAGY2/rt</i> iç domeninin çoğaltılmasında kullanılan PCR döngüleri	44
Tablo 3.14	: Blunting reaksiyon bileşenleri ve miktarları	46
Tablo 3.15	: Klonlamada kullanılan besi ortamları ve çözeltilerin içerikleri	48
Tablo 3.16	: Koloni PCR bileşenleri ve miktarları	49
Tablo 3.17	: Koloni PCR döngüleri	49
Tablo 3.18	: Restriksiyon kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları	50
Tablo 4.1	: Embriyo, kök ve yapraklar arasındaki Jaccard benzerlik indeksi (%)	55

SEMBOL LİSTESİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
A	: Adenin
AP	: Aspartik proteinaz
APM	: Aminopirofosfometil
BAGY2	: “ <i>Barley Gypsy Element 2</i> ”
BARE1	: “ <i>Barley Retroelement 1</i> ”
bç	: Baz çifti
BLAST	: “Basic Local Alignment Search Tool”
C	: Sitozin
°C	: Santigrad derece
C değeri	: Belli bir türün haploid genomundaki DNA miktarı
CaCl₂	: Kalsiyum korür
cDNA	: Tamamlayıcı DNA - “complementary DNA”
cm	: Santimetre
cM	: Santi Morgan
cv	: Kültür varyetesi – “cultivar”
DA	: Distamisin A - “Distamycin A”
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol - “4',6-diamidino-2-phenylindole”
DEPC	: Dietilpirokarbonat
dH₂O	: Distile su
DNA	: De(z)oksiribonükleik asit
dNTP	: Dezoksiribonükleotit trifosfat - “deoxyribonucleotide triphosphate”
DTT	: Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EST	: “Expressed Sequence Tags”
EN	: Endonükleaz
ENV	: Kılıf proteini - “envelope protein”
FA	: Formaldehit agaroz
FISH	: Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyonu - “Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization”
G	: Guanin
g	: Gram
GAG	: Gruba özgü antijen
HAT	: Histon asetil transferaz
HCl	: Hidroklorik asit
HDAC	: Histon deasetilaz
HMT	: Histon metil transferaz
HRBT	: Yüksek çözünürlüklü bantlama tekniği - “High Resolution Banding Technique”

HU	: Hidroksiüre
IRAP	: “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism”
ISH	: <i>In situ</i> hibridizasyon
INT	: İntegraz
LARD	: “Large Retrotransposons Derivatives”
LINE	: “Long Interspersed Nuclear Elements”
LTR	: “Long Terminal Repeats”
K. Koch.	: Karl Koch
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
kg	: Kilogram
M	: Molar
MB	: Megabaz
mg	: Miligram
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mRNA	: Mesajcı RNA
miRNA	: Micro RNA
MITE	: “Miniature Inverted Transposable Elements”
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mRNA	: Haberci RNA
MOPS	: “3-[N-morpholino]propanesulfonic acid”
N	: Normal
n	: Haploid kromozom sayısı
NaCl	: Sodyum klorür
NCBI	: “National Center for Biotechnology Information”
ng	: Nanogram
NOR	: Nükleoler Organize Edici Bölge - “Nucleolus Organizing Region”
OD	: Optik dansite
ORF	: “Open Reading Frame”
p	: Kromozomun küçük kolu
PAGE	: Poliakrilamit jel elektroforezi – “Polyacrylamide Gel Electrophoresis”
PBS	: “Primer Binding Site”
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu - “Polymerase Chain Reaction”
pg	: Pikogram
PLE	: “Penelope Like Elements”
pmol	: Pikomol
PPT	: “Polypurine Tract”
PR	: Proteaz
rDNA	: Ribozomal DNA
RH	: RNaz H
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferans
RT	: Ters Traskriptaz - “Reverse Transcriptase”
rpm	: Dakikadaki devir sayısı - “revolutions per minute”
rRNA	: Ribozomal RNA
q	: Kromozomun uzun kolu
S	: Sedimentasyon - “Svedberg birimi”

SINE	: “Short Interspersed Elements”
Sp .	: Tür “species”
ssp.	: Alt tür “subspecies”
siRNA	: Small-interfering RNA
SF50	: Sodyum salin sitrat ve formamid
SOB	: “Super Optimal Broth”
SOC	: “Super Optimal Broth with Catabolite Repression”
SSC	: Sodyum salin sitrat
T	: Timin
TAE	: Tris-asetat-edta
TBE	: Tris-borik asit-edta
TEMED	: Tetrametiletilendiamin
TIR	: “Terminal Inverted Repeats”
T_m	: Erime sıcaklığı- “Temperature of melting”
TRIM	: “Terminal Repeat Retrotransposon in Miniature”
tRNA	: Transfer RNA
TSD	: “Target Site Duplication”
UTL	: “Untranslated Leader Sequence”
UV	: “Ultra-violet”
V	: Volt
v/v	: “Volume to volume”
VLP	: “Virus-Like Particle”
YR	: “Tyrosine recombinase”
w/v	: “Weight to volume”

ÖZET

ARPA (*Hordeum vulgare* L.) KÜLTÜR VARYETELERİNDE TRANSPOZON VE KROMOZOM ANALİZLERİ

Retrotranspozonlar genom içinde hareket edebilen elementlerdir. Hareketleri gelişim boyunca farklılık göstermektedir. Değişik dokularda retrotranspozon hareketlerindeki farklılık incelenmesine karşın gelişim süresinde hareket farklılığını inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada, arpada bitkisinde (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak 157/37) gelişim sırasında IRAP ("Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism") tekniği kullanılarak embriyo, kök ve yapraklarda *BARE1* (*Barley Retroelement 1*) ve *BAGY2* (*Barley Gypsy Element 2*) retrotranspozon hareketleri ve Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu ("RT-PCR") ile gen anlatım profilleri incelendi. Retrotranspozonlar moleküler düzeyde incelendikten sonra retrotranspozonların kromozomal düzeydeki etkileri arpa kromozomlarında analiz edildi.

BARE1 ve *BAGY2* retrotranspozonlarının hareketliliğini incelemek amacıyla DNA ve RNA izolasyonu yapıldı. Örnekler, 10 günlük kök ve yapraklardan alındı. Elde edilen DNA'lar kalıp olarak kullanıldı. *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonları için ikiye farklı primer ile IRAP-PCR yapıldı. PCR ürünleri poliakrilamid jel elektroforezinde ayrıldı ve incelendi. İzole edilen RNA'lar ise, cDNA oluşturulmak üzere kalıp olarak kullanılarak gen anlatım profilleri açısından araştırıldı.

Arpa kromozomlarının incelenmesi amacıyla, çimlendirilen arpa tohumları Carnoy fiksantı (3:1, etanol:asetik asit) içerisinde konuldu. Kök uçları daha sonra preparat yapımında kullanıldı. Metafaz evresinin gözlenmesi amacı ile preparatlar DAPI (4',6-diamidin-2-fenilindol) ile boyanıp floresan mikroskopta incelendi.

BARE1 retrotranspozonunda çok az hareket gözlenirken, *BAGY2* retrotranspozonunun stabil (hareketsiz) olduğu görüldü. *BARE1-gag*, *BAGY2-env* ve *BAGY2-rt* domenlerinin (retrotranspozonların yaşam döngüsü için gerekli proteinleri kodlayan bölgeler) PCR analizlerinde, *BARE1 gag* domeni genomik DNA'dan çoğaltılabilmemesine karşın cDNA'dan çoğaltılamadı. *BAGY2 env* domeninin ise embriyo ve yaprak cDNA'larından çoğaltılabilmemesi *env*'nin bu örneklerde anlatım yaptığını göstermektedir. Buna karşın, kök dokuları ile yapılan PCR'in negatif sonuç vermesi, *env* domeninin kökte aktif olmadığını göstergesidir. *BAGY2 rt* domeni için yapılan PCR, hem genomik DNA'larda hem de cDNA'larda pozitif sonuç vermiştir. Buna karşın, farklı tohumların çimlendirilmesi ile elde edilen, aynı dokulara ait cDNA'larda görülen PCR ürünü miktarlarının farklı olması, bireyler arasında *rt* domeninin anlatım profilinin değişebileceğini göstermektedir.

Arpa bitkisinde gelişim sırasında retrotranspozon hareketlerinin incelenmesi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, arpa gelişiminde *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozon hareketlerinin ve gen anlatım profillerinin farklılığını göstermektedir. Elde edilen bulguların, epigenetik değişimlerin arpa gelişimi üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Arpa kromozom analizleri ile retrotranspozonların kromozom üzerinde yerlerinin ve retrotranspozonların sebep olduğu kromozomal anomalilerin belirlenmesi gibi konularda daha kapsamlı bilgilere ulaşılması beklenmektedir.

SUMMARY

TRANSPOSON AND CHROMOSOME ANALYSIS ON BARLEY (*Hordeum vulgare* L.) CULTURE VARIETIES

Retrotransposons are genetic elements that can move within the genome. Their movements show difference during development. Although retrotransposon movements were investigated in various tissues, studies on retrotransposon movements during development are limited. In this study, *BARE1* (*Barley Retroelement 1*) and *BAGY2* (*Barley Gypsy Element 2*) retrotransposon movements in barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak 157/37) embryo, root and leaves were investigated during development by using IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) technique and gene expression profiles by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). After retrotransposons were investigated at molecular level, retrotransposons effects at chromosomal level were analysed barley chromosomes.

DNA and RNA isolations were performed to examine *BARE1* and *BAGY2* retrotransposons movements. Samples were obtained from 10-day-old barley root and leaves. The resulting DNAs were used as template. IRAP-PCR for *BARE1* and *BAGY2* retrotransposons was carried out by using two different primers for each. PCR products were separated and analysed by Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE). Isolated RNAs used as template to synthesize cDNA were investigated in terms of gene expression profiles.

Barley seeds were put into Carnoy fixative (3:1, ethanol:acetic acid) to investigate barley chromosomes. Root tips were then used for preparation. To observe metaphase phase, preparations were stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and investigated by a fluorescence microscope.

Very low *BARE1* retrotransposon movements were monitored whilst *BAGY2* retrotransposons were observed to be more stable (immobile). In PCR analysis of *BARE1-gag*, *BAGY2-env* and *BAGY2-rt* domains (regions that encode proteins necessary for the life cycle of retrotransposons), although *BARE1 gag* domain was amplified from genomic DNA, it could not be amplified from cDNA. The amplification of *BAGY2 env* domain from embryo and leaf cDNAs indicates that *env* is expressed in these samples. On the other hand, PCR with root tissue showing a negative result demonstrates that *env* domain is not active in the roots.

PCR analysis from *BAGY2* *rt* domain gave positive results with both genomic DNAs and cDNAs. On the other hand, different PCR products of cDNAs, belonging to the same tissue derived from different germinating seeds, demonstrate that the expression profile might change among individuals.

Studies on retrotransposon movements in barley during development are limited. Results obtained from this thesis indicate that *BARE1* and *BAGY2* retrotransposon movements and gene expression profiles are different. The findings are expected to contribute to understanding of the effects of the epigenetic changes during barley development. Barley chromosome analyses are also expected to give more comprehensive information such as determination of retrotransposons locations on chromosome and determination of chromosomal aberrations caused by retrotransposons.

1. GİRİŞ

Yüksek organizasyonlu bir organizmanın genetik yapısı döllenme sonucu oluşur ve gelişim süresince mutasyonlar oluşmadıkça değişmediği kabul edilir. Bununla beraber genom büyüklüğü ve DNA içeriğinde önemli varyasyonlar oluşabilir. Bu varyasyonların en önemli nedenleri arasında kromozom rekombinasyonları, transpozisyon, gen amplifikasyonları ve tekrarlı dizilerin artışı sayılabilir (Li, 2009). Bu somatik genom varyasyonları gelişim sırasında gelişme programlarında dokudan dokuya farklılıklar gösterebilir (Astolfi ve diğ., 2010; Baillie ve diğ., 2011). Transpozonlar genoma en önemli oranda dinamizm sağlayan hareketli elementlerdir ve genomun büyük kısmını oluştururlar. Transpozonlar büyük oranda epigenetik mekanizmalarla suskun olarak tutulurken (Slotkin ve Martienssen, 2007) içlerinde çok hareketli olanlarına da rastlanmaktadır (Kazazian, 2004).

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) buğdaygillerden taneleri malt ve yem olarak kullanılan önemli bir tahıl bitkisi. Tarih öncesi devirlerden beri kültürü yapılan ve ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelmektedir (Badr ve diğ., 2000; Saisho ve Purugganan, 2007). Arpanın kısa yaşam döngüsü, tek yıllık bir bitki olması, diploid olması ($2n=14$) ve 7 büyük (6-8 μm) kromozoma sahip olması genetik çalışmalarda kullanımını arttırmaktadır (Ramage, 1985). Bununla birlikte, arpanın fizyolojik, morfolojik ve genetik açıdan büyük çeşitlilik göstermesi, geniş ölçüde tohum stoklarının ve genetik haritalarının bulunması ve kendi kendine döllenebilmesi gibi özellikleri, arpanın fizyolojik ve moleküler çalışmalar için model bitki olarak kullanılmasında önemli rol oynamaktadır (Koornneef ve diğ., 1997; Forster ve diğ., 2000; Rodriguez ve diğ., 2006). Arpa genom projesi 2011 yılında tamamlanmıştır (Mayer ve diğ., 2011).

Transpozon, kromozom üzerinde yeni bir yerleşim noktasına hareket eden DNA parçasıdır. İlk kez Barbara McClintock tarafından mısır bitkisinde keşfedilmiştir (McClintock, 1950). Bitki genomunun (örn. *Triticeae*) yaklaşık % 90'ı transpozonlardan oluşmuştur. Transpozonlar tarafından oluşturulan genom hareketlerine transpozisyon denir. Genel olarak transpozonlar genomdaki transpozisyon mekanizmalarına göre retrotranspozonlar ve DNA transpozonları olmak üzere iki gruba ayrılır (Finnegan, 1989).

Transpozonlar kromozomlarda yeni yerleştikleri yerlerdeki genlerin anlatımlarını değiştirir. Sonuçta var olan genetik verileri etkileyerek gen anlatımında önemli değişikliklere neden olurlar. Bununla birlikte replikasyonla çoğalan DNA transpozonları ve retrotranspozonlar genom büyümesine yol açar. Transpozonlar; insersiyon, inversiyon, delesyon, duplikasyon gibi olayları uyararak mutasyonlara ve böylece yeni allellerin oluşmasına sebep olurlar. Bu yeni oluşumlar evrimsel süreçte yeni türlerin ortaya çıkmasında etkili bir mekanizma olarak görülmektedir (Bennetzen, 2000; Schulman ve diğ., 2004; Pagnotta ve diğ., 2009). Günümüzde transpozonlar, prokaryotlarda klasik antibiyotiğe direnç markırı, ökaryotlarda insersiyon mutasyonları, haritalama, gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi gibi amaçlarla moleküler genetik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Bergman ve Quesneville, 2007).

Retrotranspozonların hareketleri, genomik DNA ve korunmuş uçları arasında yeni ek yerleri oluşturduğu ve polimorfizme sebep olduğu için markır olarak kullanılabilir. Polimorfizmin belirlenmesinde kullanılan en yaygın markır tekniği IRAP – “Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism” dır (Leigh ve diğ., 2003; Schulman ve diğ., 2004). IRAP, iki komşu retrotranspozon arasında kalan intergenomik bölgenin PCR ile çoğaltılmasına dayanır.

Retrotranspozonlar kendilerini kopyalayıp sonra bu kopyalarını genomda çeşitli yerlere yerleştirir. Retrotranspozonlar önce transkripsiyon yoluyla kendilerini bir RNA molekülü olarak kopyalar, sonra bu RNA (çoğu zaman transpozon tarafından kodlanan) bir ters transkriptaz tarafından tekrar DNA'ya dönüştürülür ve genoma geri sokulur.

Retrotranspozonlar uzun uç tekrar dizilerine (LTR - “Long Terminal Repeat”) sahip olma durumlarına göre iki gruba ayrılırlar. LTR'li retrotranspozonların LTR dizilerinde promotörler ve retrotranspozisyon için gerekli olan en az iki enzimi kodlayan genler bulunur. LTR'li retrotranspozonlar retrovirüslere çok benzer ama virüs olarak paketlenmelerini sağlayan *env* genine sahip değildirler (Feschotte ve diğ., 2002; Marco ve Marin, 2005; Wicker ve diğ., 2007). Retrotranspozonlar gen anlatımını değiştiren, mutasyonları uyaran ve genom büyümesine sebep olan en önemli epigenetik değişimlerden biri olarak görülmektedir. Günümüze kadar bitkilerde retrotranspozonlar üzerine yapılan çalışmalarda, retrotranspozonların evrimi, çeşitliliği, rekombinasyonu ve bir türün evrimini nasıl etkiledikleri gibi çalışmalara yoğunluk verilmiştir.

Mitotik kromozomların, metafaz evresinde belirli bölgelerini boyayan özel boyalarla boyanmaları sonucu kromozom bantlama yöntemleri ortaya çıkmıştır. Günümüzde ise değişik kromozom analiz yöntemleri hem insanlarda hem bitkilerde geliştirilmiş ve çeşitlenmiştir. G bantlama, Q bantlama, C bantlama, R bantlama ve NOR bantlama geliştirilen teknikler arasında sayılabilir (Conger ve Fairchild, 1953; Caspersson ve diğ., 1968; Crossen, 1972; Funaki ve diğ., 1975; Verma ve Lubs, 1975). Bu yöntemler kromozomların tanınmasında, yapı ve evrimlerinin analizinde önemli bir yere sahiptir. Kromozom anomalileri, heteromorfizmleri ve genetik hastalıklar bu yöntemler kullanılarak erkenden teşhis edilebilmektedir (Liu ve diğ., 2004; Fragouli ve diğ., 2011). Hastalıkların teşhisinde yoğun olarak kullanılan bantlama tekniklerinin bitkiler üzerinde kullanımı daha azdır. Bunun nedeni kromozomların eldesinin hücre çeperi nedeni ile zahmetli oluşudur.

Gelişim sürecinde transpozon davranışları ile ilişkili çalışmalar ve transpozonları kromozomal düzeyde inceleyen çalışmalar sınırlıdır. Bu çalışmada *Hordeum vulgare* L. cv. Tokak (157/37) tohumlarından elde edilen kök ve yaprak dokularında *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozon hareketleri olgun embriyo ile karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Retrotranspozonlar ayrıca anlatım profilleri açısından incelenmiştir. Moleküler düzeyde farklılığa sebep olan transpozonların kromozomal düzeyde bir değişiklik oluşturup oluşturmadığını analiz etmek amacıyla köklerde kromozom analizleri de gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ARPA

Arpa (*Hordeum vulgare* L.) ekonomik önemi olan bitkilerin başında gelir. Arpa tarih boyunca maruz kaldığı ıslah çalışmaları ve doğal seleksiyonlar sonucunda, tarımsal üretimini kolaylaştıracak fenotipik özellikler kazanmıştır (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007). Arpanın önemi; kuraklık, düşük sıcaklık ve tuzluluk gibi oldukça zor şartlarda bile büyüme yeteneğinden gelmektedir (Van Oosterom ve diğ., 1993; Katerji ve diğ., 2006).

Arpa, bira yapımı ve hayvan yemi olarak kullanılmasının yanı sıra beta-glukan içeriğinin fazla olması ve kolesterol miktarını düşüren E vitamini yönünden zengin olması ile insan sağlığına da katkıda bulunur. Arpa ayrıca, tüm dünyada, 57 milyon hektardan daha fazla alanda üretimi yapılan, agroekonomik olarak önemli bir bitkidir (FAOSTAT, 2010; <http://www.fao.org/faostat>). Üretilen arpanın %55'i hayvan yemi olarak, %39'u malt üretiminde, %3.5'i tohum olarak, %1.7'si ise insan besini olarak kullanılmaktadır (<http://barleyworld.org/whatisbarley/BarleyProduction.php>).

Arpa, ekonomik olarak önemli olmasının yanı sıra; genetik, fizyolojik, biyosistematik, genetik, sitogenetik, moleküler sitogenetik, mutasyon, popülasyon genetiği, hücre ve doku kültürü, genetik transformasyon ve bitki yetiştirme çalışmaları için model organizma olarak görülmektedir (Koornneef ve diğ., 1997; Forster ve diğ., 2000; Singh, 2006). Kısa yaşam döngüsü, tek yıllık bir bitki olması, genomunun yedi çift kromozomdan oluşması ve kendi kendine döllenebilmesi model bitki olarak kullanılmasını sağlayan özellikler arasındadır (Forster ve diğ., 2000).

2.1.1. Arpanın Taksonomisi ve Arpa Genetiği

Arpa (*Hordeum vulgare* spp.), *Gramineae* (*Poaceae*) ailesinin *Hordeum* cinsine aittir. *Hordeum*, diploid ($2n=2x=14$), tetraploid ($2n=4x=28$) ve hexaploid ($2n=6x=42$) genotipe sahip 32 türden oluşur (Von Bothmer ve diğ., 1995). *Hordeum* cinsinin en önemli türleri *bogdanii*, *brachyantherum*, *bulbosum*, *depressum*, *jubatum*, *marinum*, *murinum*, *pusillum*, *secalinum* ve *vulgare* olarak sayılabilir (Vicent ve diğ., 1999a).

Üstalem: **Eukarya** – Ökaryotlar

Alem: **Plantae** – Bitkiler

Altalem: **Tracheobionta** – Damarlı bitkiler

Üstşube: **Spermatophyta** – Tohumlu bitkiler

Şube: **Magnoliophyta** – Çiçekli bitkiler (Angiospermae)

Sınıf: **Liliopsida** – Monokotil (Tek Çenekli) Bitkiler

Altsınıf: **Commelinidae**

Takım: **Cyperales**

Aile: **Poaceae** – Buğdaygiller (Gramineae)

Altaile: **Pooideae**

Oymak: **Triticeae**

Cins: **Hordeum** – Arpa

Tür: **Hordeum vulgare** (Woese ve diğ. 1990,

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=barley.inf)

Arpa, 5.096×10^9 baz çiftinden oluşan bir genomu sahiptir. Diploid kromozom sayısı $2n=14$, nükleer DNA 1C değeri 5.2 pg'dir (Pourkheirandish ve Komatsuda, 2007; Schulte ve diğ., 2009). NCBI ("National Center for Biotechnology Information") veritabanında arpaya ait 501,620 ESTs ("Expressed Sequence Tag") bulunmaktadır (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html).

Bu çalışmada kullanılan Tokak varyetesi, Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nce geliştirilmiş ve 1963 yılında tescil ettirilmiştir. Dane verimi ve malthık kalitesi iyi, yemlik ve biralık olarak yetiştirilen bir çeşit olan Tokak 157/37, uzun boylu (ortalama 90-100 cm), kışa ve kurağa az dayanıklı, başakları uzun iki sıralı, seyrek ve paralel kılçıklıdır. Dane rengi açık saman sarısı, bin dane ağırlığı 48-50 g civarındadır.

Adaptasyon kabiliyeti çok geniş olan alternatif bir çeşittir. Taban ve yarı taban alanlara günlük olarak ekilir. Tokak varyetesinin ekildiği bölgeler: Orta Anadolu ve geçit bölgeleri ile Doğu Anadolu bölgeleridir. Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde iki sıralı beyaz arpaların yayılması Tokak arpa varyetesi ile olmuştur (Kaydan ve Geçit, 2005; Kaydan ve Yağmur, 2007).

2.2. TRAN스포ズONLAR

Transpozonlar genom içinde yer değiştirebilme yeteneğine sahip DNA dizileridir. Bu yer değiştirebilen tekrarlı diziler, transpozisyon aracılığı ile bir kromozomal bölgeden diğerine hareket ederler. *Plasmodium* cinsinin birkaç türü hariç tüm ökaryotlarda ve neredeyse tüm prokaryotlarda bulunan transpozonlar, ökaryotik genomların büyük bir yüzdesini oluştururlar (Okamoto ve Hirochika, 2001; Bowen ve Jordan, 2002; Grzebelus, 2006; Wicker ve diğ., 2007; Jurka, 2008; Huang ve diğ., 2009). Transpozonlar, bitki genomlarının ortalama %50-90, hayvan genomlarının da %3-45 kadarını oluşturmaktadır. Prokaryotların çoğunluğunda %1-3 oranında bulunan transpozonların yüzde miktarı, mayada (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen) %3, memelilerde %25-45, insanda %45 ve *Graminaceae*'de ve *Liliaceae*'de %90-98 kadardır (Bowen ve Jordan, 2002; Schulman ve Kalendar, 2005; Mansour, 2007; Wicker ve diğ., 2007; Roberts ve diğ., 2008; Lerat, 2009; Wessler, 2009).

Barbara McClintock (1902-1992), mısırdaki kromozom kırılmaları ve bunun genetik sonuçları ile ilgili yaptığı çalışmada kontrol elementleri ("controlling elements") olarak adlandırdığı transpozonları keşfetmiştir. Renklendirilen örnekler incelendiğinde, McClintock, iki element ile bir mutasyon sistemi tanımlamıştır. Mutasyona sebep olan ilk elementi "activator" (Ac) ve mutasyon aktivitesini kontrol eden ikinci elementi "dissociator" (Ds) olarak adlandırmıştır (McClintock, 1953). Her iki elementin mısırdaki 9. kromozom üzerinde pozisyonlarını değiştirme yeteneğine sahip oldukları fark edilmiş ve çalışmanın sonucunda Ac elementinin kendi hareketini kontrol edebildiği anlaşılmıştır. McClintock, bu hareketi "transpozisyon" olarak adlandırmış ve 1956 yılında, mısırdaki "suppressor-mutator" sistemi olarak adlandırılan ikinci bir transpozisyon sistemi rapor etmiştir.

Bu sistem, iki gen ve transpozabl elementlerin bir dizisini içermektedir (McClintock, 1956). Genom organizasyonu ve genom stabilitesi ile ilgili görüşlerin değişmesini sağlayan bu çalışmalar ile McClintock, 1983 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür.

Transpozabl elementler; 1970'li yılların sonunda *Drosophila melanogaster* ve *Saccharomyces cerevisiae* (Finnegan ve diğ., 1978; Cameron ve diğ., 1979), 1980'li yıllar boyunca *Caenorhabditis elegans* ve insanda (Rosenweig ve diğ., 1983; Paulson ve diğ., 1987) ve 1990'lı yıllarda ise filamentli mantarlarda tanımlanmıştır (Daboussi ve diğ., 1991). Hareketli elementler şimdiye kadar hemen hemen tüm organizmalarda bulunmuştur. Mısır genomunun %75'ten fazlası (Baucom ve diğ., 2009) ve insan genomunun yaklaşık %45'i (Lander ve diğ., 2001) hareketli elementler tarafından oluşturulmaktadır.

Transpozonlar hareketlilikleri açısından aktif transpozonlar ve inaktif transpozonlar olmak üzere iki kategoriye ayrılırlar. Bu hareketli elementlerin büyük bir yüzdesi, adlarının tersine inaktif transpozonlardan oluşur. Türlerin evriminin erken aşamalarında bu inaktif transpozonlar, transpozisyon yapmış ve bugünkü bulunduğu kromozomal bölgelere yerleşmişlerdir. Bu yüzden inaktif transpozonlar, moleküler fosil olarak da adlandırılmaktadır. Ancak transpozonların aktif veya inaktif olması tamamen kalıcı bir durum değildir ve tersine döndürülebilir. Çevresel koşulların değişmesi gibi faktörler bu elementleri aktive veya inaktive eden epigenetik yapılanmayı değiştirebilmektedir (Wessler, 2009).

Çoğu transpozonlar iki temel özellik taşırlar. Birincisi, genom içinde bir yerden diğerine hareket edebilme özelliği (transpozisyon), ikincisi de genomdaki kopya sayılarını arttırabilme (replikasyon) özelliğidir (Bennetzen, 2000). Bazı dizilerin genomda çok yüksek miktarda bulunmasından ve konak genomlarından daha hızlı replike olduklarının keşfedilmesinden dolayı, transpozonların kendi türlerinin devamlılığından başka bir amacı olmayan elementler olduğu varsayılmış ve transpozonlara bencil DNA denilmiştir (Okamoto ve Hirochika, 2001).

2.2.1. Transpozonların Biyolojik Önemleri ve Fonksiyonları

Teorik olarak, yer değiştirebilen elementler gen kodlayan bir bölgeye girebilir ve o geni inaktif hale getirebilir ya da genin çevresindeki bir bölgeye yerleşerek gen anlatımının düzenini değiştirebilir. Bununla birlikte gen dışı bölgeye de yerleşebilir ve burada sayısını arttırabilir. Uygulama alanında transpozonlar, moleküler biyologlar tarafından birçok amaçla kullanılmaktadır. Transpozonların neden olduğu insersiyon polimorfizmleri moleküler teknikler kullanılarak belirlenmektedir. Böylelikle DNA parmakizi, çeşitlilik ve filogeni araştırmaları ile genetik haritalamaya yönelik olarak birer markır olarak, gen klonlama, transgenik organizmaların eldesi, mutasyon algılayıcısı, mutasyon aracı olarak, prokaryotlarda klasik antibiyotik–direnc markırı olarak ve plazmit vektörler kullanılarak bakteri transformasyonunda kullanılabilirler. Transpozonların gen izolasyonunda kullanılması mutant fenotipten istenilen genin izolasyonu için önemlidir. İzlenecek yol, transpozon insersiyonu ile oluşan mutantı bulmak, kopyalanmış transpozonu prob olarak kullanarak genom kitaplığından geni izole etmek ve mutant gen aracılığıyla yabancı geni bulmaktır. Genelde aktif elementi bilinen organizmalar bu tip çalışmalarda kullanılırlar. Organizmada tanımlanmış element yoksa heterolog olan transpozonlar kullanılır ve element mutlaka istenilen gene giriş yapar (Grzebelus, 2006; Bergman ve Quesneville, 2007; Moran ve Malik, 2009).

Replikatif transpozisyonla hareket eden transpozonlar, genom boyutunun büyümesine neden olmaktadır. Gen fonksiyonunu, yapısını ve aktivitesini değiştirebilmekte aynı zamanda genom ve kromozom yapılarının da ciddi boyutlarda değişmesini sağlayabilmektedirler (Bennetzen, 2000; Fedoroff, 2000; Wicker ve diğ., 2007). Transpozonlar, genlere çok yakın bölgelere veya genlerin promotör bölgelerine de insersiyon yapabilmektedir. Yakınlarındaki veya promotörlerine girdikleri genleri, gen anlatımı açısından sessizleştirerek düzenlemektedirler.

Yer değiştirebilen elementleri oluşturan DNA dizileri, genelde metil grupları bakımından zengindir. Transpozonlar, bu metil gruplarının komşu bölgeleri etkilemesi sayesinde ve/veya RNAi (RNA interferans) mekanizması ile transkripsiyonu engelleyerek gen anlatımını düzenlerler.

Bu epigenetik düzenlenme sayesinde transpozonlar, embriyonik gelişim sırasındaki doku farklılaşmasından, ergin bireydeki çeşitli dokuların farklılıklarının korunmasına kadar birçok mekanizmada görev almaktadır.

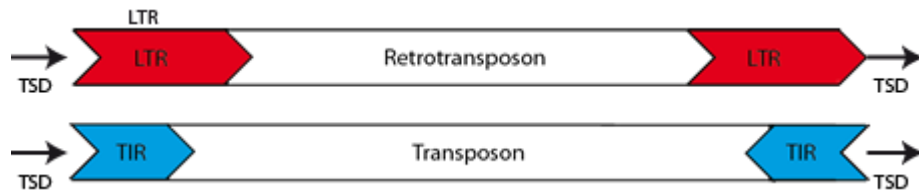
Transpozabl elementler genomda ekson bölgelerine girerek varyasyonlara neden olabilirler. Bu şekilde oluşturdukları null mutasyonlar sonucunda özel fenotipik çeşitlilik oluşabilir. *Drosophila*'da hem *P* elementinin hem de *copia* elementinin ekson dizileri arasına girmesi; kodlama yapan dizileri ve kırmızı göz pigmentinin üretimini değiştirmiştir. Sonuçta, pigment eksikliği olan beyaz göz oluşmuştur. Pigmentasyondaki bu değişiklik ile canlı, laboratuvar koşullarında hayatını devam ettirmesine karşın doğal popülasyonda yaşayamayabilir (Rubin ve diğ., 1982). Transpozabl elementler genlerin düzenleyici bölgelerinin de dizilerini değiştirebilir. *Drosophila*'da *yellow* geninin 5' upstream bölgesine *gypsy* elementinin insersiyonu sonucunda özel dokularda *yellow* geninde anlatım kaybı gözlenmiştir (Corces ve Geyer, 1991). Mısır bitkisinde ise, *Adh1* geninin TATA kutusuna *Mu* (*Mutator*) elementinin insersiyonu sonucu dokuya özgü RNA anlatımının değiştiği görülmüştür (Kloeckener-Gruissem ve diğ., 1992). İntronların içine giren transpozabl elementlerin birçoğu mRNA'nın işlenmesi sürecinde ayrıldıkları için gen ürünlerinde bir değişikliğe neden olmazlar. Transpozonlar, kromozom yapısı için ayrıca çok önemli başka fonksiyonlara da sahiptirler. Kromozom yapısının oluşumu sırasında, birçok transpozon sentromer ve telomer bölgelerine yerleşmiş ve yerleştikten sonra inaktive olmuşlardır. Ökaryotlarda kromozomların heterokromatin bölgeleri çoğunlukla bu moleküler fosillerden oluşmaktadır. Bunun dışında başka transpozonlar, aktif olarak kromatin yapısının oluşumunda, sentromer fonksiyonunda ve sinaptonemal komplekslerin bir araya gelmesinde, dolayısıyla hücre bölünmesinde önemli rol oynamaktadırlar (Thornburg ve diğ., 2005; Biémont, 2009).

Transpozonların aynı zamanda, genomların evrimine de büyük katkı sağlamış olduğu düşünülmektedir (Lippman ve diğ., 2004; Jurka, 2008; Venner ve diğ., 2009; Wessler, 2009). Günümüzde moleküler fosil olarak da adlandırılan inaktif elementler aslında doğal seçimde başarılı olabilmiş ve genoma zarar vermeyen elementlerdir; çünkü mutasyona neden olan transpozonların, konak genomlarına zarar vermeleri durumunda organizma yaşayamayacak, bu yeni insersiyonlar yeni döllere aktarılamayacaktır.

Yol açtıkları mutasyonlar, gen ve genom düzeyinde oluşturdıkları yapısal ve işlevsel değişiklikler ile gerektiğinde yeni alleller oluşturarak çeşitlilik ve fenotipik esneklik sağlar. Birçok araştırmacı, türlerin evrimsel geçmişinde tek bir genin replikatif transpozisyon yoluyla gen ailelerini oluşturduğunu ve bu sayede türlerin farklı gelişimsel ortamlara uyum sağlayabildiğini düşünmektedir (Wessler, 2006; Bergman ve Quesneville, 2007; Wicker ve diğ., 2007; Wessler ve Micklos, 2009).

2.2.2. Transpozonların Sınıflandırılması, Hareket Mekanizmaları ve Yapıları

Bütün işlevsel transpozabl elementler genomda bir bölgeden diğer bölgeye hareket etme yeteneğine sahiptir. Hareketli elementlerin birçoğu transpozisyon yoluyla genomda kopya sayılarını arttırabilir (Le Rouzic ve diğ., 2007). 1989 yılında Finnegan, aracı moleküle göre ilk transpozabl element sınıflandırma sistemini önermiştir. Bu sistemde, hareketli elementler transpozisyon mekanizmasına göre iki sınıfa ayrılmıştır: RNA (Sınıf I veya retrotranspozonlar) ya da DNA (Sınıf II veya DNA transpozonları). Sınıf I retrotranspozonlarının transpozisyon mekanizması kopyala ve yapıştır (“copy and paste”), Sınıf II’nin ise kes ve yapıştır (“cut and paste”) olarak isimlendirilir (Finnegan, 1989). Retrotranspozonlar, LTR (“Long Terminal Repeat” - Uzun Uç Tekrarları) dizileri ile sınırlandırılırken; DNA transpozonlarının uç kısımlarında TIR (“Terminal Inverted Repeat”) dizileri bulunur. LTR ve TIR dizileri transpozisyonda önemli rollere sahiptirler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. LTR ve TIR dizileri. LTR dizileri, TIR dizilerinden daha büyüktür. Her iki dizide siyah oklar ile Hedef Bölge Duplikasyonları (“Target Site Duplications” - TSD) gösterilmiştir. TSD, integrasyon mekanizmasından kaynaklanan çoğaltılmış genomik dizidir (<http://gydb.org/index.php/LTRs>).

LTR dizileri, genellikle 5’-TG...CA-3’ ters tekrarlar ile başlayıp biten (Şekil 2.2), hareketli genetik elementlerin iç bölgelerini sınırlandıran ve kodlama yapmayan DNA dizileridir (Voytas ve Boeke, 2002).



Şekil 2.2. LTR dizilerinin yapısı (<http://gydb.org/index.php/LTRs>).

LTR dizileri; U3, R ve U5 olmak üzere üç bölgeye ayrılabilir. U3 bölgesi 200-1.200 nükleotit uzunluğunda ve promotörlerin bulunduğu yerdir. R bölgesi, tekrarlardan oluşur. U5 bölgesi, 75-250 nükleotit uzunluğunda ve transkripsiyonu yapılmış genomun ilk bölümünü oluşturur. PBS olarak adlandırılan 18 nükleotitlik bölge genellikle 5' LTR ucunda bulunur. PBS, hücresel tRNA'nın 3' ucuna tamamlayıcıdır ve 5' LTR'nin R-U5 bölgesine tamamlayıcı olan DNA ipliğinin sentezlenmesi için ters transkriptaz ("reverse transcriptase" - *rt*) tarafından primer olarak kullanılır. Diğer küçük bir bölge olan PPT ise 3' LTR ucunda görülür ve konak hücre genomuna integre olmuş viral DNA formu olan proviral DNA ipliğinin sentezinin başlamasından sorumludur. Bazı durumlarda LTR'ler arası rekombinasyon, LTR dizilerinin yalnız kalmasına neden olmaktadır. Genomda tek başına kalan LTR dizilerine solo-LTR denir. Shirasu ve diğ. (2000), arpanın Rar 1 lokusundaki dizilerde retrotranspozon varlığını araştırmış ve 18 kb'lık aralıklarla toplanan 66 kb'lık alanlarda üçlü genler bulmuştur. Bu çalışmada aynı zamanda, çoğu retroelementin solo-LTR'ler içerdiği ve arpada LTR'ler arasındaki ortak özelliğin de intrakromozomal rekombinasyon içermeleri olduğu gösterilmiştir. Bazı organizmalarda solo-LTR kopyaları, genomda bulunan her elemente ait kopyaların sayısından bile fazladır (Kalendar ve diğ., 2000; Shirasu ve diğ., 2000; Gao ve diğ. 2004; Marco ve Marin, 2005). TIR dizileri, transpozaz tarafından tanınan DNA bağlanma bölgeleri içerir ve böylece transpozon genomik DNA'dan kolayca ayrılarak hareket eder (Craig ve diğ., 2002). TIR dizileri, transpozon aileleri arasında farklı sayıda ve uzunlukta olmasına karşın genelde iki işlevsel domene ayrılır: ilk domen, iki ya da üç baz çiftlik uç tekrarlar içerip hareket mekanizmasında görev alırken; ikinci domen transpozona özgü tanıma ve bağlanma için gereklidir (Craig ve diğ., 2002; Szabó ve diğ., 2010).

Otonom olmayan (hareket etmek için gerekli enzimleri kodlamayan) transpozabl elementler MITEs (“Miniature Inverted-Repeat Transposable Elements” - Minyatür Evrik Tekrarlı Transpozabl Elementler) olarak isimlendirilir. MITE dizilerinin keşfi iki sınıflı sistemin değişmesini sağlamıştır. Çok küçük olmalarının (100-500 bp) dışında Sınıf II (DNA) transpozonlarına benzerler ve transpozisyonları için gerekli olan genleri bulundurmazlar. Genomda bulunan başka transpozonların transpozazları aracılığıyla hareket ettikleri sanılmaktadır.

Bugün kullanılan hiyerarşik sınıflandırma, Thomas Wicker tarafından 2007 yılında önerilmiştir (Wicker ve diğ., 2007). Bu sınıflandırma bir yandan Finnegan’ın ikili sistemini temel alırken, bir yandan da mekanik ve enzimatik kriterler kullanmaktadır. Hiyerarşik bir sınıflandırma olduğundan; sınıf, alt sınıf, takım, üstaile, aile ve altaile terimleri kullanılır (Şekil 2.3). En üst takson olan sınıf, ikili sınıflandırmadaki gibi RNA transpozonları ve DNA transpozonları içerir.

Retrotranspozon da denilen, sınıf I transpozonları, transpozisyon aracı olarak RNA’yı kullanan RNA transpozonlarıdır. Bir RNA polimeraz enzimi aracılığı ile transpozonun mRNA’ya transkripsiyonu yapılır ve ardından ters transkriptaz aracılığı ile bu mRNA, cDNA’ya dönüştürülür. Sentezlenen cDNA genomdaki hedef bölgeye yerleşerek yeni konumunu alır. Replikatif ya da kopyala ve yapıştır olarak adlandırılan bu transpozisyon çeşidinde kopya sayısı fazlalaşır ve sonuçta genom büyüklüğü artar. (Marco ve Marin, 2005; Wicker ve diğ., 2007; Huang ve diğ., 2009).

Retrotranspozonlar, transpozisyon mekanizmalarına, organizasyonlarına ve ters transkriptaz filogenisine göre beş alt sınıfa ayrılabilir: *DIRS* benzeri elementler, *Penelope* benzeri elementler (PLEs), LINE ile SINE dizileri ve LTR retrotranspozonları. *DIRS* benzeri elementler, LTR retrotranspozonlarından farklı birçok özelliğe sahiptir. *DIRS* benzeri elementler, tirozin rekombinaz (“tyrosine recombinase” - YR) kodlar ama bir aspartik proteaz (*ap*) kodlamaz (Poulter ve Goodwin, 2005). *Penelope* benzeri elementler (PLEs), *Drosophila virilis*’ten izole edilmiştir. Tek bir ORF kodlayan PLE, *rt* ve endonükleaz (*en*) olmak üzere iki temel domene sahiptir ve böylece ökaryotik retroelementler arasında farklı bir sınıf oluşturur (Evgen'ev ve Arkhipova, 2005).

LINE dizileri yaygın olarak bulunan ve LTR dizileri içermeyen, hareket için gerekli dizilere sahip olan (otonom) elementlerdir. Transpozisyon için gerekli proteinleri kodlayan ORF, bir poly (A) dizisi ve polimereaz II promotörü ile 6.000 bp uzunluğuna kadar çıkabilen ve genomda 500.000 kopya kadar bulunan retrotranspozon kökenli dizilerdir. İnsan genomunun yaklaşık %20'si LINE dizilerinden oluşur. SINE'ler ise otonom olmayan retrotranspozonlardır. SINE dizileri, bir iç promotöre ve genellikle poly (A) uca sahip kısa elementlerdir. Kodlama yapmamaları nedeni ile hareketleri için diğer genlere ihtiyaç duyarlar. LINE'ler kendi hareketlerini yürütürler. Ek olarak, SINE'lerin genom içine girişleri için gerekli proteinleri de sağlarlar. LTR'li retrotranspozonlar, LTR dizilerinde promotörleri ve retrotranspozisyon için gerekli olan en az iki enzimin genlerini taşır. Hem yapı hem de transpozisyon mekanizması açısından retrovirüslere çok benzerler. Tek farkları, virüs olarak paketlenmelerini sağlayan *env* “*envelope*” genine sahip olmamalarıdır. Virüs benzeri retrotranspozonlar paketlenemedikleri için başka hücrelere bulaşmazlar. Bu elementler *env* genini edinmek veya kaybetmek yoluyla birbirlerine dönüşebildikleri için, retrovirüslerin evrim sürecinde ökaryotlardaki LTR'li retrotranspozonlardan kökenlenmiş olabileceği düşünülmektedir (Feschotte ve diğ., 2002; Marco ve Marin, 2005; Wicker ve diğ., 2007).

Sınıflandırma		Yapı	HBD	Kod	Bulunduğu organizmalar
Order	Superfamily				
Sınıf I (retrotranspozonlar)					
LTR	Copia		4-6	RLC	P, M, F, O
	Gypsy		4-6	RLG	P, M, F, O
	Bel-Pao		4-6	RLB	M
	Retrovirus		4-6	RLR	M
	ERV		4-6	RLE	M
DIRS	DIRS		0	RYD	P, M, F, O
	Ngaro		0	RYN	M, F
	VIPER		0	RYV	O
PLE	Penelope		Değişken	RPP	P, M, F, O
LINE	R2		Değişken	RIR	M
	RTE		Değişken	RIT	M
	Jockey		Değişken	RIJ	M
	L1		Değişken	RIL	P, M, F, O
	I		Değişken	RII	P, M, F
SINE	tRNA		Değişken	RST	P, M, F
	7SL		Değişken	RSL	P, M, F
	5S		Değişken	RSS	M, O
Sınıf II (DNA transpozonları)- Altsınıf 1					
TIR	Tc1-Mariner		TA	DTT	P, M, F, O
	hAT		8	DTA	P, M, F, O
	Mutator		9-11	DTM	P, M, F, O
	Merlin		8-9	DTE	M, O
	Transib		5	DTR	M, F
	P		8	DTP	P, M
	PiggyBac		TTAA	DTB	M, O
	PIF-Harbinger		3	DTH	P, M, F, O
	CACTA		2-3	DTC	P, M, F
Crypton	Crypton		0	DYC	F
Sınıf II (DNA transpozonları)- Altsınıf 2					
Helitron	Helitron		0	DHH	P, M, F
Maverick	Maverick		6	DMM	M, F, O

Semboller					
	Long Terminal Repeats (LTR) Uzun uç tekrar dizileri		Terminal Inverted Repeats (TIR) Ters çevrilmiş uç tekrarları		Kodlanan Bölge
	Kodlanmayan bölgelerde diyagnostik şekil		Birden fazla ORF içeren bölge		Kodlanmayan Bölge
Protein Kodlayan Domainler					
AP: Aspartik Proteinaz	APE: Apürinik endonükleaz	ATP: ATPaz paketlenme	C-INT: C-integraz	CYP: Sistein proteaz	ORF: Fonksiyonu bilinmeyen açık okuma bölgesi (Open reading frame)
ENV: Envelope Protein (Kılıf proteini)	GAG: Kapsid proteini	HEL: helikaz	INT: integraz	RT: Revers Transkriptaz (Ters Transkriptaz)	
POL B: DNA polimeraz B	RH: RNaz H	RPA: Replikasyon proteini A (Sadece bitkilerde bulunur)	EN: Endonükleaz	Y2: YY motifli YR	
Tase: DDE motifli Transpozaz		YR: Tirosin rekombinaz			
Bulunduğu Organizmalar					
P: Plants (Bitkiler) M: Metazoans (Metazoalar) F: Fungi (Mantarlar) O: Others (Diğer organizmalar)					

Şekil 2.3. Transpozonların sınıflandırılması (Wicker ve diğ., 2007).

LTR'li retrotranspozonlar, *gag* ve *pol* adlı iki gen içerirler (Şekil 2.3). *Gag* geni, kılıf yapısında bir proteini, *pol* geni ise çok fonksiyonlu bir polipeptidi kodlar. Bu polipeptid, aspartik proteinaz (*ap*), ters transkriptaz (*rt*), RNaz H (*rh*) ve integras (*int*) aktivitelerine sahiptir. LTR'li retrotranspozonlar bitki genomlarının çok önemli bir yüzdesini kapsar. Birçok bitkide, genomun %40-70'ini LTR'li retrotranspozonlar oluşturmaktadır (Pearce ve diğ., 1996; SanMiguel ve diğ., 1996; Shirasu ve diğ., 2000). *Arabidopsis thaliana* genomunun %15 kadarı, arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve buğday (*Triticum* sp.) gibi bazı türlerin genomlarının da %70-80 kadarı bu dizilerden oluşmuştur. Retrotranspozonlar genom boyunca bulunmalarına karşın, tahıllarda sıklıkla biri diğerinin içinde olacak şekilde yerleşmişlerdir ve retrotranspozon denizleri “retrotransposon seas” olarak tanımlanan bu bölgeler, gen adalarını çevreler (SanMiguel ve diğ., 1996; Ramakrishna ve diğ., 2002; Bernet ve Asins, 2004; Gu ve diğ., 2004). LTR'li retrotranspozonlar evrim sürecinde genom boyutlarının hızlı bir şekilde artmasını sağlamıştır; buna karşın çok küçük bir kısmı aktiftir.

Sınıf II transpozonları ise, transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanmayan DNA transpozonlarıdır. DNA transpozonları iki farklı tipte hareket ederler: kendilerini bulundukları lokustan kesip çıkararak (konservatif) veya kendilerini replike ederek (replikatif) genomun başka bir bölgesine yerleşirler (Wicker ve diğ., 2007). Sınıf II elementler iki alt sınıfa ayrılır: Alt sınıf I; TIR ve Crypton (tyrosine recombinase) dizilerini içerirken alt sınıf II, Helitron ve Maverick gruplarından oluşur (Şekil 2.3). Helitron, ökaryotlarda bulunan bir transpozondur ve yuvarlanma (“rolling-circle”) mekanizması ile çoğalır. Maverick, uzun terminal evrik tekrarlar (“Long Terminal-Inverted Repeats”) şeklinde bulunur; ama diğer ORF dizilerini içermez. DNA transpozonlarının hepsi kes-yapıştır mekanizmasını kullanarak hareket etmez. Alt sınıf I ve alt sınıf II transpozonlar, kendilerini yeni bir hedef bölgeye replike ederler. Replikatif transpozisyonunda, transpozabl element reaksiyon boyunca duplike olur ve bu sadece retrotranspozonlar için değil, aynı zamanda Sınıf II transpozonlar için de belli bir özelliktir (Duval-Valentin ve diğ., 2004).

DNA transpozonları genelde otonom elementler olup basit bir yapıya sahiptirler. Çoğunluğunun gövde kısmında transpozaz enzimini kodlayan tek bir gen ve bu genin iki ucunda transpozaz enziminin rekombinasyon işlemi için gerekli ters çevrilmiş tekrarlar olan TIR dizileri bulunmaktadır. Bu kısa tekrarlar genelde 10-40 bp uzunluğunda olmakla birlikte, 200 bp uzunluğunda da olabilmektedirler.

Otonom olmayan elementler transpozaz kodlayan geni içermezler; ancak içerdikleri TIR dizileri ve otonom bir transpozonun üretmiş olduğu transpozaz sayesinde genomda hareket edebilirler. DNA transpozonlarının transpozisyonu sırasında gereken başka bir enzim de rezolvazdır ve transpozonun insersiyon yapabilmesini sağlar (Smit ve Riggs, 1996; Feschotte ve diğ., 2002; Wessler, 2009). Bir DNA parçası transpozaz enzimini şifrelemese dahi bu ters yönlü tekrarlara sahip olursa, yardımcı bir transpozonun transpozaz enzimi aracılığıyla genomda hareket etmeye devam edebilir. Transpozaz, transpozonun iki ucundaki DNA'yı ve hedef noktasındaki DNA'yı yapışkan uçlar oluşturacak şekilde keserek genomdan transpozonu çıkarır ve yeni konumuyla bütünleştirir. Rezolvaz enzimi bütünleştirme aşamasında tek zincirli kesikler oluşturarak, transpozon DNA'sının onu çevreleyen DNA ile düzgün bir şekilde bütünleşmesini sağlar. Konak hücreye ait olan DNA polimeraz açık kalmış tek zincirli yerleri doldurur, DNA ligaz da şeker-fosfat zincirini kapayınca transpozisyon tamamlanmış olur. Bazı transpozazlar DNA molekülünün herhangi bir yerine bağlanabilirken, bazıları ise kendine özgün dizilere bağlanır. Transpozazlar transkripsiyonel baskılayıcılar da olabilir; bu transpozazların kendi promotörleri vardır ve metilasyon aracılığıyla bağlanmalarını etkilerler. Böylece otoregülasyon sağlanır.

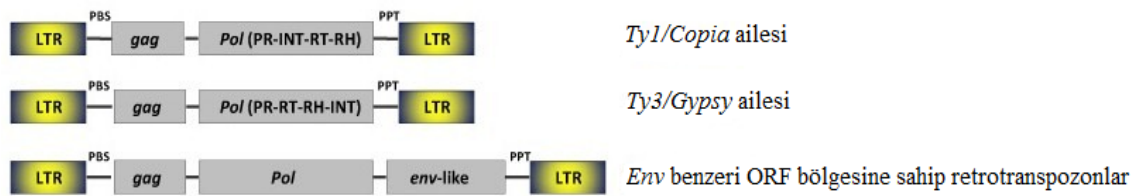
2.2.3. Otonom ve Otonom Olmayan Transpozabl Elementler

MITE gibi dizilerin keşfinden sonra, transpozonlar transpozisyon aracına göre değil, tamamen enzimolojik olarak sınıflandırılmıştır. Kullanılan ölçütlerden biri, transpozonun kendi transpozisyonu için gerekli olan enzimleri üretip üretmemesidir. Buna göre, otonom elementler kendi transpozisyonları için gerekli enzimleri, özellikle transpozazı kodlayabilen transpozonlardır. Otonom olmayan transpozabl elementler, otonom olan elementlerde bulunan ve kodlanan dizilerden bazılarını içerebilir ya da hiçbirini içermezler (Tanskanen ve diğ., 2007).

Transpozabl elementlerin her iki sınıfı, ters transkriptaz ya da transpozaz enzimlerini kodlayan dizileri kendiliğinden oluşan mutasyon sonucu kaybederse, hareket yeteneklerini kaybedebilirler; bu durumda bile diğer elementler gerekli enzimleri üretmeye devam ettiği için, transpozonlar genom içinde hareketlerini sürdürebilirler. Bir transpozonun otonom olarak adlandırılabilmesi için onun transpozisyon için gerekli bütün domenleri üretebilmesi gereklidir. Bazı transpozonlar, genlerden bir kısmını kodlayamazken diğer genleri kodlamaya devam edebilir. *CACTA* süperailisi bu çeşit transpozonlara örnek verilebilir. Bu aile, transpozaz genini kodlayamaz; ama ikinci ORF dizisini (Wicker ve diğ., 2003) içerir. *Triticeae* takımından *BARE2* elementleri de *gag* dizilerine sahiptir (Tanskanen ve diğ., 2007).

2.2.3.1. Otonom LTR Retroelementleri

LTR dizileri kısa ve ters tekrarlardan oluşur. Herhangi bir protein kodlamamalarına karşın elementin transkripsiyonu ile ilişkili olan promotörleri ve özellikleri içerirler (Kumar ve Bennetzen, 1999). LTR retroelementleri, 5' LTR kısmında primer bağlanma bölgesi ("Primer Binding Site" – PBS) ve 3' LTR kısmında polipürin sistemi ("Polypurine Tract" – PPT) dizileri içerir. İç bölgelerde, LTR retroelementlerinin transpozisyonları ve çoğalma evreleri için gerekli ürünleri kodlayan *gag* ve *pol* (bazı durumlarda *env*) domenleri (Eickbush ve Jamburuthugoda, 2008) bulunur. Otonom LTR retroelementleri ise dizi benzerliği ve diğer özellikler yönünden, *Ty1/Copia*, *Ty3/Gypsy*, *Bel/Pao* ve Retroviridae aileleri olmak üzere dörde ayrılırlar (Şekil 2.4).

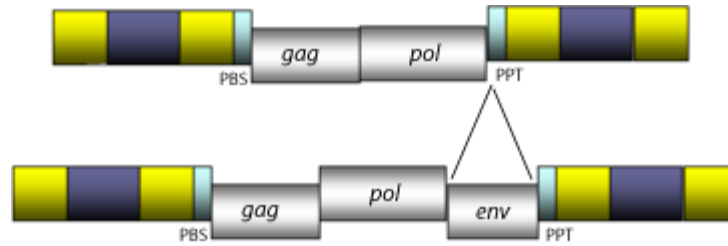


Şekil 2.4. LTR retrotranspozonları (http://gydb.org/index.php/LTR_retroelements).

Ty1/Copia retroelementleri ökaryotlarda bulunan en önemli LTR retroelementler olarak düşünülmektedir (Eickbush ve Malik, 2002). *Ty1/Copia* LTR elementlerinin, tek hücreli alglerden bitki ve hayvanlara kadar yaygın olarak bulunması, evrimsel süreçte *Ty3/Gypsy* LTR retroelementleri ile ortak atadan geldiğini düşündürmektedir (Llorens ve diğ., 2009).

Ty1/Copia iç bölgesi, diğer LTR transpozonlarında olduğu gibi benzer domenler kodlamasına karşın bunların sıraları farklıdır. Bitkilerde tanımlanan bazı *Ty1/Copia* LTR retroelementleri bu domenlere ek olarak *env* dizisini de kodlar (Havecker ve diğ., 2005). *Ty1/Copia* LTR retroelementleri, diğer LTR retroelementleri ile genom organizasyonu bakımından benzerlik gösterirler. Bu benzerlikler; 100-1300 nükleotid dizisi içeren 5' LTR ve 3' LTR bölgeleri, tRNA'nın 3' ucuna tamamlayıcı ve retrotranskripsiyonu başlatıcı bölge olan 18 nükleotid dizisi içeren PBS, iç domenlerin *gag*, *pol*, ve retrovirüslerde olduğu gibi *env* bölgeleri içermesi olarak sayılabilir.

Ty3/Gypsy LTR retroelementleri ise, LTR retrotranspozonları ile retrovirüslerin oluşturduğu bir ailedir (Şekil 2.5). *Ty3/Gypsy* LTR retroelementlerinin diğer LTR retroelementlerle olan genom yapıları ve benzerlikleri, evrimsel süreçte LTR retroelement sisteminin anlaşılmasında rol oynamıştır (Llorens ve diğ., 2009).

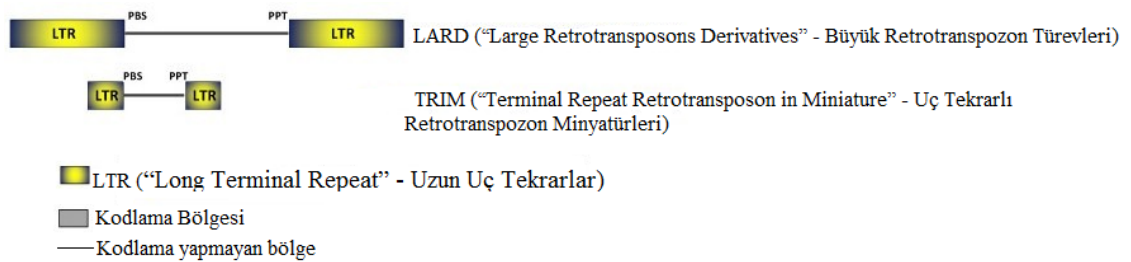


Şekil 2.5. *Ty3/Gypsy* LTR retroelement yapısı (<http://gydb.org/index.php/Ty3/Gypsy>).

Ty3/Gypsy LTR retroelementinin yapısı omurgalı endojen retrovirüslerine (Alfa Retrovirüs, Beta Retrovirüs ve Delta Retrovirüs gibi) benzemektedir. 5' LTR dizilerinin 3' ucunda PBS bölgesi bulunur. Bu bölge, *Ty1/Copia* LTR retroelementlerinde olduğu gibi tRNA'nın 3' ucuna tamamlayıcıdır ve retrotranskripsiyonu başlatıcı 18 nükleotitlik dizi içerir. PBS bölgesinden sonra *gag*, *pol* ve retrovirüslerde *env* domenleri bulunur (Şekil 2.5).

2.2.3.2. Otonom Olmayan LTR Retroelementleri

Otonom olmayan LTR retroelementleri, otonom elementlerde olduğu gibi LTR, PBS ve PPT dizilerini taşırlar; ancak kodlama yapmazlar. Otonom olmayan iki sınıf LTR retrotranspozonu; LARD (“Large Retrotransposons Derivatives” - Büyük Retrotranspozon Türevleri) ve TRIM (“Terminal Repeat Retrotransposon in Miniature” - Uç Tekrarlı Retrotranspozon Minyatürleri)’dir. Bu elementler hareketlerini diğer otonom olan elementlerin yardımıyla sağlar. Otonom olmayan LTR retroelementleri sadece bitkilerde tanımlanmıştır. LARD dizileri, 5.5-8.5 kb uzunluğunda ve kodlama yapmayan bölgesini sınırlandıran 3.5 kb büyüklüğündeki LTR dizilerinden oluşmaktadır (Şekil 2.6). Çoğalma ve integrasyon aşamalarında *Ty3/Gypsy* LTR retroelementlerinin kodladığı proteinleri kullandıkları için bu elementlerden evrimleştikleri düşünülmektedir (Kalendar ve diğ., 2004). TRIM elementleri, 540 bp’den daha kısadır (Şekil 2.6). Bu diziler 100-250 bp uzunluğundaki küçük LTR dizileri ile sınırlandırılan 100-300 bp’lik PBS ve PPT dizilerini içeren kodlama yapmayan bir iç bölgeye sahiptir. Monokotiledon ve dikotiledon bitki türlerinde tanımlanan bu elementler, bitki genomunu aktif olarak etkiler (Witte ve diğ., 2001). LARD dizileri, tamamen *Triticale* genomlarında, özellikle arpa ile ilişkili bitkilerde *Sukkula* benzeri elementler olarak bulunmasına karşın, *Triticale* ve çeltik dışında da tanımlanmışlardır (Jiang ve diğ., 2002a; 2002b).



Şekil 2.6. LARD ve TRIM retroelementlerinin yapısı
(http://gydb.org/index.php/LTR_retroelements).

2.2.4. LTR Retrotranspozonlarının Yapısı ve Yaşam Döngüsü

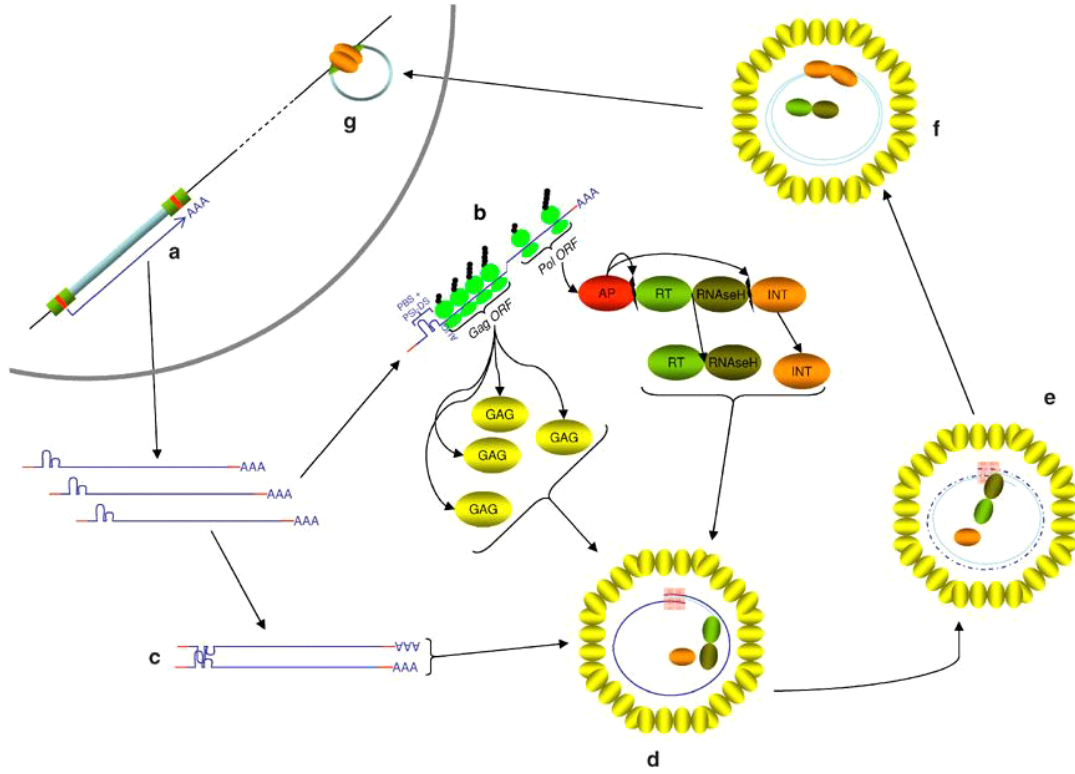
2.2.4.1. Retrotranspozonların Yapısı

LTR retrotranspozonlarının hepsi, genellikle 5'-TG...CA-3' dizisini içeren kısa evrik tekrarlar ile sınırlandırılmıştır. Otonom elementlerde, 5' LTR promotör işlevini, 3' LTR ise terminatör (sonlandırıcı) ve poliadenilasyon aktivitelerini sağlar (Casacuberta ve Santiago, 2003). LTR dizisi, birkaç yüz baz çifti (mısır: *Bs1* ve çeltik: *Tos17*) uzunluğunda olabileceği gibi, binlerce baz çifti de (çeltik: *RIRE3*) içerebilir (Kumar ve Bennetzen, 1999; Witte ve diğ., 2001). LTR dizileri arasında iç kodlama bölgesi yer alır. Otonom elementlerin bu bölgesinde, retrotranspozonun paketlenmesi için gerekli olan *gag* proteini ile proteaz (*pr*), *rt*, *rh* ve *int* dizilerini içeren *pol* geni bulunmaktadır. Proteaz enzimi *POL* poliproteinini degrade eder. *Rt* ve *rh*, çoğalan RNA'nın genomu girmesini, *int* ise retrotranspozonun yeni cDNA kopyasının, genomda yeni bir yere girmesini sağlar (Havecker ve diğ., 2004).

2.2.4.2. Retrotranspozonların Yaşam Döngüsü

LTR retrotranspozonlarının transpozisyonları (Şekil 2.7) hakkındaki bilgilerin bir kısmı maya retrotranspozonları ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilmiştir (Voytas ve Boeke, 2002); ama farklı konaklardan gelen benzer LTR retrotranspozonları arasında da bu mekanizmanın oldukça benzer olduğu varsayılmaktadır. Bir retrotranspozonun RNA'sı, 5' LTR içinde yer alan bir promotördeki RNA polimeraz II tarafından transkribe edilir. Hücresel genlerin çoğunda olduğu gibi, transkripsiyon TATA kutusundan sonra başlar. RNA daha sonra ters transkripsiyonun gerçekleştirilmesi ve integrasyon basamaklarında kullanılması için gerekli proteinleri sentezlemek üzere sitoplazmada okunur. İki RNA molekülü bir VLP ("Virus-Like Particle") içinde paketlenir ve RNA'dan ters transkripsiyon reaksiyonu boyunca tam uzunlukta cDNA kopyası oluşturulur (Şekil 2.7). Retrotranspozonun diğer kopyası genomu yeniden eklenir (Havecker ve diğ., 2004). Konak genomu cDNA kopyalarının eklenmesi, retrovirüslerin ve LTR retrotranspozonlarının yaşam döngüsünün tamamlanması açısından önemli bir aşamadır. Genom girme süreci şu aşamalardan oluşur: LTR uçlarının bağlanması ve işlenmesi, konak genomda hedef DNA'nın tanımlanması ve kesilmesi, LTR dizilerinin hedef DNA ile birleşimi. İlk aşama sitoplazmada gerçekleşirken diğer aşamalar nükleusta olur (Sabot ve Schulman, 2006).

Gypsy süperailesinin tüm LTR retrotranspozonları, genoma girebilecekleri hedef bölgenin belirlenmesinde oldukça seçicidir. Diğer LTR retrotranspozonları bu şekilde bir seçicilik göstermez.



Şekil 2.7. LTR retrotranspozonlarının hücre içi teorik yaşam döngüsü. (a) Nükleusta, transkripsiyon 5' - 3' doğrultusunda gerçekleşir. (b) Sitoplazmada, gag ve pol bölgelerinde translasyon ve protein sentezi. Pol bölgesi; ap, rt, RNaz H ve int bölgeleri olarak ayrılmıştır. (c) Paketleme öncesi ve paketleme sırasında RNA dimerizasyonu. (d) RNA paketlenmesi ve ters transkripsiyonun başlaması. (e) RNA matriksinin bozulması ve cDNA'nın ikinci ipliğinin sentezi. (f) Çift iplikli cDNA sentezinin tamamlanması. (g) Çift sarmalın kırılması ve yeni sentezlenen kopyanın genomda yeni bir bölgeye integrasyonu (Sabot ve Schulman, 2006).

2.3. EPİGENETİK

Epigenetik, DNA dizisinden bağımsız olarak gen anlatımında meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Çok farklı ve birbirleriyle ilgisiz gibi görünen çeşitli biyolojik olaylar, epigenetik mekanizmaların etkisinde meydana gelmektedir. Bunların başlıcaları; X kromozomu inaktivasyonu, genomik imprinting, paramutasyon, floral simetri, farelerde agouti lokusunun aktarılması, 'polycomb' sessizleştirilmesi, konum-etki çeşitliliği, sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster* L.) Hox genlerinin modellenmesi, hücre farklılaşması, kanser gelişimi ve nöronal gelişim olarak sayılabilir.

Günümüzde epigenetik, prokaryotik ve ökaryotik birçok organizmada gelişimsel, fizyolojik, nörolojik, sitogenetik, kalıtsal, evrimsel, patolojik ve tıbbi alanlarda araştırılmaktadır (Bird, 2007; Kiefer, 2007; Martin ve Zhang, 2007; Van Vliet ve diğ., 2007).

Epigenetik mekanizmalar; histon değişimleri, RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing) ve DNA metilasyonu olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır (Egger ve diğ., 2004). Bu mekanizmaların birlikte çalışması sonucu gen anlatımında kalıtsal değişiklikler meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birinde meydana gelen bir hata, gen anlatımının aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik bozukluklara yol açmaktadır.

Histon değişimleri, kromatinin yapı ve işlevini değiştirdiği için epigenetik düzenlemeler olarak bilinmektedir. Modifikasyonlar, histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmektedir. Histon-DNA, histon-histon etkileşimlerinde DNA'nın paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen anlatımının düzenlenmesi gibi birçok biyolojik olayı kontrol edebilmektedir (Ho ve Crabtree, 2010). Belli başlı histon modifikasyonları; asetillenme, deasetillenme, metilasyon ve fosforillenmedir. Histonların asetillenmesi, histon H3 ve H4'te 9. lizinde histon asetil transferazlar (HAT) tarafından gerçekleştirilir. Histonlardaki lizinler, yoğun "+" yüklü aminoasitlerdir. Asetillenmiş histonların "+" yükü azalır ve histonların DNA ile olan ilişkileri zayıflar. Gevşek paketlenme olur ve kromatin açılır, transkripsiyon aktif hale geçer. Histonların deasetillenmesi histon deasetilazlar (HDAC) tarafından asetil gruplarının uzaklaştırılması ile gerçekleşir. Deasetillenme ile histonlardaki "+" yük artar. Bu da "-" yüklü DNA ile "+" yüklü histonların ilişkisini artırır; histonlar sıkıca paketlenir ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması engellenir. Histonlarda N terminal kuyrukta bulunan lizin ve arjinin bakiyelerinin metillenmesi, histon metil transferazlar (HMT) tarafından gerçekleştirilir (Szyf, 2005). Histonların fosforillenmesi ise, mitoz sırasında ve sinyal iletiminde kinazlar aracılığı ile serin bakiyelerinde gerçekleşir.

RNA ile indüklenen sessizleşmede (RNA-induced silencing), bazı özel RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için tetikleyici olduğu; heterokromatin bölgenin oluşumuna katkı sağlayarak kalıtsal olarak sessizleşmesini sağladığı düşünülmektedir. Kodlama yapmayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir. RNA interferans olarak bilinen, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel sessizleştirmede görevli olan miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA bu süreç için örnek olarak verilebilir (Mattick, 2012; Minkovsky ve diğ., 2012).

DNA metilasyonu, DNA'yı doğrudan etkileyen epigenetik bir mekanizmadır. DNA metillenmesi, adenin ya da sitozin bazının yapısına metil grubu eklenmesi ile gerçekleşir. Metillenme sonucunda adenin halkasının 6. pozisyonundaki karbon atomuna (6-metiladenin) veya sitozinin 5. pozisyonundaki karbonuna (5-metilsitozin) metil grubunu eklenir. Sitozin halkasında gerçekleşen metillenmenin, türe ve dokuya özgü olduğu (Vanyushin ve diğ., 1973); hormonlar tarafından düzenlendiği (Vanyushin ve Kirnos, 1988) ve yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterdiği (Berdushev ve diğ., 1967) anlaşılmıştır. Metillenme, ökaryotlarda genomun transpozonlardan korunmasını sağlayan bir gen sessizleştirme mekanizmasıdır (Martienssen ve Colot, 2001). DNA metilasyonu, embriyogenez ve genomik baskılanma, yaşlanma, X kromozomunun transkripsiyonel inaktivasyonu ve kanser gibi biyolojik süreçlerde önemlidir (Bock ve Lengauer, 2008). Normal hücrelerde DNA metilasyonu genellikle LINE, SINE ve satellit DNA'ları içeren tekrarlı genomik bölgelerde meydana gelir (Robertson, 2005). Hareketli elementler ve diğer tekrarlanan DNA dizileri hipermetilendiğinden, hareketli elementlerin transpozisyonu engellenir. Böylece tekrarlanan diziler arasında rekombinasyon meydana gelmez; kromozomun kararlı halde kalması sağlanır (Derks ve diğ., 2004). Sitozin metillenmesi, transkripsiyonda iş gören proteinlerin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek gen anlatımının baskılanmasına ve kapalı kromatin yapısının oluşumuna neden olur (Bird, 2002). Gen anlatımı bakımından sessiz olarak kabul edilen heterokromatin bölgeler genellikle metillenmiş durumda bulunur (Madlung ve Comai, 2004). Bitki (Bennetzen, 1996) ve memeli (Yoder ve diğ., 1997) genomlarında bulunan metillenmiş sitozinin büyük bir kısmı retrotranspozonların içindedir.

Sitozin metillenmelerinin, transpozon hareketleri ile doğrudan ilişkili oluşu (Chomet ve diğ., 1987; Banks ve diğ., 1988), doku kültüründe gerçekleşen metillenmedeki azalmanın, transpozonların aktivitesini arttırabileceğini düşündürmüştür (Kaeppler ve diğ., 2000).

2.3.1. Epigenetik ve Transpozonlar

Transpozon hareketlerinin çok önemli epigenetik etkileri bulunmaktadır. Transpozonlar, X kromozomu inaktivasyonundan “imprinting” (paternal ya da maternal kalıtım) kadar birçok epigenetik olayda önemli rollere sahiptir. Transpozonların neden olduğu yaygın epigenetik düzenlenmenin yanı sıra, transpozonların kendileri de epigenetik mekanizmalar tarafından sessizleştirilmekte veya aktifleştirilmektedir. İnaktif transpozon ve moleküler fosil kavramları bu sayede ortaya çıkmaktadır. Transpozonların büyük bir çoğunluğu inaktiftir ve bu inaktivite epigenetik nedenlerle gerçekleşebileceği gibi evrim sırasında element içi delesyon nedeniyle de gerçekleşmiş olabilir. Epigenetik olarak aktivitesini ve hareket edebilme yeteneğini kaybetmiş transpozonlara ‘örtülü element’ adı verilmektedir. Örtülü elementler ve otonom olmayan transpozonlar, sentromer ve telomer gibi genomun heterokromatik bölgelerini oluşturmaktadır (Banks ve diğ., 1988; Slotkin ve Martienssen, 2007; Weil ve Martienssen, 2008).

Epigenetik mekanizmalar, bazı koşullar altında sessiz transpozonların aktivasyonunda rol oynar. Buna örnek olarak, gelişim sürecinde sessiz olup, hem biyotik hem de abiyotik stres koşullarında etkin hale geçen bitki retrotranspozonları verilebilir. Epigenetik olarak aktive edilen bu LTR’li retrotranspozonlar, bulundukları yerdeki komşu genlerin de anlatımını epigenetik yollarla etkiler. Bu sebeple LTR’li retrotranspozonların bitki gelişim ve evriminde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Mansour, 2007). Epigenetik düzenleme, transpozonların olası zararlı etkilerini durdurucu bir mekanizma olarak işler. Transpozonları baskılayan susturucu mekanizmaların başlıcaları; RNAi ile post-transkripsiyonel sessizleştirme, histon kuyruk değişimleri, DNA metilasyonu ile kromatin paketlenme ve yoğunlaşmasındaki değişimlerdir. Bu baskılayıcı mekanizmalar sayesinde transpozonların yüksek mutatif özellikleri engellenmektedir (Banks ve diğ., 1988; Slotkin ve Martienssen, 2007; Weil ve Martienssen, 2008).

2.4. BARE1 (BARLEY RETROELEMENT 1) TRANSPOZONU

‘*Barley Retroelement 1*’ olarak isimlendirilmiş (Manninen ve Schulman, 1993) olan *BARE1* retrotranspozonu, arpa (*Hordeum vulgare* L.) ve diğer *Hordeum* türlerinin genomlarında bulunan aktif bir transpozondur. 1.8 kb uzunluğunda LTR dizileri ile sınırlandırılan 5.275 baz çifti büyüklüğünde bir iç domene sahiptir (Şekil 2.8). *BARE1*, tekrarlı DNA bölgelerinde kodlama yapan bölgelere oranla daha yaygın olarak bulunur. Arpa ve diğer *Hordeum* genomları, fazla miktarda *BARE1* solo-LTR dizilerini içerir (Vicient ve diğ., 1999b). Arpa genomunda yer alan *BARE1* retrotranspozonunun (Manninen ve Schulman, 1993) somatik dokularda transkripsiyonel olarak aktif olduğu gösterilmiştir (Jääskeläinen ve diğ., 1999; Suoniemi ve diğ., 1996b).



Şekil 2.8. *BARE1* retrotranspozonunun yapısı. LTR: Uzun uç tekrarları (“Long Terminal Repeats”), gri kutular; 5' UTL: 5' translasyonu yapılmayan bölge; GAG: kapsid proteini; AP: aspartik proteinaz; IN: integras; RT: ters transkriptaz; RH: RNaz H (her biri yeşil kutu ile belirtilmiştir); 3' UTL: 3' translasyonu yapılmayan bölge; kırmızı üçgenler: evrik tekrarlar; siyah oklar: konak tekrarları. 5' LTR bölgesinde TATA kutuları ve GAG bölgesinde başlangıç kodonu olan ATG dizisi görülmektedir.

2.4.1. BARE1 Yapısı

BARE1 LTR dizileri uzun, yaklaşık 1.8 kb büyüklüğünde, korunmuş dizilerdir (Suoniemi ve diğ., 1996a; Vicient ve diğ., 1999a). Dizi analizleri, *BARE1* LTR dizilerinin 2 ayrı TATA kutusu içerdiğini ortaya çıkarmıştır (Manninen ve Schulman, 1993). Her iki TATA kutusu da farklı koşullarda doğrudan RNA transkripsiyonunu gerçekleştirebilir (Suoniemi ve diğ., 1996b).

Hücrel RNA polimeraz II, *BARE1* transkripsiyonundan sorumludur. LTR dizileri, transkripsiyon için promotör ve RNA oluşum süreci için gerekli olan terminatör ile poliadenilasyon sinyallerini içerir (Suoniemi ve diğ., 1996b). LTR dizilerinin 3' bölgesinde 165 bp'lik bir bölge, tekrarlı kısa diziler içerir. Tekrarlı dizilerden oluşan bu bölgenin üst kısmında, 2 tane *BARE1* promotörü bulunur ve LTR dizilerindeki en değişken kısımdır. LTR dizileri incelendiğinde, dizi bakımından en fazla çeşitlilik ikinci TATA kutusunu çevreleyen bölgede bulunmuştur (Vicient ve diğ., 2005). *BARE1* LTR dizileri birçok retrovirüs ve retrotranspozonda bulunan 5' TG...CA 3' uç dizilerine sahiptir (Şekil 2.8) (Suoniemi ve diğ., 1997). *BARE1* retrotranspozonunda transkripsiyon başlangıç noktası ile translasyon başlangıç noktası arasında kalan translasyonu yapılmayan bölge (UTL) yaklaşık olarak 2 kb uzunluğundadır ve elementin çeşitli kopyalarında uzunluğu korunmuştur. *BARE1* UTL bölgesi, pikornavirüs gibi en az 51 ATG kodonu içerir (Jackson ve Kaminski, 1995). *BARE1* translasyon başlangıcı hakkında bir bilgi yoktur.

BARE1 iç domeninde yer alan dizilerin çeşitli işlevleri vardır. *Gag*, VLP ("Virus-Like Particle" - Virüs benzeri partikül) oluşumu için proteinleri kodlayarak retroelement mRNA'larının paketlenmesini sağlar. *BARE1 gag*, 843 nükleotit uzunluğundadır (Irwin ve Voytas, 2001). Aspartik proteinaz (*ap*), *pol* domeni tarafından kodlanır ve diğer enzimlerin oluşması için gereklidir (Gulnik ve diğ., 2000). *BARE1 integras* dizisi 1.215 nükleotit uzunluğundadır. *Rt-Rh* bölgesi hem polipürin hem de cDNA oluşumu için gereklidir. *BARE1-rt*, 603 nükleotit ve *rh* 784 nükleotit uzunluğundadır (Jääskeläinen ve diğ., 1999).

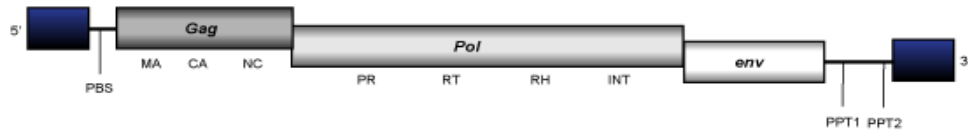
2.4.2. *Hordeum* Genom Evriminde *BARE1*'in Rolü

BARE1, arpa genomunda yaygın olarak bulunur (Suoniemi ve diğ., 1996a). *Hordeum* cinsindeki türler arasında, *BARE1*'in kopya sayısı ortalama 14.000 olmasına karşın bu sayı arpada 16.000'dir (Vicient ve diğ., 1999b). Kopya sayıları ve genom büyüklükleri düşünüldüğünde, tam uzunlukta *BARE1* elementi cins içinde, genomun %12.69'unu oluşturur (Wicker ve diğ., 2009). *BARE1* kopya sayısı ve genom büyüklüğünün olumlu yönde ilişkili olması *BARE1* elementinin, *Hordeum* cinsindeki türler arasındaki genom büyüklük farklılıklarında tek başına etkili olmamasına karşın önemli bir yeri olduğunu gösterir.

BARE1 retrotranspozonları, genomda genellikle birbirlerine yakın olacak şekilde kümelenmişlerdir (Suoniemi ve diğ., 1997). *Hordeum* genomları, fazla sayıda *BARE1* LTR dizileri içerir ve LTR dizilerinin, tek bir elementin LTR dizileri arasında homolog rekombinasyon sonucunda oluştuğu bilinmektedir. Homolog rekombinasyonda, integral bölgeler ortadan kalkar ve tek bir rekombinant LTR dizisi ortaya çıkar (Vicient ve diğ., 1999b; Kalendar ve diğ., 2000).

2.5. *BAGY2 (BARLEY GYPSY ELEMENT 2) TRANSPOZONU*

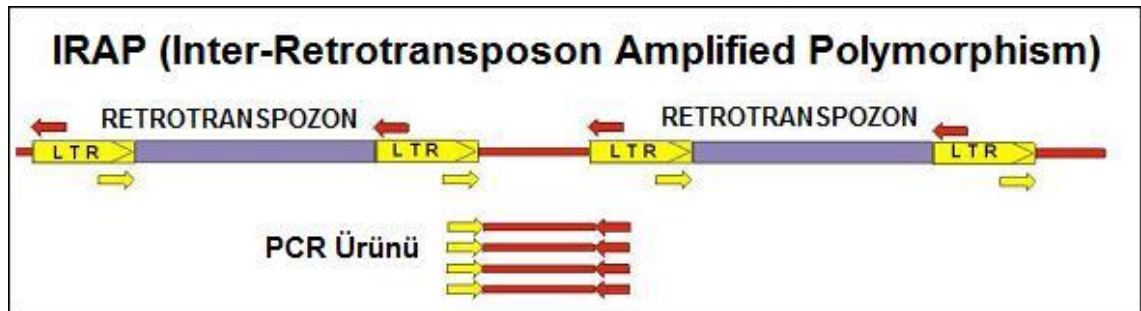
Shirasu ve diğ. (2000) tarafından arpada *BAGY2* adı verilen yeni bir retrotranspozon sınıfı tanımlanmıştır. İki *BAGY2* klonundan elde edilen diziler (AF254799 ve AJ279072) elementin yaklaşık olarak 10 kb'den oluştuğunu, 1520-1537 bp uzunluğunda LTR dizileri içerdiğini ve iç protein kodlama bölgesinin *gypsy* benzeri elementlere benzer şekilde organize olduğunu göstermektedir. *BAGY2* retrotranspozonu, *Hordeum vulgare* genomunda diğer transpozonlarla birlikte tanımlanan bir LTR'li retroelementtir. Otonom retroelementlerin *Gypsy* grubunun *Athila* ailesinde yer alan *BAGY2* retrotranspozonunun bitkilerde bulunan retrovirüslerin soyundan geldiği düşünülmektedir (Wright ve Voytas, 2002). Bitki retrotranspozonlarında LTR dizileri oldukça uzundur (Manninen ve Schulman, 1993; Suoniemi ve diğ., 1997). 5' LTR dizisinin iç kısmı primer bağlanma bölgesi ("Primer Binding Site" - PBS)'dir ve *Schizosaccharomyces pombe*'de Glu-tRNA'nın 3' ucundaki 18 nükleotidin 17'si ile benzerdir (Wong ve diğ., 1979). Bitki retrotranspozonları arasında tRNA-Glu kullanımı gözlenmeyen bir durumdur (Chavanne ve diğ., 1998). *Gag*, *pr*, *rt*, *rh* ve *int* domenlerini kapsayan *BAGY2* elementinin iç kısmı; *Athila* (*Arabidopsis thaliana*), *Cyclops-2* (bezelye) ve *gypsy* benzeri elementlerin birçoğunun domen sırasıyla benzerlik gösterir. Şekil 2.9'da, *BAGY-2* retroelementinin yapısında bulunan tRNA^{Asp} tamamlayan PBS, tek bir ORF (açık okuma çerçevesi - "Open Reading Frame"), *gag-pol*, iki polipürin sistemi olan PPT1 ile PPT2 (Shirasu ve diğ., 2000; Wright ve Voytas, 2002) ve alternatif kırılma ile ek bir *env* geni (Vicient ve diğ. 2001a) gösterilmektedir.



Şekil 2.9. BAGY2 retrotranspozonunun yapısı. PBS: primer bağlanma bölgesi; MA: matriks; CA: kapsid; NC: nükleokapsid; PR: proteaz; RT: ters transkriptaz; RH: RNaz H; INT: integraz; ENV: envelope; PPT: polipürin sistemi (<http://gydb.org/index.php/Ty3/Gypsy>).

2.6. IRAP ‘INTER-RETROTRANSPOSON AMPLIFIED POLYMORPHISM’

Retrotranspozonların integrasyonları genomik DNA ve korunmuş uçları arasında yeni ek yerleri oluşturduğundan, markır olarak kullanılabilir. Polimorfizmleri retrotranspozon insersiyonu ile belirlemekte kullanılan markır sistemleri; genelde bu uçlar arasındaki ve bitişik DNA bölgelerinin bazı bileşenlerinin polimeraz zincir reaksiyonu yoluyla çoğaltılmasına dayanır (Şekil 2.10). Ruslan Kalendar ve Alan H. Schulman (2006), bu amaca yönelik; REMAP ve IRAP olmak üzere iki yöntem geliştirmişlerdir.



Şekil 2.10. IRAP markır çalışma prensibi

IRAP (‘Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism’), retrotranspozonlar arasındaki polimorfik bölgelerin çoğaltılması temeline dayanır. Bu yöntem, markır bantları oluşturmak için restriksiyon enzim sindirimine veya ligasyona ihtiyaç duymamaktadır. IRAP markırları dışarı bakan primerler kullanılarak iki ardışık retrotranspozondan elde edilir.

PCR’da kullanılan primerler, retrotranspozonun LTR dizilerinin uç kısımlarına göre tasarlanır; ileri primerler retrotranspozonun 3’ LTR dizisine göre, geri primerler ise 5’ LTR dizisine göre dizayn edilir. Retrotranspozonların LTR dizileri çoğu zaman %90-95 oranında benzerlik gösterdikleri için PCR’da tek bir primer, hem ileri hem de geri olarak kullanılabilir.

2.7. KROMOZOM

Kromozom terimi; yunanca *chromo* (renk) ve *soma* (vücut) kelimelerinden türetilmiş ve ilk kez Waldeyer (1888) tarafından kullanılmıştır. Kromozomlar DNA’nın doğru bir şekilde replikasyonuna ve transkripsiyonuna izin verir; genetik mekanizmaların yapılarını sağlar. Kromozomların telomer, sentromer, kromatin paketlenmesi gibi yapısal özellikleri çok iyi korunmuştur. Mitozun metafaz aşamasında DNA; kısa, çubuk şeklindeki mitotik kromozomlar halinde sıkıştırılır, interfazda ise kromozomlar interfaz nükleusunda sıkılaşmamış halde yani kromatin iplikler şeklindedir (Heslop-Harrison ve Schwarzscher, 2011).

Nükleustaki kromozomlar sentromerlerinin bulunduğu yere göre asentrik (sentromersiz), metasentrik (sentromer orta noktada), akrosentrik (sentromer uca yakın), submetasentrik (sentromer kollardan birine yakın), telosentrik (sentromer uçlardan birine çok yakın), disentrik (iki sentromerli), polisentrik (ikiden fazla sentromerli), izosentrik (kromozomun iki kolu birbirinin aynısı) ve satellitli (uzun kol, kısa kol, ikincil yapı ve satellite sahip) kromozom olarak farklı şekillerde isimlendirilmektedir (Elçi, 1982).

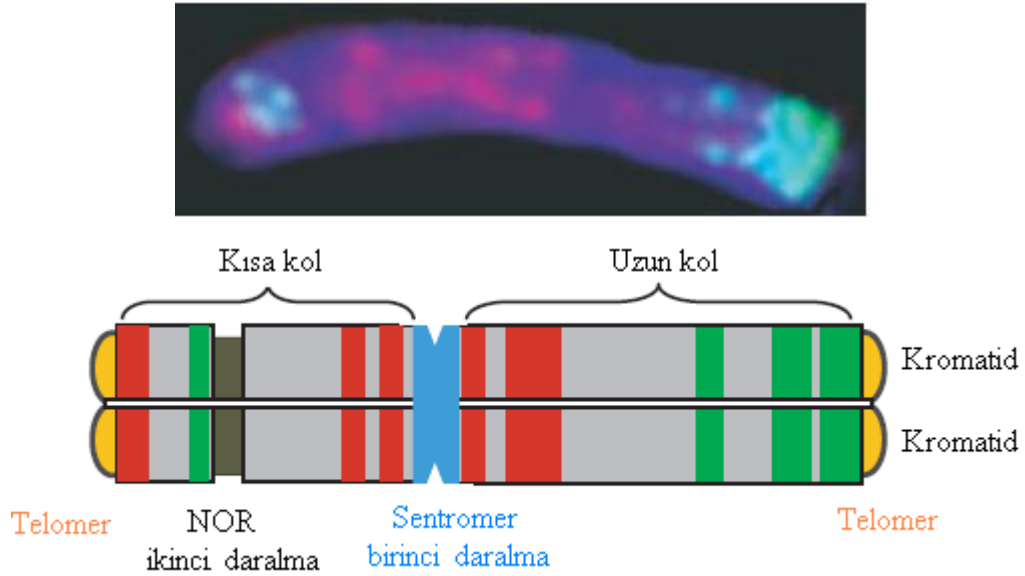
2.7.2. Kromozomların Özel Yapıları

Kromozomların mikroskopta incelenmesiyle kromozomlar üzerinde üç bölge tanımlanmıştır: telomerler, sentromer ve nükleolar organize edici bölgeler (Şekil 2.11).

2.7.2.1. Sentromer

Sentromer, ökaryotik kromozomlarda bulunan; nesilden nesile, hücreden hücreye genetik bilginin doğru şekilde iletilmesi için gerekli, özelleşmiş bir yapıdır. Nükleus bölünmesi ve birçok temel işlevde merkezi bir role sahiptir.

Sentromerler, anafaz boyunca kardeş kromatit birleşimi ile mitotik ve mayotik iğ iplikçiklerinin bağlanmasından sorumludur. Sentromerler, mitoz ve mayoz II’de kardeş kromatitlerin ayrılmasında, mayoz I’de homolog kromozomların ayrılmasında ve anafaz teşvik kompleksi (‘anaphase promoting complex’) aracılığı ile hücre döngüsünün kontrol noktasında rol alır (Choo, 1997; Maney ve diğ., 1999).



Şekil 2.11. Bir bitki kromozomunun organizasyonu ve özellikleri (Heslop-Harrison ve Schwarzscher, 2011).

2.7.2.2. Telomer

Telomerler, kromozomların uçlarında bulunan tekrarlı dizilerdir. R bantlama uygulamasında süre uzatıldığı zaman telomerik bölgelerin özgün olarak boyandığı ve T bantları olarak adlandırılan bantların oluştuğu gösterilmiştir (Babu ve Verma, 1987). Telomerler kromozomların ucu için koruyucu bir başlık oluşturmaktadır. Böylece disentrik kromozom oluşumu ve subtelomerik bölgelerdeki genetik bilgi kaybı önlenmektedir. Bitkilerde, telomerik dizi genellikle TTTAGGG’dir (Heslop-Harrison ve Schwarzscher, 2011).

2.7.2.3. NOR (“Nucleolus Organizing Region”) - Nükleolar Organize Edici Bölge

Metafaz plağında satellit içeren kromozomlar incelenirken, sentromerden sonra ikinci bir daralma bölgesi gözlenir. Bu bölge NOR olarak adlandırılır. İnterfazda nükleolus, nukleus içinde en göze çarpan yapıdır.

NOR, 18S-5.8S-26S rRNA genlerini, onların transkriptlerini ve transkripsiyonu olmayan bölgeleri içeren 45S rDNA bölgelerine karşılık gelir. NOR'lardaki rRNA genlerinin sayısı değişkenlik gösterir. Bu varyasyonlar Mendelyen tarzda kalıtılırlar. NOR'ların miktarı ve pozisyonu, türler arasında değişiklik gösterir (Babu ve Verma, 1987; Barch, 1991; Spinner ve diğ., 1989).

2.7.3. Kromozomların Elde Edilmesi

Kromozomlar, bölünme özelliği olan ve nükleus içeren hücrelerden elde edilebilir. Kromozomların en iyi incelenebildiği dönem geç profaz ve metafaz evreleridir. Hücre bölünmesini bu evrede durdurmak için mitotik iğ iplikçisi inhibitörü olarak kolşisin kullanılır. Kolşisin, mitotik iğ iplikçiklerini oluşturan mikrotübüllerin polimerizasyonunu inhibe ederek, mikrotübüllerin yapılaşmasını engeller. Böylece kromozomların kutuplara gitmesi önlenerek metafaz plağında kalması sağlanır. Bu aşamadan sonra hücreye hipotonik şok uygulanır. Hipotonik şok için kullanılan solüsyonun, sitoplazmadan daha düşük konsantrasyonda tuz içermesi gerekir. Bunun için en uygun solüsyon, 0.075 M KCl (potasyum klorür)'dür. Su, konsantrasyon gradiyenti nedeniyle hücre içine girer. Suyun sitoplazmik membrandan devamlı geçişinden dolayı hücre şişer ve içinde kromozomların süspanse olduğu, içi su dolu bir balona benzer hale gelir. Daha sonra hücrelerin sabit olarak tutulması, hücre fonksiyonlarının durması ve hücrelerin daha fazla şişmelerini önlemek amacıyla hücreler tespit edilir. Carnoy fiksatif (3:1 metanol:asetik asit) en yaygın olarak kullanılan fiksatifdir. Tespit işleminden sonra hücreler yayılıp boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenir (Babu ve Verma, 1987; Moorhead ve diğ., 1960; Lüleci ve diğ., 1990).

2.8. KLASİK BANTLAMA YÖNTEMLERİ

Bant, değişik yöntemler ile boyanabilen daha açık ya da daha koyu görünerek komşu segmentlerden ayırt edilebilen bir kromozom parçası olarak tanımlanır. Kromozomları daha iyi tanımlamak amacıyla geliştirilen bantlama yöntemleri sayesinde kromozomlarda insersiyon, translokasyon, transversiyon vb. gibi bozukluklar daha kolay tanımlanabilir olmuştur (Paris konferansı, 1971).

Metafaz evresinde bulunan kromozomların, özel boyalarla belirli bölgelerinin boyanması sonucu kromozom bantlama yöntemleri ortaya çıkmıştır. Günümüzde bu yöntemler hem insanlarda, hem de bitkilerde geliştirilmiş ve çeşitlenmiştir. Bu teknikler; G bantlama, Q bantlama, C bantlama, R bantlama ve DA/DAPI (“Distamycin A/4’-6’-diamidino-2-phenylindole”- Distamisin A/4’-6’-diamidin-2-fenilindol) boyama olarak sayılabilir. Bu yöntemler kromozomların tanınmasında, yapı ve evrimlerinin analizinde önemli bir yere sahiptir. Kromozom anomalileri, heteromorfizmleri ve genetik hastalıklar, bu yöntemler kullanılarak erkenden saptanabilmektedir (Liu ve diğ., 2004, Fragouli ve diğ., 2011).

Bazı boyaların DNA bazları ile kimyasal tepkimeye girmesi, bazılarının ise histonlar ile birleşmesi, kromozomlarda bant oluşumuna yol açar. Örneğin, negatif yüklü fosfat omurgasına bağlanan Giemsa ile boyamada; boyadan önce sıcak tampon çözelti ya da tripsin gibi proteolitik enzimler ile histonlarından arındırılan bölgelerin açık renk (ökromatin), diğerlerinin de koyu renk (heterokromatin) boyanması ile G bantları elde edilir. DNA'nın adenin ve timin bazlarından zengin heterokromatin bölgeleri koyu boyanırken; guanin ve sitozin bazlarından zengin ökromatin bölgeler açık boyanır (Demir, 2008). Quinacrine, AT baz çiftlerinin zengin olarak bulunduğu heterokromatin içeren bölgelere bağlanır. Bu nedenle bu bölgeler parlak olarak boyanır ve Q (+) bölgeler olarak gösterilirler. Q (+) bantları, G (+) bantlarına karşılık gelir (Barch, 1991). C bantlama belli kromozomal bölgelere özgüdür. İlk olarak Pardeu ve Gall (1970) *in situ* hibridizasyon ile değişik şekilde boyanan perisentrik bölgeler göstermişlerdir (Barch, 1991). Bu bulgulara dayanarak Hsu ve Arrighi (1971) özellikle perisentrik bölgeleri boyayan C bantlama yöntemini tanımlamışlardır. Aynı yıl Yunis ve arkadaşları da ayrı olarak C bantlama yöntemini geliştirmişlerdir (Yunis ve diğ., 1971). R bantlama ise G bantlamanın tam tersidir. Bu teknikte, Giemsa ile koyu boyanan kromozom bölgelerinin açık, açık boyanan kromozom bölgelerinin ise koyu boyanması sağlanır. Bu bantlamaya G bandın tersi anlamına gelen “reverse” (R) bant denilmiştir. Q ve G bant bölgeleri birbirine çok uyumlu iken, R ters bant kalıpları alır ve GC açısından zengin bölgeleri boyar (Babu ve Verma, 1987). Boyama için floresanlı bir boya olan akridin turuncusu veya Giemsa kullanılır. Distamisin A ve DAPI ise AT bölgelerine özgüdür. Bağlanma hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimle olmaktadır (Barch, 1991).

DAPI boyama ile floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemlerinin birleştirildiği teknik insanda (Schulten ve diğ., 2002), bitki türlerinden tütün (Moscone ve diğ., 1996) ve baklada (Fuchs ve diğ., 1994) gösterilmiştir.

2.9. DİZİ ANALİZİ

Biyoinformatik, 1970’li yıllarda DNA dizileme teknolojilerindeki gelişmelerden hemen sonra ortaya çıkan yeni ve önemli bir bilim dalıdır. Biyoinformatiğin amacı, biyolojik deneyler ve gözlemsel çalışmalardan elde edilen verilerin yönetimi, depolanması, analizi ve yorumlanmasına olanak sağlamaktır. Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi NCBI (National Center for Biotechnology Information) internet sayfasında biyoinformatik, biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojilerinin birleşiminden oluşan bir disiplin olarak tanımlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Biyoinformatik, bilgisayar bilimleri ve biyoistatistik ile biyoloji ve biyokimya, tıbbi biyoloji, genetik, fizyoloji gibi biyomedikal bilimlerin birleşiminden oluşan disiplinler arası bir alandır (Moore, 2007).

Dizileri belli oranın üzerinde benzerlik gösteren (homolog) genlerin dizi eşleme (“sequence alignment”) yöntemleriyle belirlenmesi biyoinformatikçiler tarafından sıklıkla çalışılan bir konudur. Dizi eşleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dizi tarama aracı 1990 yılında geliştirilmiştir. BLAST iki dizi arasında yerel (lokal) benzerliklerin bölgesini belirler. Program nükleotid ya da protein dizilerinin, dizi veri tabanları ile karşılaştırarak eşleşmelerin istatistiksel önemliliğini hesaplar (McGinnis ve Madden, 2004).

Bu tez çalışmasında da *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonlarının hareketleri IRAP yöntemi kullanarak arpa bitkisinin olgun embriyo, 10 günlük kök ve yaprak dokularında araştırıldı. *BARE1 gag*, *BAGY2 env* ve *rt* domenlerinin anlatım profilleri de arpa embriyo, kök ve yapraklarında incelendi. Elde edilen dizilerin doğruluğunun teyit edilmesi amacıyla *BARE1 gag*, *BAGY2 env* ve *rt* domenlerine ait saflaştırılan PCR ürünleri plazmide klonlanarak dizi analizine gönderildi. Çalışmanın ikinci kısmında; moleküler düzeyde farklılığa sebep olan retrotranspozonlar, arpa kromozomlarının DAPI ile boyanmasıyla kromozomal düzeyde incelendi.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında, arpa (*Hordeum vulgare* L. cv. Tokak) kök ve yaprak dokuları arasındaki *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozon hareketleri farklılığı, “Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism” (IRAP) markır tekniği kullanılarak araştırıldı. Tohumlar Altınova Tarım İşletmeleri Müdürlüğü’nden (Kadıhanı/KONYA) sağlandı. Çalışmada olgun arpa embriyoları kontrol materyali olarak kullanıldı. Bununla birlikte *BAGY2* ve *BARE1* retrotranspozonlarına ait bazı iç diziler, hem genomik DNA’dan hem de cDNA’dan PCR ile çoğaltıldı ve plazmite (pJET1.2/blunt) klonlandı. Plazmitler izole edildikten sonra *Bgl*II restriksiyon enzimi (FD0083, Fermentas) ile kesilerek elde edilen iç domen klonları (*gag*, *env* ve *rt*) dizi analizine gönderildi. Arpa kromozomları incelenerek retrotranspozonlar kromozomal düzeyde de analiz edildi.

3.1. BİTKİ MATERYALİNİN YETİŞTİRİLMESİ

Arpa tohumları yüzey sterilizasyonu için, %20’lik ticari çamaşır suyunda 15 dakika süre bekletilip, üç kere steril su ile yıkandı. Saf etanol içerisinde 30 saniye bekletilen arpa tohumları daha sonra steril distile suyla iyice durulandı. Steril kurutma kağıdının üzerinde kurutulan tohumlar, steril petri kabının içerisine yerleştirilip 5-6 ml distile su ile ıslatılan steril kurutma kağıtlarının üzerine 10-12 adet olacak şekilde yerleştirildi. Üzeri distile su ile ıslatılmış steril kurutma kağıdıyla kapatılıp 10 gün boyunca bitki büyütme kabininde (26°C, 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık, %50 nem) çimlenmeye bırakıldı. Süre bitiminde fidelerin kök ve yaprakları ayrı ayrı toplandı ve aynı tohumdan gelişen kök ve yapraklara aynı numara verildi. Analizler 5 örnek üzerinden yürütüldü. Kontrol amaçlı kullanılacak olan olgun embriyolar bir gece oda sıcaklığında distile suda bekletilen tohumlardan elde edildi.

Çalışmanın ikinci kısmında arpa kromozomları incelendi. Bu amaçla, Tokak varyetesi tohumları petri kabında 2 gün süre ile çimlendirildi. Çimlenen tohumlar, 18 saat hidroksiüre (1.25 mM) içinde bekletildi. Tohumlar, 5 saat distile suda yıkandı ve daha sonra aminopirofosfometil (4 μ M) ile 2 saat muamele edildi. Buzla dolu beher içerisine çimlenmiş tohumlar konularak 24 saat beklendi. Arpa kök uçları 1-2 cm olacak şekilde kesildi ve Carnoy fiksatif [1:3 (v/v) glasiyel asetik asit/saf etanol] içerisine konularak en az 18 saat olmak üzere +4°C’de bekletildi. Çalışma boyunca kök uçları Carnoy fiksatifinde +4°C’de saklandı.

3.2. GENOMİK DNA VE TOTAL RNA İZOLASYONU

Genomik DNA ve total RNA izolasyonu her bir örnekten (5 adet embriyo, 5 adet 10 günlük kök ve 5 adet 10 günlük yaprak) aynı anda gerçekleştirildi. İzolasyon sırasında nükleaz içermeyen (Nuclease-free) plastik malzemeler (mikrosantrifüj tüpleri ve pipet uçları) ile RNA yıkımına sebep olan RNaz enzimini uzaklaştıran %0.1’lik (v/v) DEPC (Dietilpirokarbonat) kullanıldı. Porselen havanlar, %0.1’lik (v/v) DEPC solüsyonu içinde 37°C’de bir gece bekletildikten sonra 121°C’de 20 dakika süre ile otoklavlandı ve 250°C’deki pastör fırınında 5 saat bekletildi. İzolasyon TRI Reagent® (Sigma, T9424) kullanılarak aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

1. Homojenizasyon Aşaması

- a) Bitki materyalleri (5 adet embriyo, 5 adet 10 günlük kök ve 5 adet 10 günlük yaprak, her biri 50 mg) steril porselen havan ve havaneli ile sıvı azot içerisinde parçalandı. Toz haline getirilen dokuların üzerine her bir örnek için TRI Reagent® (50 mg doku için 1000 μ l) eklendi. Havandaki örnekler tüpe alındı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- b) Örneklerin üzerine, kullanılan TRI Reagent® miktarıyla orantılı olarak 0.2 hacim kloroform eklendi ve örnekler karıştırılarak oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi.
- c) 12.000 x g’de 4°C’de 15 dakika süre ile santrifüjlenen (Allegra™ X-22R Centrifuge, Beckman Coulter) örnekler, tüpün içinde 3 ayrı faza ayrıldı. Üst faz total RNA, ortada kalan faz ise genomik DNA izolasyonu için kullanıldı. Bu tez çalışmasında, proteinler ile çalışılmadığı için proteinlerin bulunduğu alt faz kullanılmadı.

2. Total RNA izolasyonu

- Homojenizasyon aşamasının sonunda RNA içeren üst faz, steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve oda sıcaklığında 5-10 dakika bekletildi.
- Tüpler $12.000 \times g$ 'de 10 dakika 4°C 'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet 1 ml %75'lik etanolde yıkandı ve tüpler $7.500 \times g$ 'de 4°C 'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Alkol uzaklaştırıldı ve pellet oda sıcaklığında 10 dakika kurutuldu.
- Pellet, 50 μl nükleaz içermeyen suda çözündürüldü. İzole edilen RNA'ların kalitesi %1.2'lik formaldehit agaroz jelde (FA jel) kontrol edildi.
- RNA örneklerinin spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı ve konsantrasyon "RNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) = $[\text{OD (Optik yoğunluk)}]_{260} \times \text{sulandırım oranı} \times 40 (\mu\text{g/ml})$ " formülünden yararlanılarak hesaplandı.

3. Genomik DNA izolasyonu

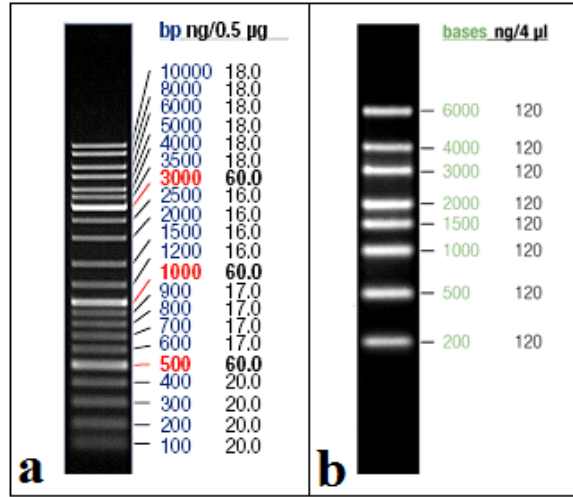
- Genomik DNA izolasyonu, RNA'yı içeren üst faz alındıktan sonra orta ve alt faz üzerinden gerçekleştirildi. Homojenizasyon aşamasından sonra tüpte oluşan üç fazın üst fazı RNA izolasyonu için kullanıldıktan sonra tüpte kalan iki faz üzerine 0.3 hacim %100 etil alkol eklenerek oda sıcaklığında 3 dakika bekletildi.
- Tüpler $2000 \times g$ 'de 4°C 'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet 0.1 M trisodyum sitrat içeren (pH 8.0) %10'luk (v/v) etil alkol ile iki defa yıkandı. Her yıkamada DNA pelleti en az 30 dakika solüsyon içinde bekletildi.
- Örnekler, yıkama sonrası $2000 \times g$ 'de 4°C 'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet %75 etil alkol ile 15 dakika yıkandı ve $2000 \times g$ 'de 4°C 'de 15 dakika tekrar santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı.
- Pellet oda sıcaklığında kurutuldu ve 100 μl nükleaz içermeyen suda çözündürüldü. İzole edilen DNA'ların kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

- h) DNA örneklerinin spektrofotometrede absorbans ölçümü yapıldı ve konsantrasyon “DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$)= [OD (Optik yoğunluk)₂₆₀ x sulandırım oranı x 50 ($\mu\text{g/ml}$)]” formülünden yararlanılarak hesaplandı.

3.3. DNA ve RNA JEL ELEKTROFOREZİ

İzole edilen DNA’ların kalitesi, %1’lik agaroz jelde; RNA’ların kalitesi ise %1.2’lik FA jel kontrol edildi. %1’lik (w/v) agaroz jel hazırlamak için, 10X TAE tamponunun (Tablo 3.1) sulandırılmasıyla hazırlanan 40 ml 1X TAE tamponuna, 0.4 gram agaroz (Biobasic Agarose A) eklenip mikrodalga fırında eritildi. Ilık hale gelen agaroz jele 4 μl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklendi ve yatay elektroforez kasetine dökülüp, uygun tarak yerleştirildikten sonra, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca katılaşmaya bırakıldı. Her DNA örneğinden 1 μl (400 ng/ μl) alınıp, 4 μl steril distile su ve 1 μl 6X yükleme tamponu (Tablo 3.1) ile karıştırıldı ve bu karışım agaroz jele yüklendi. Elektroforezde markır olarak GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311) kullanıldı (Şekil 3.1a). Jel 70 voltta (10 V/cm) 2 saat süre ile yürütüldü ve UV tablasında görüntülendi.

RNA jel elektroforezi hazırlanırken kullanılan bütün cam ve plastik malzemeler RNaz kontaminasyonunu önlemek için %0.1’lik DEPC’li distile su ile yıkandı. FA jel hazırlamak için, 10X FA jel tamponunun (Tablo 3.1) sulandırılmasıyla elde edilen 100 ml 1X FA jel tamponu içine, 1.2 g agaroz eklenip mikrodalga fırında eritildi. Ilık hale gelen agaroz jele 1.8 ml formaldehit (%37 w/v) ve 1 μl etidyum bromür solüsyonu (10 mg/ml) eklenip homojen hale getirildi. Yatay elektroforez kasetine dökülen jel, uygun tarak yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Katılaşan jel, içinde 1X FA jel tamponu bulunan elektroforez tankında 30 dakika bekletildikten sonra RNA örneklerinden 2 μl (400 ng/ μl) alınıp, 2 μl 2X yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi. Jelde markır olarak Riboruler™ High Range RNA Ladder (Fermentas, SM1821) kullanıldı (Şekil 3.1b). Jel 100 voltta (10 V/cm) 2 saat süre ile yürütüldü ve UV tablasında görüntülendi.



Şekil 3.1. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan markırlar a) DNA markırı, b) RNA markırı.

Tablo 3.1. Agaroz jel elektroforezinde ve FA (formaldehit agaroz) jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	400 mM Tris, %1.2 glasiyel asetik asit (v/v), 10 mM EDTA (pH 8.0)
1X TAE (Tris-Asetat EDTA) tamponu	100 ml 10X TAE, 900 ml dH ₂ O
6X yükleme tamponu	10 mM Tris-HCl (pH 7.6), %0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilen siyanol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA
10X FA jel tamponu	200 mM 3-[N-morpholin]propansülfonik asit (MOPS), 50 mM sodyum asetat, 10 mM EDTA (pH 7.0)
1X FA jel tamponu	100 ml 10X FA jel tamponu, 20 ml formaldehit (%37), 880 ml nükleaz içermeyen su
2X yükleme tamponu	%95 formamid, %0.025 SDS, %0.025 bromofenol mavisi, %0.025 ksilen siyanol, %0.025 etidyum bromür, 0.5 mM EDTA
Etidyum bromür solüsyonu	%1 (w/v)

3.4. DNaz I UYGULAMASI ve cDNA SENTEZİ

Arpa yaprak, kök ve embriyolarından izole edilen total RNA'lar cDNA sentezinde kullanılmadan önce genomik DNA kontaminasyonunu engellemek için tüm örnekler DNaz I (RNase-free, AM2224, Ambion) uygulaması yapıldı. Reaksiyon bileşenleri 0.5 µl'lik PCR tüplerinde, Tablo 3.2'de verilen oranlarda bir araya getirilip 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

Süre sonunda reaksiyonu sonlandırmak için tüplere 5.5 µl EDTA (50 mM) ilave edildi ve 75°C’de 5 dakika inkübe edilerek DNaz I enzimi inaktive edildi.

Tablo 3.2. DNaz I reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)
RNA örneği	43.9
10X reaksiyon tamponu	5
Dnaz I (2U)	1.1
Toplam	50

Reaksiyon sonrasında RNA’larda genomik DNA kontaminasyonu bulunup bulunmadığı, “Housekeeping gen” (bütün hücreler için gerekli işlevleri kodlayan, bu nedenle bütün hücrelerde anlatım yapan gen) olan aktin primerleriyle yapılan PCR ile kontrol edildi. Reaksiyonda Tablo 3.10’da verilen 7 ve 8 numaralı primerler kullanıldı. Reaksiyon bileşenleri Tablo 3.11’de verilen miktarlarda PCR tüpünde bir araya getirildi. Kalıp olarak DNaz I uygulanan RNA örnekleri kullanıldı. Reaksiyon Tablo 3.12’de verilen koşullarda gerçekleştirildi. Aktin primerlerinin bağlanma sıcaklığı 52°C olarak ayarlandı.

cDNA sentezi, “Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit” (05091284001, Roche) kullanılarak 200 µl’lik PCR tüplerinde gerçekleştirildi. Kit bileşenleri Tablo 3.3’te verilen miktarlarda PCR tüplerinde bir araya getirilerek 65°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre bitiminde örnekler buz üzerine alındı ve Tablo 3.4’te verilen bileşenler tüplere ilave edilerek 50°C’de 30 dakika inkübe edildi. Tüplerin 85°C’de 5 dakika bekletilmesi ile reaksiyon sonlandırıldı. Sentezlenen cDNA’lar, kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA sentezinin ilk aşamasında kullanılan bileşenler

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
RNA örneği	Değişken	20 ng/µl
Anchored-oligo(dT) ₁₈ Primer (50 pmol/µl)	1	2.5 µM
dH ₂ O	Değişken	
Toplam	11.4	

Tablo 3.4. cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan bileşenler

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (5X)	4	1X
“Protector RNase” Inhibitörü (40 U/µl)	0.5	1U/µl
Deoksinükleotit karışımı (10 mM)	2	1 mM
DTT	1	5 mM
“Transcriptor High Fidelity” Revers Transkriptaz	1.1	10 U/µl
İlk aşama ve ikinci aşama toplam	20	

3.5. IRAP- PCR

Çalışmada, *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozon hareketlerinin, arpa kök ve yaprak dokularında farklılık gösterip göstermediği IRAP markır tekniği ile belirlendi. Kontrol olarak çimlenmemiş olgun arpa embriyoları kullanıldı. Bireyler arasında retrotranspozon hareketliliği bakımından doğal bir polimorfizm olup olmadığının belirlenmesi amacı ile deneyler 5 farklı bitki üzerinden yürütüldü. Reaksiyon Long PCR Enzyme Mix (K0181, Fermentas) ile gerçekleştirildi. Tablo 3.5’te verilen bileşenler, 0.2 ml’lik PCR tüplerinde bir araya getirildi ve reaksiyon Tablo 3.6’da verilen koşullarda gerçekleştirildi. IRAP-PCR’da *BARE1* için Tablo 3.7’deki 1 ve 2 numaralı primerler, *BAGY2* için ise 3 ve 4 numaralı primerler kullanıldı. PCR ürünleri %6’lık poliakrilamit jelde (%30 T, %3.3 C_{bis}) ayrılarak değerlendirildi.

Tablo 3.5. IRAP-PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (10X)	2	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2	2.5 mM
2 mM dNTP	2.5	0.2 mM
Forward primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
Kalıp (25 ng/µl)	2	2 ng/µl
Enzim (5 U/µl)	0.25	0.05 U/µl
DH ₂ O (nükleaz içermeyen)	14.25	-
Toplam	25	

Tablo 3.6. IRAP-PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	
Bağlanma	*Değişken	30 sn.	30
Uzama	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

*Bağlanma Sıcaklığı, *BARE1* için 58°C ve *BAGY2* için 52°C olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3.7. IRAP-PCR’da kullanılan primer dizileri ve T_m sıcaklıkları (Leigh ve diğ., 2003; Zein ve diğ., 2010)

No	PrimerAdı	Dizisi (5’→3’)	T _m (°C)
1	<i>BARE-1/LTR6149-F</i>	CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	72
2	<i>BARE-1/5’LTR2-R</i>	ATCATTCCTCTAGGGCATAATTC	53.8
3	<i>BAGY-2/E0521-F</i>	TCGAAAGGTCTATGATTGATCCC	53.9
4	<i>BAGY-2/E0520-R</i>	CATGAAAGCATGATGCAAAATGG	56.9

3.6. POLİAKRİLAMİT JEL ELEKTROFOREZİ

PCR ürünlerinin görüntülenmesinde poliakrilamit jel elektroforezi (“Polyacrylamide Gel Electrophoresis” - PAGE) tekniği kullanıldı (Milan, 1959). Tablo 3.8’de verilen bileşenler karıştırıldı ve ultrasonikatörde 1 dakika bekletildi. Ardından 20x20 cm büyüklüğündeki cam kasete döküldü ve uygun tarak yerleştirilerek 30 dakika süre ile oda sıcaklığında polimerize olması beklendi. Süre sonunda tarak çıkarıldı ve kuyucuklar 5X TBE (Tablo 3.9) tamponunun sulandırılması ile elde edilen 1X TBE tamponu ile yıkandı. PAGE kaseti 1X TBE içeren yatay elektroforez tankına yerleştirildi ve PCR ürünleri 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jelde markır olarak “GeneRuler™ DNA Ladder Mix” (Şekil 3.1a) kullanıldı. Jel, 5 saat süre ile 150 voltta yürütüldükten sonra, 0.1 µg/ml etidyum bromür içeren 1X TBE tamponunda 15 dakika süre ile boyandı ve fotoğrafı çekildi.

Tablo 3.8. %6’lık PAGE bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı
Akrilamit:bisakrilamit 29:1 (%30)	10 ml
5X TBE	10 ml
Amonyum persülfat (%10)	1500 µl
TEMED	50 µl
dH ₂ O	28.45 ml
Toplam	50 ml

Tablo 3.9. 5X TBE tamponunun hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı
TRIS	54 g
Borik asit	27.5 g
0.5 M EDTA(pH 8.0)	20 ml

3.7. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

PAGE’de, embriyo ile 10 günlük kök ve yapraklardan elde edilen genomik DNA’lardan çoğaltılan PCR bantları sayıldı. Monomorfik ve polimorfik bantlar belirlendi. Elde edilen sonuçlar için [J (Jaccard Benzerlik Katsayısı) = $M_{AB}/M_B + M_A + M_{AB}$] formülü kullanılarak farklı örnekler arasındaki benzerlik oranları hesaplanmıştır (Jaccard, 1908).

$$J \text{ (Jaccard Benzerlik Katsayısı)} = M_{AB}/M_B + M_A + M_{AB}$$

M_B : A bireyinde (dokuda) olmayan, B bireyinde var olan bant sayısı

M_A : A bireyinde var olan, B bireyinde olmayan bant sayısı

M_{AB} : Hem A, hem de B bireyinde var olan bant sayısı

3.8. BAGY2 VE BARE1 RETROTRANSPOZONLARININ İÇ DOMENLERİNİN ÇOĞALTILMASI

Çalışmada, retrotranspozonların yaşam döngüsünde önemli rollere sahip olan genler çoğaltılarak polimorfizm ve anlatım profilleri incelendi. Genomik DNA’lar ve cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak *BAGY-2* retrotranspozonuna ait *envelope (env)* ve *reverse transcriptase (rt)* genleri, Tablo 3.10’da verilen 3-4 ve 5-6 nolu primer çiftleri kullanılarak çoğaltıldı. Bununla birlikte 1-2 nolu primer çiftleri kullanılarak *BARE1* retrotranspozonuna ait *gag* (ve *pol* bölgesinin bir kısmı) geni çoğaltıldı.

Tablo 3.10. İç domenlerin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri, bağlanma sıcaklıkları ve hedef büyüklükleri (Vicient ve diğ., 2001a; Vicient ve diğ., 2001b)

No	PrimerAdı	Dizisi (5'→3')	T _a (°C)	Hedef büyüklük (bp)
1	<i>BARE1/gag-F</i>	GTTGTAGACATATGGCTCGCGGAGTAGC	52	850
2	<i>BARE1/gag-R</i>	GACATGTGGATCCAATATACCTCATTTTTC		
3	<i>BAGY2/env-F</i>	CCAAGGTCTATGGGACTTGAACCC	55	385
4	<i>BAGY2/env-R</i>	CAAGGGGATTGCCCATACCAATGC		
5	<i>BAGY2/rt-F</i>	AARGAYCAYTWYCCYTTCCITT	47	390
6	<i>BAGY2/rt-R</i>	ACCATRAARTGRCAYYTTCCTT		
7	<i>HV/actin-F</i>	GCCGTGCTTTCCCTCTATG	52	235
8	<i>HV/actin-R</i>	GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA		

Reaksiyonlar hata okuma aktivitesi olan High Fidelity PCR Enzyme Mix (K0191, Fermentas) ile gerçekleştirildi. Kalıp olarak arpa embriyo, kök ve yapraklarından izole edilen genomik DNA'lar ve total RNA'lardan sentezlenen cDNA'lar kullanıldı. Her üç domen için de Tablo 3.11'de verilen bileşenler PCR tüpünde bir araya getirildi. Ardından reaksiyonlar *BARE1/gag* ve *BAGY2/env* için Tablo 3.12'de, *BAGY2/rt* için ise Tablo 3.13'te verilen koşullarda gerçekleştirildi. PCR bitiminde ürünler %1'lik agaroz jelde kontrol edildi ve ilgili bantlar jelden geri kazanıldı.

Tablo 3.11. İç domenlerin çoğaltılmasında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (10X)	2.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2.5	2.5 mM
2 mM dNTP	2.5	0.2 mM
Forward primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	1	0.4 pmol/µl
*Kalıp (ng/µl)	2	**ng/µl
Enzim (5 U/µl)	0.25	0.05 U/µl
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	13.25	
Toplam	25	

* Kalıpların stok konsantrasyonu genomik DNA için 30 ng/µl, cDNA için 20 ng/µl'dir.

**Kalıpların son konsantrasyonu genomik DNA için 2.4 ng/µl, cDNA için 1.6 ng/µl'dir.

Tablo 3.12. *BARE1/gag* ve *BAGY2/env* iç domenlerinin çoğaltılmasında kullanılan PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	
Bağlanma	*Değişken	30 sn.	30
Uzama	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

*Primer bağlanma sıcaklığı *BARE1/gag* için 52°C, *BAGY2/env* için 55 °C olarak kullanıldı.

Tablo 3.13. *BAGY2/rt* iç domeninin çoğaltılmasında kullanılan PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	7
Bağlanma	*47-41	30 sn.	
Uzama	72	3 dk.	
Denatürasyon	94	30 sn.	30
Bağlanma	**56	30 sn.	
Uzama	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

*Her döngüde bağlanma sıcaklığı 1°C düşürüldü.

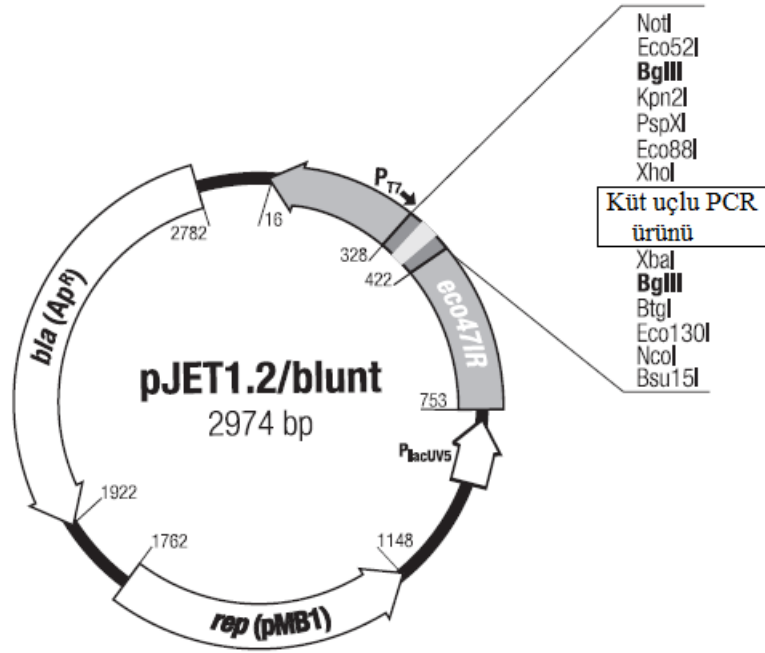
**Bağlanma sıcaklığından (56°C) uzama sıcaklığına (72°C) 75 sn'de çıkacak şekilde bir sıcaklık eğrisi ayarlandı.

3.9. PCR ÜRÜNLERİNİN JELDEN GERİ KAZANILMASI

BAGY2 ve *BARE1* retrotranspozonlarına ait iç domenler (*env*, *rt*, *gag*) hem genomik DNA'dan hem de cDNA'dan PCR ile çoğaltıldıktan sonra, ürünler agaroz jelde kontrol edildi. Beklenen büyüklüklerdeki ilgili bantlar jelden geri kazanıldı. Jelden saflaştırmada Zymogen kit (Zymo Research, D4001) kullanıldı. Saflaştırma, firmanın önerdiği prosedür takip edilerek yapıldı. Jelden geri kazanılan PCR ürünlerinin miktarı spektrofotometrede ölçüldü ve kalitesi %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Ardından ürünler klonlama işlemine kadar -20°C'de saklandı.

3.10. KLONLAMA ÇALIŞMALARI

Env, *rt* ve *gag* domenlerine ait olan PCR ürünleri jelden geri kazanıldıktan sonra plazmit vektöre (pJET1.2/blunt) aktarıldı. Ardından plazmitin *Escherichia coli* (*E. coli*) JM107 hücre hattına transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon, "CloneJET™ PCR Cloning Kit (K1231, Fermentas)" kullanılarak yapıldı.



Şekil 3.2. Klonlamada kullanılan vektör haritası

3.10.1. Ligasyon

Env, *rt* ve *gag* domenlerinin ligasyonu yapılırken transformasyonun kalitesini test etmek amacıyla, klonlama kiti içinde bulunan 976 bp büyüklüğündeki kontrol DNA parçası ile ligasyon yapıldı. Bununla birlikte, kontaminasyon olup olmadığını test etmek için herhangi bir insert içermeyen plazmit ile bir negatif kontrol deneyi gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan pJET1.2/blunt vektörünün haritası Şekil 3.2’de verilmiştir.

Vektör, küt uçlu DNA parçalarının ligasyonuna uygun olduğundan dolayı, reaksiyon öncesinde PCR ürünlerine “blunting reaksiyonu” (küt uç oluşturma) uygulanarak ürünlerin küt uçlu hale getirilmesi sağlandı. Tablo 3.14’te verilen bileşenler 200 µl’lik PCR tüplerinde bir araya getirildi ve reaksiyon 70°C’de 5 dakikada gerçekleştirildi. Ardından tüpler buz üzerinde 2 dakika soğutularak reaksiyon durduruldu.

Tablo 3.14. “Blunting reaksiyon” bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı
2X Reaksiyon Tamponu	10 µl
PCR ürünü	2 µl
dH ₂ O	5 µl
DNA Blunting Enzyme	1 µl
Toplam	18 µl

“Blunting” reaksiyonunun ardından tüplere 1 µl PJET1.2/blunt Cloning Vector (50 ng/µl) ve 1 µl T4 DNA ligaz (5 U/µl) eklendi ve 22°C sıcaklıkta 30 dakika süre ile ligasyon gerçekleştirildi. Ligasyonun ardından ürünler transformasyon için kullanıldı.

3.10.2. Kompetent *E. coli* Hücrelerin Hazırlanması

Çalışmada transformasyon için *E. coli* JM107 bakteri ırkı kullanıldı. Bakteri ırkı İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kültür Koleksiyonu’ndan temin edildi. Transformasyon öncesinde bakteriler kompetent (yeterli) hale getirildi. Kompetent hücrelerin hazırlanması ile transformasyon sırasında kullanılan tüm besi ortamı ve tamponların içerikleri Tablo 3.15’te verilmiştir. -80°C’de saklanan bakteri ırkı tek koloni elde etmek için SOB (“Super Optimal Broth”) agar besi ortamına ekilerek 16 saat 37°C’de inkübe edildi. İnkübasyon aşamasından sonra tek bir koloni steril bir öze yardımı ile alındı ve 100 ml SOB besi ortamına ekildi. Bakteriler çalkalamalı etüvde 37°C sıcaklıkta 150 devir/dakika hızda inkübe edildi. Kültürdeki hücre yoğunluğu her saat başı 550 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçüldü. Hücre yoğunluğu 0.5 optik dansiteye (OD) ulaşınca, aşağıdaki işlemler uygulanarak hücreler transformasyon için kompetent hale getirildi.

- Kültürden 1.5 ml alınarak steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve hücreler 10.000 devir/dakika hızda (2.300 x g) 4°C’de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve tüpler steril kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek 1 dakika kurutuldu.
- Bakteri pelleti üzerine 500 µl 100 mM soğuk steril MgCl₂ eklenerek karıştırıldı ve buzda 10 dakika bekletildi.
- Tüpler, 10.000 devir/dakika hızda (2.300 x g) 4°C’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

- e) Pellet üzerine 500 µl 100 mM soğuk steril CaCl_2 eklenerek karıştırıldı ve tüpler buzda 30 dakika inkübe edildi.
- f) Süre sonunda tüpler 10.000 devir/dakika hızda ($2.300 \times g$) 4°C 'de 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- g) Hücre pelleti üzerine 50 µl 100 mM soğuk steril CaCl_2 ve elde edilen kompetent hücreler transformasyon için hemen kullanıldı.

3.10.3. Transformasyon

Yeterli hale getirilen “kompetent” *E. coli* JM107 ırkı *env*, *rt* ve *gag* domenlerinin transformasyonu için kullanıldı. Transformasyonun kalitesini test etmek için “CloneJET™ PCR Cloning Kit” içinde bulunan 976 bp büyüklüğündeki kontrol DNA parçasını içeren plazmit kullanılarak bir transformasyon daha gerçekleştirildi. Bununla birlikte, kontaminasyon olup olmadığını test etmek için herhangi bir insert içermeyen plazmit ile bir negatif kontrol deneyi de yapıldı. Transformasyon aşağıdaki işlemler takip edilerek gerçekleştirildi.

- a) 50 µl kompetent *E.coli* hücreleri üzerine 5 µl soğuk ligasyon ürünü eklendi ve tüpler hafifçe karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 30 dakika süre ile inkübe edildi.
- b) Süre sonunda tüpler 42°C 'deki su banyosunda 90 saniye bekletildi.
- c) Daha sonra tüpler hemen buz üzerine alındı ve 2 dakika bekletildi.
- d) Tüplere antibiyotik içermeyen SOC (“Super Optimal Broth with Catabolite Repression”) eklendi ve tüpler yatık şekilde 37°C 'de 150 devir/dakika hızda 45 dakika boyunca inkübe edildi.
- e) İnkübasyonun ardından tüpler 5 dakika 12.000 devir/dakika hızda ($2.400 \times g$) santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı ve bakteri pelleti 200 µl SOC broth içinde süspanse edildi.
- f) Hücre süspanسیونunun tamamı, seçici antibiyotik olarak 100 µg/ml miktarında ampisilin içeren SOB agar besi ortamına L baget ile yayıldı.
- g) Petriler oda sıcaklığında 20 dakika düz olarak bekletildi ve daha sonra ters çevrilerek 37°C sıcaklıkta 16 saat boyunca inkübe edildi.
- h) Süre bitiminde kolonilerin rekombinant olup olmadıkları koloni PCR ile belirlendi.

Tablo 3.15. Klonlamada kullanılan besi ortamları ve çözeltilerin içerikleri

Adı	İçeriği
SOB (Super Optimal Broth) besi ortamı	20 g tripton, 5 g maya özütü ve 0.5 g NaCl 950 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü. 10 ml 250 mM KCl eklendi ve pH 7.0'ye ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilen çözeltiliye 5 ml steril 2 M MgCl ₂ çözeltisi eklendi.
SOB agar	20 g tripton, 5 g maya özütü ve 0.5 g NaCl 950 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü. 10 ml 250 mM KCl eklendi ve pH 7.0'ye ayarlandı. 15 g agar eklenip son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavda steril edilen çözeltiliye 5 ml steril 2 M MgCl ₂ çözeltisi eklendi ve petrilere döküldü.
Antibiyotikli SOB agar	SOB agar 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavda steril edildikten sonra soğutuldu ve katılaşmadan önce içine 1 ml steril ampisilin stok solüsyonu (100 mg/ml) eklenerek petrilere döküldü.
SOC (Super Optimal Broth with Catabolite Repression) broth	20 g tripton, 5 g maya özütü ve 0.5 g NaCl 950 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü. 10 ml 250 mM KCl eklendi ve pH 7.0'ye ayarlandı. Son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra 121°C'de 20 dakika süre ile otoklavda steril edildi. Oda sıcaklığına soğutulan besi ortamına 5 ml steril 2 M MgCl ₂ ve 20 ml 1 M glukoz eklendi.
Ampisilin stok solüsyonu (100 mg/ml)	1 g ampisilin 10 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü ve 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılana kadar -20°C'de saklandı.
250 mM KCl	1.86 g KCl 100 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü ve kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı.
2 M MgCl ₂	19 g MgCl ₂ 90 ml dH ₂ O içinde çözündürüldü ve son hacim dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.22 µm por çaplı filtreden geçirilerek steril edildi. Kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı.
1 M glukoz solüsyonu	18 g glukoz 90 ml dH ₂ O çözündürüldü ve son hacim dH ₂ O ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.22 µm olan milipor filtreden süzülerek steril edildi ve 4°C'de saklandı.

3.10.4. Koloni PCR

Transformasyonun ardından üreyen kolonilerin rekombinant olup olmadıkları koloni PCR uygulanarak belirlendi. Her bir farklı insert ile yapılan transformasyon için (*env*, *rt*, *gag* ve kontrol) rastgele 5'er tane koloni seçilerek numaralandırıldı ve PCR için kalıp olarak kullanıldı. PCR, "High Fidelity PCR" enzim karışımı ile gerçekleştirildi ve klonlama kiti ile birlikte sağlanan primerler kullanıldı. Tablo 3.16'da verilen bileşenler 0.2 ml'lik PCR tüplerinde bir araya getirildi. Seçilen koloniler steril bir kürdan yardımı ile alınarak tüplerde süspanse edildi. Tablo 3.17'de verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

Tablo 3.16. Koloni PCR bileşenleri ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)	Son konsantrasyonu
Reaksiyon Tamponu (10X)	2	1X
MgCl ₂ (25mM)	1.2	1.5 mM
2mM dNTP	2	0.2 mM
PJET1.2 Forward Sequencing primer (10 µM)	0.4	0.2 µM
PJET1.2 Reverse Sequencing primer (10 µM)	0.4	0.2 µM
Enzim (5u/µl)	0.1	0.025 u/µl
dH ₂ O (nükleaz içermeyen)	13.9	
Toplam	20	

Tablo 3.17. Koloni PCR döngüleri

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dk.	1
Denatürasyon	94	30 sn.	
Bağlanma	60	30 sn.	25
Uzama	72	1 dk.	
Son uzama	72	10 dk.	1

Koloni PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. İstenilen büyüklükte bant veren koloniler (*gag*, 850 bp; *env*, 385 bp ve *rt* 390 bp) 100 µg/ml ampisilin içeren 100 ml SOB besi ortamına ekildi ve kültür 37°C'de 150 devir/dakika hızda 16 saat inkübe edilerek üretildi. Süre sonunda kültür çöktürülerek plazmit izolasyonu yapıldı ve izole edilen plazmitler restriksiyon enzimi ile kesildi.

3.10.5. Plazmit İzolasyonu ve Restriksiyon Kesimi

Antibiyotik içeren SOB besin ortamında bir gece üretilen bakteri kültürlerinden plazmit izolasyonu yapıldı. İzolasyon “QIAprep Spin Miniprep Kit (27104, Qiagen)” kullanılarak firmanın önerdiği prosedüre göre yapıldı. İzolasyon sonrasında plazmitlerin miktarları spektrofotometrede (Nanodrop2000) belirlendi ve restriksiyon enzimi ile kesimi yapıldı. Kesim için plazmitin çoklu klonlama bölgesini iki noktadan kesen FastDigest *Bgl*II (FD0083, Fermentas) enzimi kullanıldı. Tablo 3.18'de verilen reaksiyon bileşenleri 0.2 ml'lik PCR tüplerinde bir araya getirildi ve 37°C'de 20 dakika boyunca reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyonun ardından restriksiyon kesimi ürünleri, %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Restriksiyon kesimi sonrasında, ilgili DNA parçalarını (*env*, *rt* ve *gag*) taşıdığı belirlenen plazmitlerin dizi analizi gerçekleştirildi.

Tablo 3.18. Restriksiyon kesimi için kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenin adı	Miktarı (µl)
10X reaksiyon tamponu	2
Plazmit	2
<i>Bgl</i> II restriksiyon enzimi	1
dH ₂ O	15
Toplam	20

3.10.6. Dizi Analizi

Dizi analizi için Iontek firmasından hizmet alımı yapıldı. Dizi analizi için firmanın önerdiği koşullarda, plazmit örnekleri 100 ng/µl konsantrasyonda (50 µl) ve primerler (*env*-F ile *env*-R, *rt*-F ile *rt*-R ve *gag*-F ile *gag*-R) 5 µM konsantrasyonda (50 µl) olacak şekilde hazırlandı. Primer ve örneklerin yanı sıra plazmitlerin agaroz jel elektroforezinde markır eşliğinde görüntüleri firmaya gönderildi. Alınan sonuçların “The National Center for Biotechnology Information” - NCBI’da “Basic Local Alignment Search Tool” - BLAST analizi yapıldı. Analiz sonuçları incelenirken çalışma sonucu elde edilen dizi ile veri tabanındaki dizi arasındaki eşleşme değeri olan “expect value”- beklenen değere (E value) dikkat edildi. Düşük değer, diziler arasındaki benzerliği gösterdiği için E değeri sıfıra yakın sonuçlar incelendi (McGinnis ve Madden, 2004).

3.11. KROMOZOM ANALİZLERİ

Çalışmanın ikinci kısmında arpa kromozomları incelendi. Daha önce elde edilen ve fiksatif içinde bekletilen kök uçları, distile suda birkaç dakika yıkandı. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra kök uçlarına sitrat (0.1 M sitrik asit ve 0.1 M sodyum sitrat) tamponu konularak 10 dakika bekletildi. Daha sonra, kök uçlarına, %2 hemiselülaz (w/v), %2 (w/v) selülaz ve %4 (w/v) pektinaz enzim karışımı konularak 37°C’de 45-90 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler, sitrat tamponunda 10 dakika bekletildikten sonra örneklerin üzerine etanol eklendi ve 10 dakika bekletildi. Etanol uzaklaştırıldı ve kök uçlarına 1:3 (v/v) etanol/asetik asit fiksatif konuldu. Parçalayıcı ile fiksatif içerisindeki kök uçları hiçbir kalıntı kalmayacak şekilde parçalandı ve iyice karışması için arada spin yapıldı.

%96'lık etanolde yıkanan lamalar silindikten sonra üzerine iyice parçalanmış kök ucu örneklerinden 10-12 µl damlatılarak 30-45 dakika kurumaya bırakıldı. Kuruyan lamaların üzerine DAPI (2 ng/µl) eklenerek floresan mikroskopta (LEICA DM4000 B) incelendi ve görüntüldü. Hazırlanan preparatlar incelenirken mitoz bölünmedeki hücreler sayıldı ve mitotik indeks, mitozdaki hücre sayısının toplam hücre sayısına bölünmesiyle hesaplandı.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında *Hordeum vulgare* L. cv. Tokak varyetesinin kök ve yaprak dokuları arasındaki *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonlarına bağlı olarak meydana gelen polimorfizm, IRAP markır yöntemi kullanılarak araştırıldı. Çalışmada arpa olgun embriyoları kontrol materyali olarak kullanıldı. Ayrıca *BARE1*'e ait *gag* ile *BAGY2*'ye ait *env* ve *rt* domenleri, hem genomik DNA'dan hem de cDNA'dan çoğaltılarak klonlandı. Restriksiyon kesimi sonrasında, ilgili DNA parçalarını (*gag*, *env*, *rt*) taşıdığı belirlenen plazmitlerin dizi analizi gerçekleştirildi. Dizi analizi sonucunda, BLAST programı kullanılarak çoğaltılan bölgelerin *env*, *rt* ve *gag* bölgeleri olup olmadığı teyit edildi. Retrotranspozonların kromozomal düzeyde herhangi bir değişikliğe sebep olup olmadıklarını analiz etmek amacı ile arpa kromozomları da incelendi.

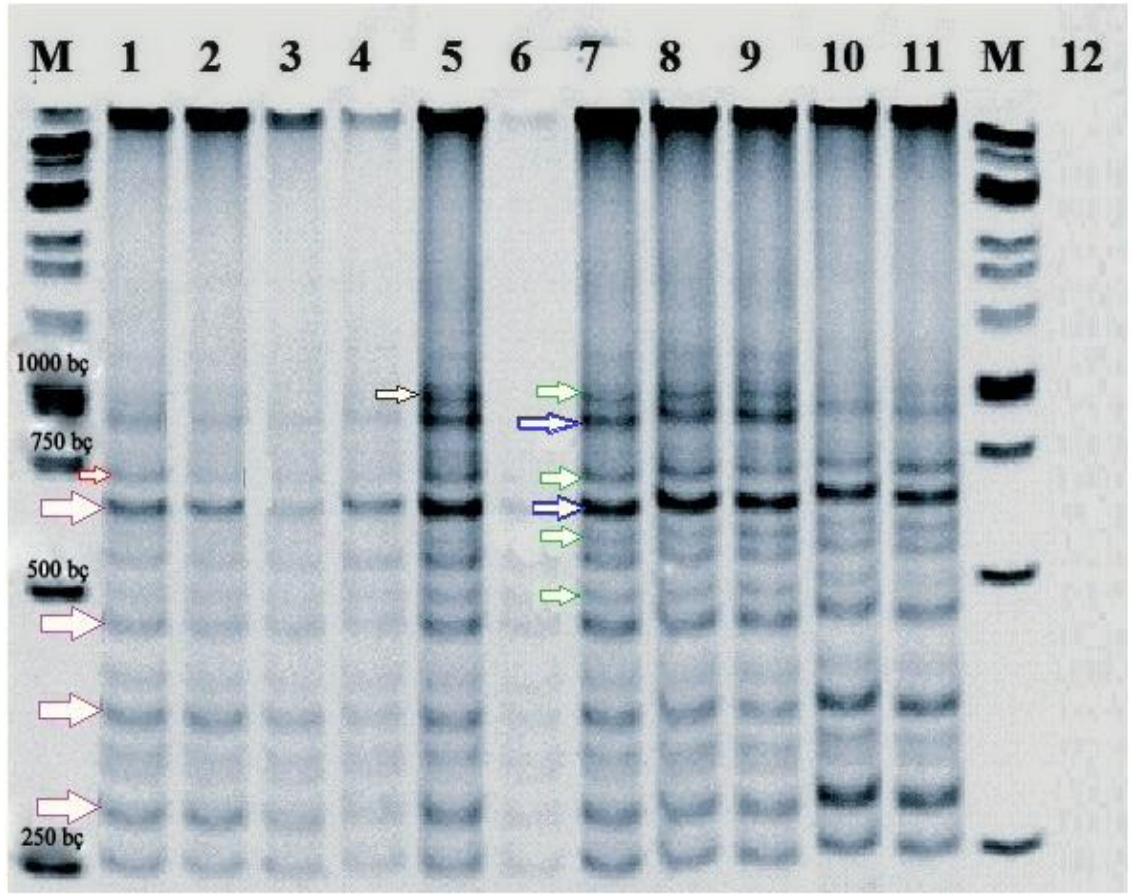
4.1. GENOMİK DNA VE RNA İZOLASYONLARI

Nemli kurutma kağıtları arasında çimlendirilen arpa tohumlarından gelişen fideler ekimden 10 gün sonra toplandı. Her bir fidenin yaprak ve köklerinden ayrı ayrı genomik DNA ve total RNA izolasyonu yapıldı. Tek bir bitkiden gelişen kök ve yapraklara aynı numara verilecek şekilde her bir örnek numaralandırıldı. Yaprak ve kök dokuları arasında meydana gelebilecek olan polimorfizmlerin çimlenmeden sonra mı yoksa embriyo gelişimi sırasında mı meydana geldiğini belirlemek amacıyla olgun embriyolar bir gece oda sıcaklığında distile suda bekletilen tohumlardan elde edildi ve kontrol olarak kullanıldı. Bununla birlikte, bireyler arasında doğal olarak meydana gelen bir polimorfizm olup olmadığını belirlemek için deneyler 5 bitki üzerinden yürütüldü. İzole edilen genomik DNA'ların spektrofotometrik miktar tayinleri ve agaroz jel analizleri sonucunda, DNA'ların PCR işlemlerinde kullanılabilecek saflıkta ve kalitede olduğu görüldü. Genomik DNA örnekleri, konsantrasyonları 30 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı.

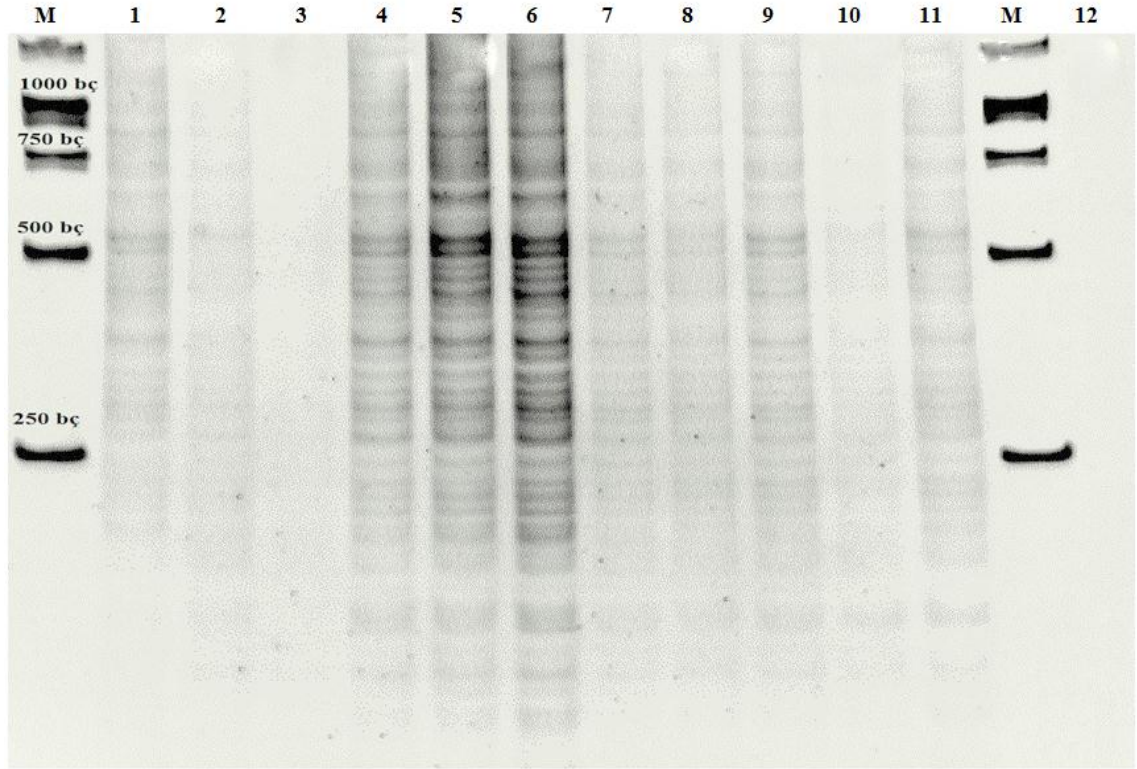
Total RNA'ların kalitesi FA (formaldehit agaroz) jelde belirlendi. Jel sonuçlarına göre örneklerden izole edilen RNA'ların kırık olmadıkları, cDNA sentezi için kullanılabilecek kalitede ve konsantrasyonda (400 ng/μl) olduğu belirlendi. Total RNA ve genomik DNA izolasyonu, örneklerden aynı anda tek bir aşamada gerçekleştirildiği için RNA'larda olabilecek DNA kontaminasyonunun önlenmesi için örnekler DNaz I uygulaması yapıldı. Uygulama sonrasında RNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve aktin primerleri ile PCR yapıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek analiz edildi. Jelde aktin primerlerinin vermesi gereken 235 bp'lik bir bant tespit edilemedi. Elde edilen bu sonuç, RNA örneklerinde DNA kontaminasyonu bulunmadığını gösterdi. DNaz I uygulanan her bir RNA örneğinden konsantrasyonu 20 ng/μl olacak şekilde 20 μl'lik cDNA sentez edildi. cDNA'ların kalitesi aktin primerleriyle kurulan PCR ile belirlendi. PCR ürünlerinin %1 agaroz jelde görüntülenmesi sonucunda tüm cDNA'ların istenilen büyüklükte (235 bp) bant içerdikleri gözlemlendi. Bununla birlikte, ürünlerde spesifik olmayan herhangi bir bant gözlenmediği için cDNA'ların RT-PCR analizleri için uygun olduğu belirlendi.

4.2. IRAP-PCR SONUÇLARI

Bir gece (16 saat) boyunca distile suda bekletilmiş tohumlardan disekte edilen embriyolar ve 10 gün süre ile çimlendirilen tohumlardan gelişen kök ve yaprak dokularından izole edilen genomik DNA'larla *BARE-1* (Şekil 4.1) ve *BAGY2* (Şekil 4.2) için IRAP-PCR yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri %6'lık PAGE ile ayrıldı. Hem *BARE1* hem de *BAGY2* retrotranspozonlarının IRAP resimlerinde, embriyolar ile yapılan çalışmalarda kullanılan 5 embriyo da benzer şekilde bantlar verdiği için polimorfizm karşılaştırılmasında tek bir embriyo ile kök ve yaprak örnekleri karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.1. *BARE1* IRAP PCR sonuçları. 1-embriyo, 2-6 kök, 7-11 yaprak, 12-negatif kontrol, M: Markır. Embriyo ile kök arasında; embriyoya özgü 1 polimorfik bant (kırmızı ok), köke özgü 1 polimorfik bant (siyah ok) ve embriyo ile kök arasında 4 homomorfik bant (mor ok) gösterilmiştir. Embriyo ile yaprak arasında; yaprağa özgü 3 polimorfik bant (yeşil ok) ve 4 monomorfik bant (mor ok) ile gösterildi (embriyoya özgü polimorfik bant saptanmadı). Kök ile yaprak arasında; yaprağa özgü 4 polimorfik bant (yeşil ok) ve 2 monomorfik bant gözlendi (mavi ok) (köke özgü polimorfik bant saptanmadı).



Şekil 4.2. *BAGY2* IRAP PCR sonuçları. 1-embriyo, 2-6 kök, 7-11 yaprak, 12-negatif kontrol, M: Markır.

BARE1 retrotranspozon hareketliliği hem dokular arasında (embriyo, kök ve yaprak) hem de aynı doku içindeki farklı bireyler arasında gözlemlendi. *BAGY2* retrotranspozonunda ise herhangi bir hareket belirlenmedi. Benzerlik en fazla embriyo ile kök arasında gözlenirken (%66), en az benzerlik kök ile yaprak arasında (%33) saptandı (Tablo 4.1). Analizler sonunda gelişim sürecinde *BARE1* retrotranspozon hareketinin değiştiği sonucuna varıldı. Çalışılan örneklerde *BAGY2* retrotranspozon hareketi gözlenmedi.

Tablo 4.1. Embriyo, kök ve yapraklar arasındaki Jaccard benzerlik indeksi (%)

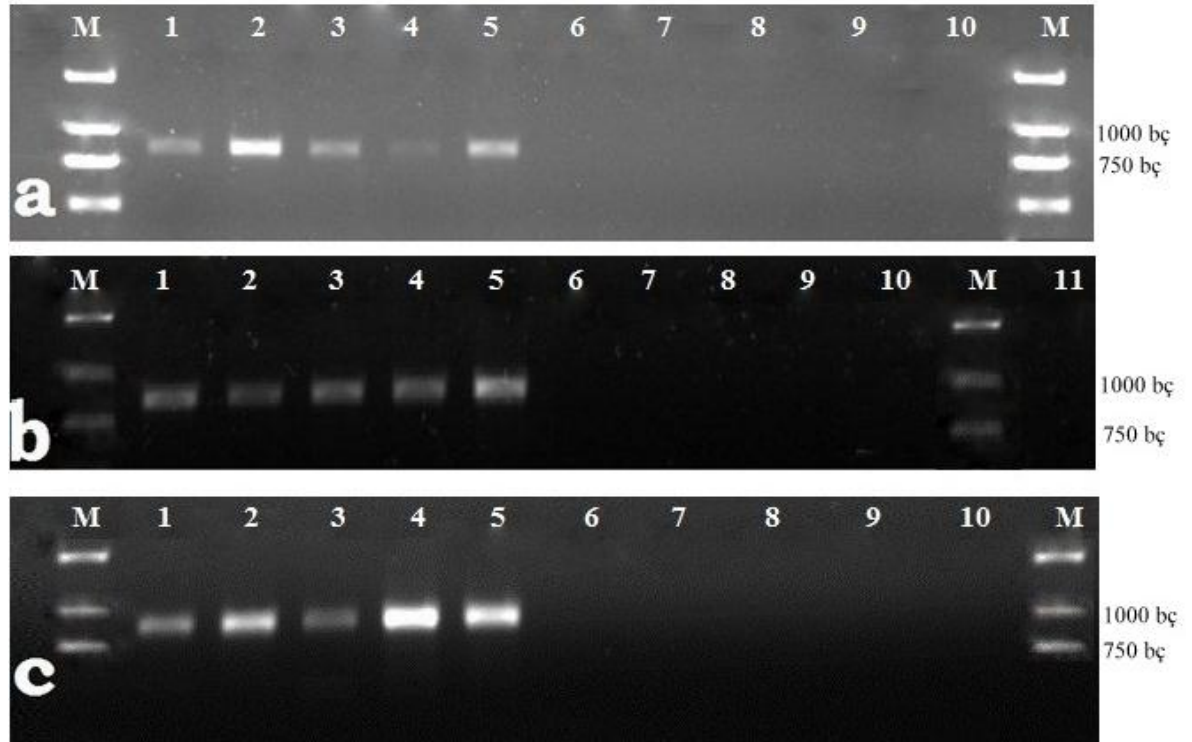
	Kök	Yaprak
Embriyo	66	57
Kök		33

4.3. *BARE1* VE *BAGY2* İÇ DOMENLERİNİN ÇOĞALTILMASI

Çalışmada *BARE1* retrotranspozonuna ait *gag* domeni ile *BAGY2* retrotranspozonuna ait *env* ve *rt* domenleri özgün primerler kullanılarak çoğaltıldı. İç domenlerin çoğaltılması için PCR'da kalıp olarak hem genomik DNA'lar, hem de cDNA'lar kullanıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi.

4.2.1. *Gag* Domeninin PCR Sonuçları

Bu çalışmada *gag* domeninin çoğaltılması için kullanılan primerler, aynı zamanda *pol* gen bölgesinin de bir kısmını içine almaktadır. PCR sonucunda ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntülendi (Şekil 4.3). Elde edilen sonuçlara göre tohum, kök ve yaprakta elde edilen genomik DNA'larda *BARE1 gag* domeninin varlığı saptandı. Buna karşın cDNA'lar ile yapılan PCR'da beklenen büyüklükte bir bant (850 bp) elde edilmedi.



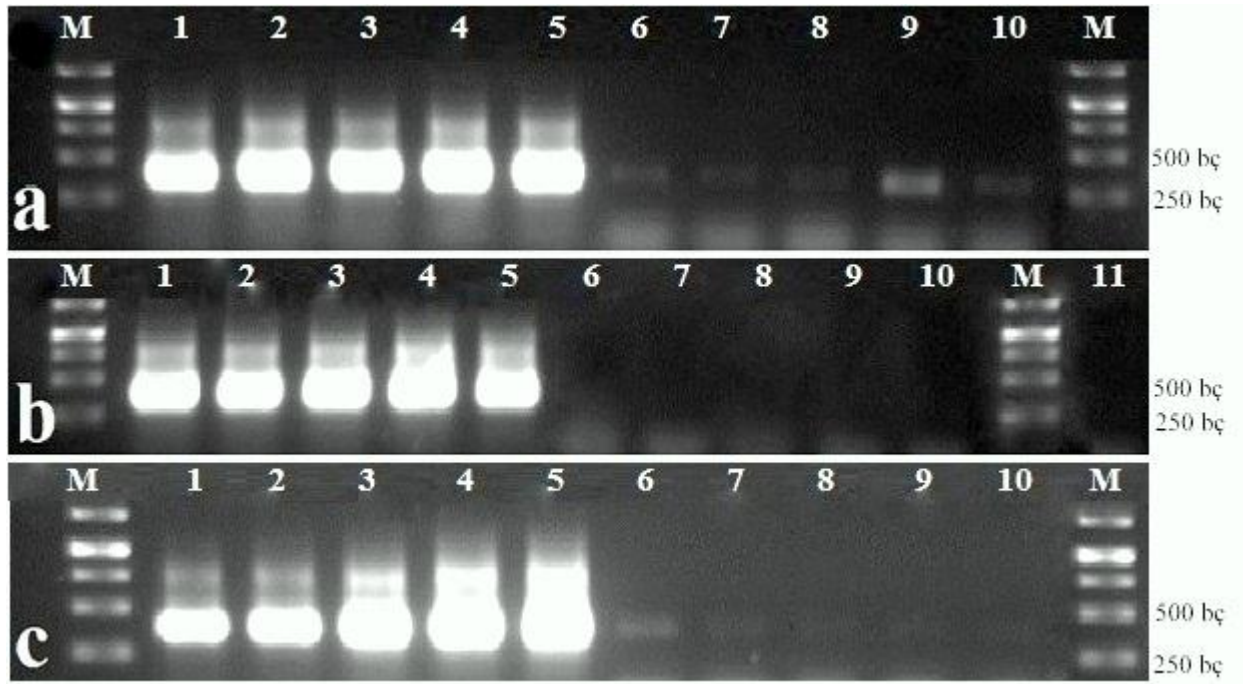
Şekil 4.3. *BARE1 gag* domeni için yapılan PCR sonuçları. a,b ve c (sırasıyla) embriyo, kök ve yaprakların PCR analizleri. 1-5 nolu örnekler: genomik DNA; 6-10 nolu örnekler: cDNA. b ve c'de aynı numara ile numaralandırılan kök ve yaprak örnekleri aynı fideden elde edildi.

Embriyo, kök ve yaprakta; 6-10 nolu cDNA'lar, (sırasıyla) 1-5 ile numaralandırılmış örneklerden izole edilen RNA'lardan sentezlendi ve PCR gerçekleştirildi. M: Markır.

Gag domeni cDNA örneklerinin hiçbirinde beklenen (850 bp) bandı vermemiştir. *BARE1 gag* ve *pol* domenlerinin anlatımı çoğunlukla iki farklı promotör tarafından kontrol edilmektedir (Vicent ve diğ., 2001a). Buna karşın, bu domenlerin tek bir mRNA şeklinde de transkribe olduğu bildirilmiştir (McCue ve diğ., 2012; Yarrington ve diğ., 2012). Bu çalışmada, *gag* domeninin cDNA örneklerinde anlatımının yapılmaması, *gag* ve *pol* bölgelerinin iki farklı promotör tarafından anlatımının yapıldığının göstergesi olabilir.

4.2.2. *Env* Domeninin PCR sonuçları

Çalışmada *BAGY2* retrotranspozonundaki *env* domeni hem genomik DNA'dan hem de cDNA'lardan çoğaltıldı. PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülendi (Şekil 4.4).

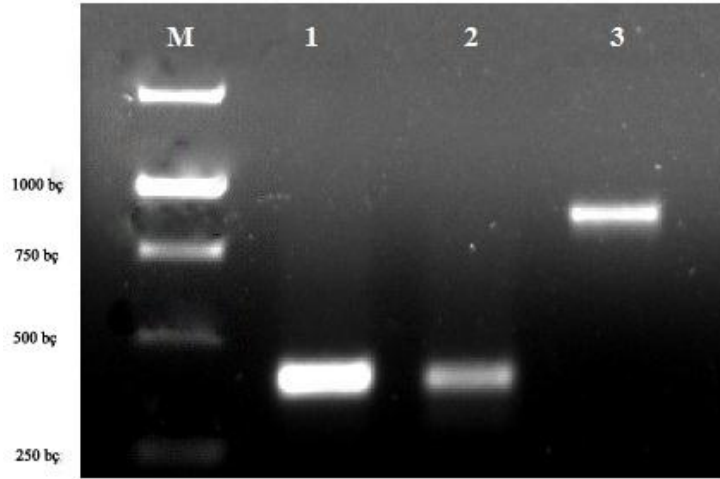


Şekil 4.4. *BAGY2 env* domeni için yapılan PCR sonuçları. a,b ve c (sırasıyla) embriyo, kök ve yaprakların PCR analizleri. 1-5 nolu örnekler: genomik DNA; 6-10 nolu örnekler: cDNA. b ve c'de aynı numara ile numaralandırılan kök ve yaprak örnekleri aynı fideden elde edildi. Embriyo, kök ve yaprakta; 6-10 nolu cDNA'lar, (sırasıyla) 1-5 ile numaralandırılmış örneklerden izole edilen RNA'lardan sentezlendi ve PCR gerçekleştirildi. M: Markır.

4.3. KLONLAMA ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

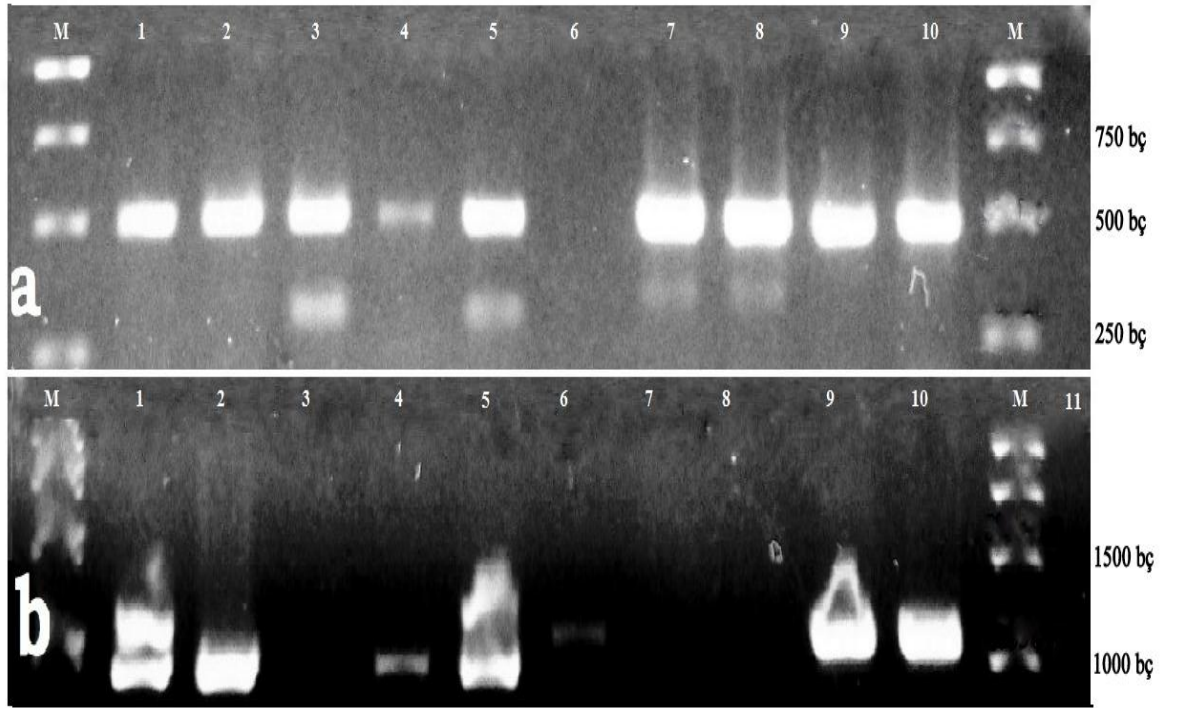
Tüm örneklerin genomik DNA'ları ile yapılan PCR'lardan elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde ayrıldı ve bantlar jelden geri kazanıldı (geri kazanma verimi %90). Elde edilen saflaştırma ürünlerinin her birinden (*gag*, *env* ve *rt*) 1 µl alınarak %1'lik agaroz jele yüklendi ve klonlama çalışmaları için uygunluğu kontrol edildi.

Elde edilen sonuçlar tüm PCR ürünlerinin klonlama için yeterli kalitede ve konsantrasyonda olduğunu gösterdi. Şekil 4.6'da, 1 numaralı bant *env* (385 bç), 2 numaralı bant *rt* (390 bç) ve 3 numaralı bant *gag* (850 bç) iç domenlerini göstermektedir.



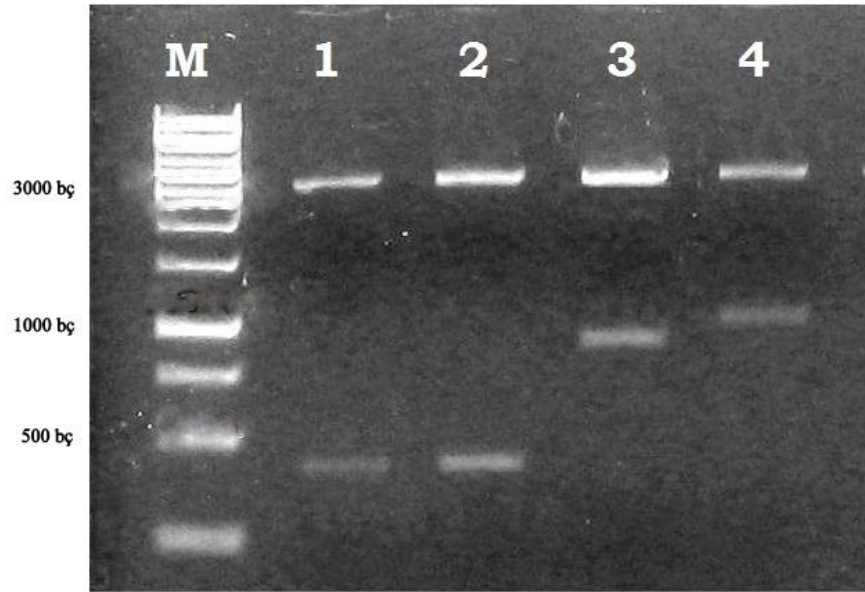
Şekil 4.6. Genomik DNA'lardan çoğaltılan PCR ürünlerinin saflaştırılması. M: Markır, 1. *env*, 2. *rt*, 3. *gag*.

Jelden saflaştırma sonrasında elde edilen ürünlerin pJET1.2 blunt vektöre ligasyonu yapıldı ve vektör JM107 *E. coli* hücre hattına klonlandı. Bir gece seçici besi ortamında inkübe edilen bakterilerden elde edilen koloniler, olası rekombinant olarak kabul edildi ve her bir insert için 5 koloni seçilerek koloni PCR ile doğrulama yapıldı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Koloni PCR. a (1-5) *env*, a (6-10) *rt*, b (1-5) *gag*, b (6-10) kontrol insert, M: Markır.

Elde edilen sonuçlara göre, *env* için 1 ve 2 nolu kolonilerin, *rt* için 9 ve 10 nolu kolonilerin, *gag* için 2 nolu koloninin ve kontrol insert için 10 nolu koloninin en iyi sonuçları verdiği görüldü. İyi sonuç veren koloniler antibiyotikli sıvı besin ortamında bir gece üretildi ve plazmit saflaştırması yapılarak restriksiyon analizlerine geçildi. İzole edilen plazmitler *Bgl*III enzimi ile kesildi ve ürünler %1'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Restriksiyon endonükleaz analizi. 1. *env*, 2. *rt*, 3. *gag*, 4. kontrol insert, M: Markır.

Kesim analizi sonucunda klonlamada kullanılan tüm insertlerin doğru bir şekilde klonlandığı görüldü. Çünkü restriksiyon enzimi kesimi sonucunda %1 agaroz jelde kontrol edilen *env* (385 bç), *rt* (390 bç), *gag* (850 bç) ve kontrol insertin (976 bç) beklenen büyüklükte bant verdiği gözlemlendi. *Env*, *rt* ve *gag* domenlerini içeren plazmitler dizi analizine gönderildi.

4.4. DİZİ ANALİZİ

Alınan sonuçların “The National Center for Biotechnology Information” - NCBI’da “Basic Local Alignment Search Tool” – BLAST analizi yapıldı. Çoğaltılan PCR ürünlerinin *BARE1-gag* domeni ile %91, *BAGY2-env* domeni ile %93 ve *BAGY2-rt* domeni ile %84 oranında benzerlik gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.9).

>[emb|AJ295226.1](#) Hordeum vulgare retrotransposon BARE-1 partial pseudogene
gag-protease fusion polypeptide precursor
Length=1220

Score = 638 bits (345), Expect = 2e-179
Identities = 429/469 (91%), Gaps = 7/469 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 18 ATACTTGGGGCAGTTGCGCTT-CAGTGA-CCATTCCCTTGC-ATAATAACACTCTGTTTC 74
Sbjct 932 ATACTTGGGGCAATTGCGCTTCCAGTGACCCATACCCCTTGCAATAGTAACACTTTGTTTC 873

Query 75 CGGCTTAGGTCCAGCCTTGGGTTTCTTCGTGCGATTGGCAACAGGCTTGCCGCTCTTCTT 134
Sbjct 872 AGGCTTAGGTCCAGCTTTGGGTTTCTTCGTGCGATTGGCAACAGGCTTGCCGCTCTTCTT 813

Query 135 GGAGTTACCCTTCTTGCCCTTTGCCGTTTCTCTTGAAACAGTGGTCTTATTGACCATCAA 194
Sbjct 812 TGAATTACCCTTCTTGCCCTTTGCCGTTTCTCTTGAAACAGTGGTCTTATTGACCATCAA 753

Query 195 CACTTGATGCTCTTTCCGGAGTTCTGACTCTGCGACTTTCAGCATCGCAAAATAACTCGCC 254
Sbjct 752 CACTTGATGTTCTTTACGGAGTTTCAGACTCTGCGACTTTCAGCATCGCAAAATAACTCGCC 693

Query 255 GGGTGAC-TTGTTCATCCCTTGCAATGTTATAGTTCAACACAAAG-CTCTTATAGCTAGGT 312
Sbjct 692 GGGTG-CTTTGTTCAACCCTTGCAATGTTGATGTTCAACACAAAGCCT-TTATAGCTTGGC 635

Query 313 GGCAGTGATTGAAGAATTCTGTCACTGATAGCCTCTTGCGGGAGTTCAATCCCCAGCTCA 372
Sbjct 634 GGAAGTGATTGAAGGATTCTATCAGTGATAGCCTCTTGCGGGAGTTCAATCCCCAGCTCA 575

Query 373 GCTAGACGGTTTGTAGTACCCAGACATTTTGAGCACATGTTCACTGACAGACAAAATCTCC 432
Sbjct 574 GCTAGATGGTTTGTAGTACCCAGACATTTTGAGCACATGTTCACTGACAGACAGGTTCTCC 515

Query 433 TCCATCTTGAAGCATACAACCTTCTCGGAGGCCCTTAGCTCTCGATCC 481
Sbjct 514 TCCATCTTGCAGCATAGAATTTATCGGAGGTCTCATACCTCTCGATCC 466

```

>[emb|AJ298028.1](#) Hordeum vulgare DNA for partial BAGY-2 retroelement (HVGI) envelope-li
domain
Length=387

Score = 462 bits (250), Expect = 2e-126
Identities = 299/321 (93%), Gaps = 9/321 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 9 TGA-GAGG-AGA-GA-TA-GATCCC-AGGGGAAGGAAC-AACGAGTTCGGATGAAGAGGA 61
Sbjct 41 TGACGAGGAAGAGGACTATGATCCCAAGGGGAAGGAACAAACGAGTTCGGATGAAGAGGA 100

Query 62 GGCTCCTCTACCTCAACCTGGACACACTCATGTGGAGTTCAAGAAGTCAAGCCTCCCTGA 121
Sbjct 101 GGCTCCTCTACCTCAACCTGGATGCACTCATGTGGAGTTCAAGAAGTCAAGCCTCCCTGA 160

Query 122 CTC-AAGGAAGAAGCCTAAGACCTTGTTTATCCCTTCTCGTTTCTTGACAGGAGAGTAAGC 180
Sbjct 161 C-CAAAGGAAGAAGCCTAAGACCTTGTTTATCCCTTCTCGTTTCTTGACAGGAGAGTAAGC 219

Query 181 AGGAACCTTGGCCATAGGGTGTGAAGCTTGAGGAGGAAATGATGATCTGAGGGAGCAGA 240
Sbjct 220 AAGAACCTTGGCCATAGAGTGTGAAGCTTGAGGAGGAAATGACGATTGAAGGAGTAGA 279

Query 241 ACTTTATGCTCAAGTGGAAATTAGACAAGCTCAAGACTGCTACAACAACCTCCACCACCAC 300
Sbjct 280 ACTTTATGCTCAAGTGGAAATTAGACAAGCTCAAGACTGCTACAACAACCTCCACCACCAT 339

Query 301 CACCACCTTAAGGAAGACAAC 321
Sbjct 340 CACCACCAAGGAAGACAAC 360

```

>[emb|AJ295086.1](#) Hordeum vulgare gypsy-like retrotransposon PCR product BARGY-G2
Length=380

Score = 289 bits (156), Expect = 3e-74
Identities = 261/310 (84%), Gaps = 14/310 (5%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 26 AAAACACATCACTTCTGCTATCTAGATGGGTATTCTGGTTTCTCTCAA-TACCTGTTGC 84
Sbjct 46 AAAACAC-TCACCTTTTCTATCTTGATGGGTAATCTGGCTTCTCTCAAATTA-ATGTT-A 102

Query 85 AC-CTGTGATCAAGAGAAAACCACTTCACTTGCCCCCTTTGGTACTTATGCTTATAGAC 143
Sbjct 103 ACACAGCCAATCAAGAGAAAGACCACTTTTACTTGTCCCTTTGGTACTTATGCTTATAGAC 162

Query 144 GTATGCCTTTTGGCTTATGCAATGCTCCTGCTACTTTTCAAAGATGATGAGCGCTATCT 203
Sbjct 163 GTATGCCTTTTGGTTTATGCAATGCTCCTGTTACTTTTCAAAGGTGATGTCACACTATCT 222

Query 204 TCTC-TGATTTTGTGAGGAAATTGTGAAGGTCTTCA-GGAACAATTCCCCCGTCAAGGG 261
Sbjct 223 T-TCATGGTTTGTGAGGAAATTGTGAGGTCTTCATGGA-CGATTTTCCGCTCTATGG 280

Query 262 AACCTCTTTTAAAC-ATTGGTCCCCACAAC-TTGAATAAAGTTTACAAAGATGTGAG-AC 318
Sbjct 281 AACCTCTTTTGAACATTG-TCTCCGCAACCTT-AATAAAGTTTGCAGAGATGTGAGGAG 338

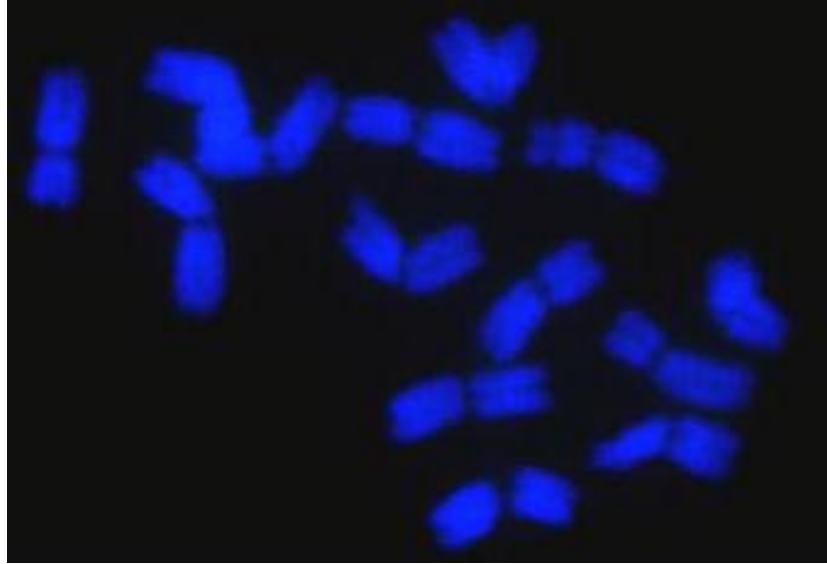
Query 319 ACCAACCTTG 328
Sbjct 339 ACGAAGCTTG 348

```

Sekil 4.9. Dizi analizlerinin BLAST sonuçları.

4.5. KROMOZOM ANALİZLERİ

DAPI ile boyanan preparatlar floresan mikroskobu ile incelendiğinde, metafaz evresinde olan her bir örnekte 100 adet hücre sayıldı. Preparatlar incelenirken bölünen hücreler sayıldı ve mitotik indeks %0.5 olarak hesaplandı (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Arpa kromozomlarının metafaz evresinde DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskopta görünümü.

Retrotranspozonların moleküler düzeyde polimorfizme yol açtığı arpa embriyo, kök ve yapraklarında IRAP markır analizi ile saptandı. Kromozomal düzeyde yapılan analizler sonucunda retrotranspozonların herhangi bir anomaliye sebep olmadıkları gözlemlendi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, 16 saat suda bırakılmış tohumlardan elde edilen embriyo ve aynı embriyodan gelişen 10 günlük kök ve yaprak dokularındaki *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozon hareketleri, IRAP moleküler markır tekniği ile araştırıldı. Bitki gelişimindeki hareket farklılıklarının yanısıra *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonlarına ait iç domenler (*gag*, *env* ve *rt*), DNA ve gen anlatımı için cDNA düzeyinde analiz edildi. İç domenlerin analizlerinde ise *gag*, *env* ve *rt* bölgelerinin anlatım profilleri incelendi. Retrotranspozon çalışmalarının yanı sıra kök uçlarından yapılan preparatlarda kromozom analizleri gerçekleştirildi.

Günümüze kadar yapılan pek çok çalışmada, *BARE1*'in arpada en yaygın olarak bulunan retrotranspozon olduğu bildirilmiştir (Vicent ve diğ., 1999a; Wicker ve diğ., 2009). Bununla birlikte, arpada en çok çalışılan retrotranspozonlar aktivite yönünden karşılaştırıldıklarında *BARE1* ve *BAGY2* ilk sıralarda yer almaktadır; *BARE1* > *BAGY2* = *Sukkula* > *Nikita* > *Sabrina* (Leigh ve diğ., 2003). Bu çalışmada aynı embriyodan gelişen kök ve yapraklarda *BARE1* retrotranspozonunda hareket izlenirken, *BAGY2*'nin daha hareketsiz olduğu belirlendi.

Hareketli elementlerin somatik aktiviteleri için çeşitli açıklamalar yapılmaktadır. Bazı araştırmacılar, somatik olayların konak için önemsiz olduğu ve böylece germ hattının özelleşmesi için hareketli elementlerin öneminin az olduğu görüşündedir. Diğer bir düşünce de somatik olayların zararlı olduğu yönündedir. Son görüş ise, somatik olayların konak için yararlı olduğu şeklindedir. Bu görüş, sinir dokularında L1 retrotranspozon aktivitesinin açıklanmasının ardından savunulmaya başlanmıştır (Muotri ve diğ., 2005). Uzun zamandır hareketli elementlerin somatik hücre gelişimine kıyasla, germ hücreleri gelişimi boyunca insersiyon yaptıkları görüşü yaygınken; son yapılan çalışmlarda transpozonların somatik hücrelerde de hareket ettiklerine dair bulgular elde edilmiştir.

Buna örnek olarak, *Drosophila* embriyolarının gelişimi boyunca somatik hücrelerde R2 retrotranspozon insersiyonunun tanımlanması gösterilebilir (Eickbush ve Eickbush, 2011).

İç domenlerin PCR analizlerinde *BARE1 gag* domeni genomik DNA'dan çoğaltılabilmemesine karşın cDNA'dan çoğaltılamadı. *BARE1*, iki farklı promotör bölgesine sahip bir retrotranspozondur. *Gag* ve *pol* bölgeleri iki farklı promotör tarafından kontrol edildikleri için iki farklı transkript olarak anlatımı yapılır (Vicient ve diğ., 2001a). Buna karşın bazı çalışmalarda bu iki bölgenin tek bir transkript olarak da anlatımının yapıldığı bildirilmiştir (McCue ve diğ., 2012; Yarrington ve diğ., 2012). Bu çalışmada, *gag* domeninin cDNA'lardan çoğaltılamaması *BARE1 gag* ve *BARE1 pol* bölgelerinin embriyo, kök ve yapraklarda iki farklı promotör tarafından kontrol edildiğinin göstergesi olabilir. *BAGY2 env* domeninin ise embriyo ve yaprak cDNA'larından çoğaltılabilmesi, *env*'nin bu örneklerde anlatım yaptığını göstermektedir. Buna karşın, kök dokuları ile yapılan PCR'ın negatif sonuç vermesi, *env*'nin kökte aktif bir domen olmadığının göstergesidir. *BAGY2 rt* domeni için yapılan PCR, bütün örneklerde hem genomik DNA'larda hem de cDNA'larda pozitif sonuç verdi. Buna karşın, farklı tohumlardan gelişen aynı dokulara ait cDNA'larda görülen PCR ürünü miktarlarının farklı olması, bireyler arasında *rt* domeninin anlatım profilinin değişebileceğini göstermektedir. *BARE1* ve *BAGY2*'ye ait iç domenlerin genomik DNA'dan çoğaltılması aşamasında aynı miktarda kalıp kullanılmasına karşın, agaroz jelde *BAGY2 env* ve *rt* domenlerinin *BARE1 gag* domenine oranla daha yüksek PCR ürünü verdiği gözlemlendi. *BAGY2 rt* domeninden elde edilen PCR sonuçları da *env* ile benzerlik göstermektedir. *rt* domeninin tüm örneklerde ait cDNA'lardan elde edilmesine karşın, PCR ürünü miktarındaki farklılık *rt*'nin de *env* gibi hem dokuya göre, hem de bireylere göre farklı anlatım profiline sahip olduğunu düşündürmektedir.

BARE1 ve *BAGY2* retrotranspozonlarının klonlanan iç domenlerin domenleri (*gag*, *env* ve *rt*) çoğaltıldıktan sonra dizilemeye gönderildi. Elde edilen veriler "The National Center for Biotechnology Information" - NCBI'da "Basic Local Alignment Search Tool" – BLAST programı kullanılarak incelendi.

BLAST sonucunda, çoğaltılan iç domenlerin arpa *BARE1* ve *BAGY2* retrotranspozonları ile yüksek oranda (*BARE1-gag*, %91; *BAGY2-env*, %93 ve *BAGY2-rt*, %84) benzerlik gösterdiği tespit edildi. Bu sonuçlar, çoğaltılan ürünlerin ilgili domenler olduğunu göstermektedir.

Retrotranspozonların anlatım farklılıklarının, gelişim süresince incelendiği çalışmalar da vardır. Vicient ve diğ. (2001a), *BAGY2 env* domeinini arpanın farklı dokularından (embriyo, yaprak, kallus ve polen) elde edilen cDNA'dan çoğaltmışlardır. Tüm örneklerde çoğaltımın başarılı olması *env*'nin *BAGY2* retrotranspozonunun aktif bir domeni olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında, yaprak ve embriyo cDNA'larından *env* domeninin çoğaltılabilmesi, Vicient ve diğ. (2001a) bulguları ile benzerlik gösterirken, kök dokularında çoğaltılamaması *env*'nin dokuya özgü bir anlatım profili gösterdiğini kanıtlamaktadır. Bununla birlikte, farklı bireylere ait aynı dokuların cDNA'larıyla yapılan PCR sonucunda, elde edilen ürünlerin konsantrasyonlarının da farklı olması *env*'nin anlatım profilinin sadece dokuya göre farklılaşmadığını, aynı türün farklı bireyleri arasında da farklılık gösterdiğini kanıtlamaktadır. Vukich ve diğ. (2009), ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkisinde kök, yaprak ve çiçek dokuları ile embriyoda *copia* ve *gypsy* retrotranspozonlarının anlatım farklılıklarını incelemiştir. Çalışmanın sonunda, analiz edilen tüm örneklerde retrotranspozonların aktif olarak anlatımının yapıldığı gözlenmiştir.

Son yıllarda, retrotranspozonların farklı dokularda farklı anlatım profillerinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmaktadır. Mısır bitkisinde gelişim sırasında transpozon anlatımının düzenlenmesinin önemi Li ve diğ. (2010) tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar, germ hattı dokularında aktif olan transpozonların, vegetatif faz değişimlerinde özellikle RNA'lar aracılığı ile epigenetik olarak susturulduğunu belirtmişlerdir. Faunes ve diğ. (2011), *Xenopus tropicalis* gelişiminde *Tc1* ailesinden transpozonların, sinir sisteminin farklı bölgelerinde farklı anlatımlarının olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, olgun embriyo dokularında *BAGY2* transpozon *rt* domenlerinin anlatımının daha fazla olması, gelişim ve farklılaşmanın retrotranspozonların hareketlerini etkilediği şeklinde açıklanabilir.

Transpozon hareketlerinin çok önemli epigenetik etkileri bulunmaktadır. Transpozonlar, X kromozomu inaktivasyonundan “imprintinge” (paternal ya da maternal kalıtım) kadar birçok epigenetik olayda önemli rollere sahiptir. Transpozonların neden olduğu yaygın epigenetik düzenlenmenin yanı sıra, transpozonların kendileri de epigenetik mekanizmalar tarafından sessizleştirilmekte veya aktifleştirilmektedir. Transpozon ve epigenetik ilişkisini konu alan birçok çalışma mevcuttur. Hücre bölünmesi sırasında, kromozomların ayrılmasında sentromerlerin önemli rolü vardır. Epigenetik olarak susturulmuş transpozabl elementelerin yeniden aktif hale gelmesi ile farelerde mayotik kusurların meydana geldiği (Bourc’his ve Bestor, 2004; Peters ve diğ., 2001; De La Fuente ve diğ., 2006), bölünen mayada kardeş kromatid kohezyonunun kaybı (Pidoux ve Allshire, 2005) ve *A. thaliana* bitkisinde sentromer bölgesinin oluşamaması (Lippman ve Martienssen, 2004) gözlenmiştir. Çalışmalar sonucunda transpozabl elementlerin sentromer yapısında ve sentromer işlevinde önemli role sahip olduğu düşünülmektedir. Bitkilerde, retrotranspozonlar “centromeric satellite arrays” – sentromerik uydu dizilerin susturulmasında (sentromerik satellit uydu diziler de retrotranspozonların susuturulmasında görevlidir) görev yapar (May ve diğ., 2005).

Bu tez çalışmasının ikinci kısmında arpa kromozom analizleri gerçekleştirilmiştir. Transpozon analizleri ile farklılıklar izlenirken kromozom düzeyinde farklılık gözlenememesi varyasyon analizlerinin moleküler düzeyde daha iyi saptanabileceğini göstermiştir. Literatürde kromozomal düzeyde yapılan çalışmalar incelendiğinde çalışmaların hepsi bilinen bir retrotranspozon ailesinin kromozomda yerinin tespitine dayalıdır ve kromozomlarda herhangi bir anomali belirlenmemiştir. Waugh ve diğ. (1997) yaptığı çalışmada, arpa kromozomlarında, *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak DAPI ile boyandığında, *BARE1* retrotranspozonunun sentromerik ve nükleolar organize edici bölgeler hariç tüm kromozom kollarında bulunduğu tespit edilmiş ve herhangi bir kromozom anomali gözlenmemiştir. *H. vulgare*, *H. euclaston* ve *H. pusillum* bitkileri ile yapılan çalışmada da arpa kromozomlarında *BARE1* retrotranspozonun bulunduğu bölgeler tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca *BARE1* *rt* ve *int* iç domenlerine ait PCR ürünleri prob olarak kullanılmış ve *in situ* hibridizasyon yöntemiyle arpa kromozomlarında incelenmiştir (Vicient ve diğ., 1999a).

BARE1 retrotranspozonu ile ilgili yapılan *in situ* hibridizasyon çalışmaları sadece arpa bitkisi ile sınırlı kalmamıştır. Cavallini ve diğ. (2010) yaptıkları çalışmada, ayçiçeğinde *copia* ve *gypsy* gibi tekrarlı elementlere özgü problemlerin kullanılması ile kromozomlarda *copia* ve *gypsy* elementlerinin yerleri belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında aynı tohumdan gelişen farklı dokulardaki retrotranspozon hareketleri ve retrotranspozonların iç domenlerinin anlatım profilleri ile arpa kromozomları incelendi. Polimorfik bantların moleküler düzeyde dizilerinin araştırılması ile transpozon hareketlerinin genomun hangi bölgelerinde yoğunlaştığı belirlenebilir ve kromozomal düzeyde bu bölgelerin yerleri tespit edilebilir. Anlatım profillerinin daha detaylı incelenmesi ile iç domen anlatımlarının farklı dokulardaki polimorfizmi anlaşılabilir. Bu tez çalışması gelişim sürecinde farklı dokularda transpozon hareketi temellerini ve anlatım profillerini moleküler yöntemlerle araştıran öncü bir çalışmadır ve polimorfizmin farklı dokularda araştırılmış olması bakımından bu çalışma bir ilktir.

KAYNAKLAR

<http://barleyworld.org/whatisbarley/BarleyProduction.php>, Ziyaret tarihi: 08.06.2011.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?chr=barley.inf, Ziyaret tarihi: 20.07.2011.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html, Ziyaret tarihi: 20.07.2011.

<http://www.fao.org/faostat>, Ziyaret tarihi: 12.07.2011.

<http://gydb.org/index.php/LTRs>, Ziyaret tarihi: 20.07.2011.

http://gydb.org/index.php/LTR_retroelements, Ziyaret tarihi: 20.07.2011.

<http://gydb.org/index.php/Ty3/Gypsy>, Ziyaret tarihi: 20.07.2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, Ziyaret tarihi: 25.03.2012.

ASTOLFI, P.A., SALAMINI, F., and SGARAMELLA, V., 2010, Are we genomic mosaics? Variations of the genome of somatic cells can contribute to diversify our phenotypes, *Current Genomics*, 11, 379-386.

BABU, A. and VERMA, R.S., 1987, Chromosome structure: euchromatin and heterochromatin, *International Review of Cytology*, 108, 1-60.

BADR, A., MULLER, K., SCHAFER-PREGL, R., EL RABEY, H., EFFGEN, S., IBRAHIM, H.H., POZZI, C., ROHDE, W. and SALAMANI, F., 2000, On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, 17 (4), 499-510.

BAILLIE, J.K., BARNETT, M.K., UPTON, K.R., GERHARDT, D.J., RICHMOND, T.A., DE SAPIO, F., BRENNAN, P.M., RIZZU, P., SMITH, S., FELL, M., TALBOT, R.T., GUSTINCICH, S., FREEMAN, T.C., MATTICK, J.S., HUME, D.A., HEUTINK, P., CARNINCI, P., JEDDELOH, J.A., and FAULKNER, G.J., 2011, Somatic retrotransposition alters the genetic landscape of the human brain, *Nature*, 479, 534-537.

BANKS, J.A., MASSON, P. and FEDOROFF, N., 1988, Molecular mechanisms in the developmental regulation of the maize suppressor-mutator transposable element, *Genes and Development*, 2, 1364-1380.

BARCH, M.J., 1991, *The act cytogenetics laboratory manual*, Raven Press, Second Edition, London.

BAUCOM, R.S., ESTILL, J.C., CHAPARRO, C., UPSHAW, N., JOGI, A., DERAGON, J.M., WESTERMAN, R.P., SANMIGUEL, P.J. and BENNETZEN, J.L., 2009, Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B₇₃ maize genome, *Plos Genetics*, 5(11): e1000732.

BENNETZEN, J.L., 1996, The contributions of retroelements to plant genome organization, function and evolution, *Trends in Microbiology*, 4(9), 347-353.

BENNETZEN, J.L., 2000, Transposable elements contributions to plant gene and genom evolution, *Plant Molecular Biology*, 42(1), 251-269.

BERDUSHEV, G.D., KOROTAEV, G.K., BOYARSKIKH, G.V., VANYUSHIN, B.F., 1967, Nucleotide composition of DNA and RNA from somatic tissues of Pink Salmon and its changes in the course of spawning, *Biokhimiya*, 32, 988-993.

BERGMAN, C.M. and QUESNEVILLE, H., 2007, Discovering and detecting transposable elements in genome sequences, *Briefings in Bioinformatics*, 8 (6), 382-392.

BERNET, G.P., ASINS, M.J., 2004, Identification and genomic distribution of *gypsy* like retrotransposons in *Citrus* and *Poncirus*, *Theoretical and Applied Genetics*, 108 (1), 121-130.

BIEMONT, C., 2009, Are transposable elements simply silenced or are they under house arrest?, *Trends in Genetics*, 25 (8), 333-334.

BIRD, A., 2002, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes and Development*, 16, 6-21.

BIRD, A., 2007, Perceptions of epigenetics, *Nature*, 447, 396-398.

BOCK, C. and LENGAUER, T., 2008, Computational epigenetics, *Bioinformatics*, 24(1), 1-10.

BOURC'HIS, D. and BESTOR, T.H., 2004, Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking *Dnmt3L*, *Nature*, 431, 96-99.

BOWEN, N.J. and JORDAN, K.I., 2002, Transposable elements and the evolution of eukaryotic complexity, *Current Issues in Molecular Biology*, 4, 65-76.

CAMERON, J.R., LOH, E.Y., DAVIS, R.W., 1979, Evidence for transposition of dispersed repetitive DNA families in yeast, *Cell*, 16 (4), 739-51.

CASACUBERTA, J.M., SANTIAGO, N., 2003, Plant LTR-retrotransposons and MITEs: Control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes, *Gen*, 311, 1-11.

- CASPERSSON, T., FARBER, S., FOLEY, G.E., KUDYNOWSKI, J., MODEST, E.J., SIMONSSON, E., WAGH, U., ZECH, L., 1968, Chemical differentiation along metaphase chromosomes, *Experimental Cell Research*, 49 (1), 219-22.
- CAVALLINI, A., NATALI, L., ZUCCOLO, A., GIORDIANI, T., JURMAN, I., FERRILLO, V., VITACOLONNA, N., SARRI, V., CATTONARO, F., CECCARELLI, M., CIONINI, P. G., MORGANTE, M., 2010, Analysis of transposons and repeat composition of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome, *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (3), 491-508.
- CHAVANNE, F., ZHANG, D-X., LIAUD, M-F., and CERFF, R., 1998, Structure and evolution of *Cyclops*: A novel giant retrotransposon of the *Ty3/Gypsy* family highly amplified in pea and other legume species, *Plant Molecular Biology*, 37 (2), 363-375.
- CHOMET, P.S., WESSLER, S., DELLAPORTA, S.L., 1987, Inactivation of the maize transposable element *Activator* (Ac) is associated with its DNA modification, *The EMBO Journal*, 6 (2), 295-302.
- CHOO, K.H., 1997, Centromere DNA dynamics: Latent centromeres and neocentromere formation, *American Journal of Human Genetics*, 61 (6), 1225-1233.
- CONGER, A.D. and FAIRCHILD, L.M., 1953, A quick-freeze method for making smear slides permanent, 28 (6), 281-283.
- CORCES, V.G. and GEYER, P.K., 1991, Interactions of retrotransposons with the host genome: The case of the *gypsy* element of *Drosophila*, *Trends in Genetics*, 7(3), 86-90.
- CRAIG, N.L., CRAIGIE, R., GELLERT, M., and LAMBOWITZ, A.M., 2002, *Mobile DNA II*, ASM Press, Washington, DC.
- CROSSEN, P.E., 1972, Giemsa banding patterns of human chromosomes, 3 (3), 169-179.
- DABOUSSI, M-J., LANGIN, T., DESCHAMPS, F., BRYGOO, Y., SCAZZOCCHIO, C., BURGER, G., 1991, Heterologous expression of the *Aspergillus nidulans* regulatory gene *nirA* in *Fusarium oxysporum*, *Gene*, 109 (1), 155-160.
- DE LA FUENTE, R., BAUMANN, C., FAN, T., SCHMIDTMANN, A., DOBRINSKI, I. and MUEGGE, K., 2006, Lsh is required for meiotic chromosome synapsis and retrotransposon silencing in female germ cells, *Nature Cell Biology*, 8, 1448-1454.
- DEMİR, Z., 2008, *Nick translasyon yönemiyle işaretlenmiş özgün DNA dizilerinin kompleks kromozom anomalilerinin aydınlatılmasında kullanılması*, Yüksek lisans tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi.
- DERKS, S., LENTJES, M.H.F.M., HELLEBREKERS, D.M.E.I., 2004, Methylation-specific PCR unraveled, *Cell Oncology*, 26, 291-299.

DUVAL-VALENTIN, G., MARTY-COINTIN, B. and CHANDLER, M., 2004, Requirement of *IS911* replication before integration defines a new bacterial transposition pathway, *The EMBO Journal*, 23, 3897-3906.

EGGER, G., LIANG, G., APARICIO, A. and JONES, P.A., 2004, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature*, 429, 457-463.

EICKBUSH, T.H., MALIK, H.S., 2002, *Origins and Evolution of Retrotransposons*, In: *Mobile DNA II*, (Edited by CRAIG, N.L., CRAIGIE, R., GELLERT, M., LAMBOWITZ A.L.) Washington DC, ASM Press, 1111-1144.

EICKBUSH, T.H., JAMBURUTHUGODA, V.K., 2008, The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases, *Virus Research*, 134 (1-2), 221-234.

EICKBUSH, M.T. and EICKBUSH, T.H., 2011, Retrotransposition of R2 elements in somatic nuclei during the early development of *Drosophila*, *Mobile DNA*, 2, 11.

ELÇİ, Ş., 1982, *Sitogenetikte gözlemler ve araştırma yöntemleri*, Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Yayınları, Biyoloji: 3, Uğurel Matbaası, Malatya.

EVGEN'EV, M.B., ARKHIPOVA, I.R., 2005, *Penelope*-like elements-a new class of retroelements: Distribution, function and possible evolutionary significance, *Cytogenetic and Genome Research*, 110 (1-4), 510-521.

FAUNES, F., SANCHEZ, N., MORENO, M., OLIVARES, G.H., LEE-LIU, D., ALMONACID, L., SLATER, A.X., NORAMBUENA, T., TAFT, R.J., MATTICK, J.S., MELO, F., LARRAIN, J., 2011, Expression of transposable elements in neural tissues during *Xenopus* development, *Plos One*, 6 (7): e22569.

FEDOROFF, N., 2000, Transposons and genome evolution in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (13), 7002-7007.

FESCHOTTE, C., JIANG, N. and WESSLER, S.R., 2002, Plant transposable elements: Where genetics meets genomics, *Nature*, 3, 329-341.

FINNEGAN, D.J., RUBIN, G.M., YOUNG, M.W. and HOGNESS, 1978, Repeated gene families in *Drosophila melanogaster*, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 42, 1053-1063.

FINNEGAN, D.J., 1989, Eukaryotic transposable elements and genome evolution, *Trends in Genetics*, 5, 103-107.

FORSTER, B.P., ELLIS, R.P., THOMAS, W.T.B., NEWTON, A.C., TUBEROSA, R., THIS, D., EL-ENEIN, R.A., BAHRI, M.H. and BEN SALEM, M., 2000, The development and application of molecular markers for abiotic stress tolerance in barley, *Journal of Experimental Botany*, 51 (342), 19-27.

- FRAGOULI, E., ALFARAWATI, S., DAPHNIS, D.D., GOODALL, N.N., MANIA, A., GRIFFITHS, T., GORDON, A. and WELLS, D., 2011, Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: Scientific data and technical evaluation, *Human Reproduction*, 26 (2), 480-490.
- FUCHS, J., PICH, U., MEISTER, A. and SCHUBERT, I., 1994, Differentiation of field bean heterochromatin by *in situ* hybridization with a repeated *FokI* sequence, *Chromosome Research*, 2 (1), 25-28.
- FUNAKI, K., MATSUI, S. and SASAKI, M., 1975, Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique, 49 (4), 357-370.
- GAO, L., MCCARTHY, E. M., GANKO, E.W. and McDONALD, J.F., 2004, Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: A preliminary survey of the rice genome sequences, *BMC Genomics*, 5, 18.
- GRZEBELUS, D., 2006, Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular markers, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 14 (1), 21-29.
- GU, Y.Q., COLEMAN-DERR, D., KONG, X. and ANDERSON, O.D., 2004, Rapid genome evolution revealed by comparative sequence analysis of orthologous regions from four *Triticeae* genomes, *Plant Physiology*, 135, 459-470.
- GULNIK, S., ERICKSON, J.W. and XIE, D., 2000, HIV protease: Enzyme function and drug resistance, *Vitamins and Hormones*, 58, 213-256.
- HAVECKER, E.R., GAO, X. and VOYTAS, D.F., 2004, The diversity of LTR retrotransposons, *Genome Biology*, 5, 225.
- HAVECKER, E.R., GAO, X. and VOYTAS, D. F., 2005, The sireviruses, a Plant-specific lineage of the *Ty1/Copia* retrotransposons, interact with a family of proteins related to dynein light chain 8, *Genetics, Genomics, and Molecular Evolution*, 139, 857-868.
- HESLOP-HARRISON, J.S., SCHWARZACHER, T., 2011, Organisation of the plant genome in chromosomes, *The Plant Journal*, 66, 18-33.
- HO, L. and CRABTREE, G.R., 2010, Chromatin remodelling during development, *Nature*, 463, 474-484.
- HSU, T.C. and ARRIGHI, F.E., 1971, Distribution of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes, *Chromosoma*, 34 (3), 243-253.
- HUANG, J., ZHANG, K., SHEN, Y., HUANG, Z., LI, M., TANG, D., GU, M., CHENG, Z., 2009, Identification of a high frequency transposon induced by tissue culture, *nDaiz*, a member of the *hAT* family in rice, *Genomics*, 93 (3), 274-281.

IRWIN, P.A. and VOYTAS, D.F., 2001, Expression and processing of proteins encoded by the *Saccharomyces* retrotransposon Ty5, *Journal of Virology*, 75, 1790–1797.

JAASKELAINEN, M., MYKKANEN, A.-H., ARNA, T., VICIENT, C.M., SUONIEMI, A., KALENDAR, R., SAVILAHTI, H., SCHULMAN, A.H., 1999, Retrotransposon *BARE-1*: Expression of encoded proteins and formation of virus-like particles in barley cells, *The Plant Journal*, 20, 413-422.

JACCARD, P., 1908, Nouvelles recherches sur la distribution florale, *Bulletin de la societe vaudoise des sciences naturelles*, 44, 223-270.

JACKSON, R. and KAMINSKI, A., 1995, Internal initiation of translation in eucaryotes: The Picornavirus paradigm and beyond, *RNA*, 1 (10), 985-1000.

JIANG, N., BAO, Z., TEMNYKH, S., CHENG, Z., JIANG, J., WING, R.A., McCOUCH, S.R. and WESSLER, S.R., 2002a, *Dasheng*: a recently amplified nonautonomous long terminal repeat element that is a major component of pericentromeric regions in rice, *Genetics*, 161 (3), 1293-1305.

JIANG, N., JORDAN, I. K., WESSLER, S. R., 2002b, *Dasheng* and *RIRE2*. A nonautonomous long terminal repeat element and its putative autonomous partner in the rice genome, *Plant Physiology*, 130 (4), 1697-1705.

JURKA, J., 2008, Conserved eukaryotic transposable elements and the evolution of gene regulation, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 201-204.

KAEPPLER, S.M., KAEPPLER, H.F. and RHEE, Y., 2000, Epigenetic aspects of somaclonal variations in plants, *Plant Molecular Biology*, 43, 179-188.

KALENDAR, R., TANSKANEN, J., IMMONEN, S., NEVO, E. and SCHULMAN, A.H., 2000, Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by *BARE-1* retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (12), 6603-6607.

KALENDAR, R., VICIENT, C.M., PELEG, O., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., BOLSHOY, A., and SCHULMAN, A.H., 2004, Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes, *Genetics*, 66 (3), 1437-1450.

KALENDAR, R., SCHULMAN, A., 2006, IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping fingerprinting, *Nature Protocols*, 1 (5), 2478-2484.

KATERJI, N., VAN HOORN, J.W., HAMDY, A., MASTORILLI, M., FARES, C., CECCARELLI, S., GRANDO, S., OWEIS, T., 2006, Classification and salt tolerance analysis of barley varieties, *Agricultural Water Management*, 85, 184-192.

KAYDAN, D., GEÇİT, H.H., 2005, Arpada ekim yöntemleri ve ekim sıklıklarının verim ve verim öğeleri üzerine etkileri, *Tarım Bilimleri Dergisi, Journal of Agricultural Science*, 15 (1), 43-52.

KAYDAN, D., YAĞMUR, M., 2007, Van ekolojik koşullarında bazı iki sıralı arpa çeşitlerinin (*Hordeum vulgare* L. conv. *distichon*) verim ve verim öğeleri üzerine bir araştırma, *Tarım Bilimleri Dergisi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 13 (3), 269-278.

KAZAZIAN, JR. H. H., 2004, Mobile elements: Drivers of genome evolution, *Science*, 303 (5664), 1626-1632.

KIEFER, J.C., 2007, Epigenetics in development, *Developmental Dynamics*, 236 (4), 1144-1156.

KLOECKENER-GRUISSEM, B., VOGEL, J.M. and FREELING, M., 1992, The TATA box promoter region of maize *Adh1* affects organ-specific expression, *The EMBO Journal*, 11 (1), 157-166.

KOORNNEEF, M., ALONSO-BLANCO, C., PEETERS, A.J.M., 1997, Genetic approaches in plant physiology, *New Phytologist*, 137, 1-8.

KUMAR, A. and BENNETZEN, J.L., 1999, Plant retrotransposons, *Annual Review of Genetics*, 33, 479-532.

LANDER, E.S., LINTON, L.M., BIRREN, B., NUSBAUM, C., ZODY, M.C., BALDWIN, J., DEVON, K., DEWAR, K., DOYLE, M., FITZHUGH, W., FUNKE, R., GAGE, D., HARRIS, K., HEAFORD, A., HOWLAND, J., KANN, L., LEHOCZKY, J., LEVINE, R., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., MELDRIM, J., MESIROV, J.P., MIRANDA, C., MORRIS, W., NAYLOR, J., RAYMOND, C., ROSETTI, M., SANTOS, R., SHERIDAN, A., SOUGNEZ, C., STANGE-THOMANN, N., STOJANOVIC, N., SUBRAMANIAN, A., WYMAN, D., ROGERS, J., SULSTON, J., AINSCOUGH, R., BECK, S., BENTLEY, D., BURTON, J., CLEE, C., CARTER, N., COULSON, A., DEADMAN, R., DELOUKAS, P., DUNHAM, A., DUNHAM, I., DURBIN, R., FRENCH, L., GRAFHAM, D., GREGORY, S., HUBBARD, T., HUMPHRAY, S., HUNT, A., JONES, M., LLOYD, C., MCMURRAY, A., MATTHEWS, L., MERCER, S., MILNE, S., MULLIKIN, J.C., MUNGALL, A., PLUMB, R., ROSS, M., SHOWNKEEN, R., SIMS, S., WATERSTON, R.H., WILSON, R.K., HILLIER, L.W., MCPHERSON, J.D., MARRA, M.A., MARDIS, E.R., FULTON, L.A., CHINWALLA, A.T., PEPIN, K.H., GISH, W.R., CHISSOE, S.L., WENDL, M.C., DELEHAUNTY, K.D., MINER, T.L., DELEHAUNTY, A., KRAMER, J.B., COOK, L.L., FULTON, R.S., JOHNSON, D.L., MINX, P.J., CLIFTON, S.W., HAWKINS, T., BRANSCOMB, E., PREDKI, P., RICHARDSON, P., WENNING, S., SLEZAK, T., DOGGETT, N., CHENG, J.F., OLSEN, A., LUCAS, S., ELKIN, C., UBERBACHER, E., FRAZIER, M., GIBBS, R.A., MUZNY, D.M., SCHERER, S.E., BOUCK, J.B., SODERGREN, E.J., WORLEY, K.C., RIVES, C.M., GORRELL, J.H., METZKER, M.L., NAYLOR, S.L., KUCHERLAPATI, R.S., NELSON, D.L., WEINSTOCK, G.M., SAKAKI, Y., FUJIYAMA, A., HATTORI, M., YADA, T., TOYODA, A., ITOH, T., KAWAGOE, C., WATANABE, H., TOTOKI, Y., TAYLOR, T.,

WEISSENBAACH, J., HEILIG, R., SAURIN, W., ARTIGUENAVE, F., BROTTIER, P., BRULS, T., PELLETIER, E., ROBERT, C., WINCKER, P., SMITH, D.R., DOUCETTE-STAMM, L., RUBENFIELD, M., WEINSTOCK, K., LEE, H.M., DUBOIS, J., ROSENTHAL, A., PLATZER, M., NYAKATURA, G., TAUDIEN, S., RUMP, A., YANG, H., YU, J., WANG, J., HUANG, G., GU, J., HOOD, L., ROWEN, L., MADAN, A., QIN, S., DAVIS, R.W., FEDERSPIEL, N.A., ABOLA, A.P., PROCTOR, M.J., MYERS, R.M., SCHMUTZ, J., DICKSON, M., GRIMWOOD, J., COX, D.R., OLSON, M.V., KAUL, R., RAYMOND, C., SHIMIZU, N., KAWASAKI, K., MINOSHIMA, S., EVANS, G.A., ATHANASIOU, M., SCHULTZ, R., ROE, B.A., CHEN, F., PAN, H., RAMSER, J., LEHRACH, H., REINHARDT, R., MCCOMBIE, W.R., DE, L.A., BASTIDE, M., DEDHIA, N., BLÖCKER, H., HORNISCHER, K., NORDSIEK, G., AGARWALA, R., ARAVIND, L., BAILEY, J.A., BATEMAN, A., BATZOGLOU, S., BIRNEY, E., BORK, P., BROWN, D.G., BURGE, C.B., CERUTTI, L., CHEN, H.C., CHURCH, D., CLAMP, M., COPLEY, R.R., DOERKS, T., EDDY, S.R., EICHLER, E.E., FUREY, T.S., GALAGAN, J., GILBERT, J.G., HARMON, C., HAYASHIZAKI, Y., HAUSSLER, D., HERMJAKOB, H., HOKAMP, K., JANG, W., JOHNSON, L.S., JONES, T.A., KASIF, S., KASPRYZK, A., KENNEDY, S., KENT, W.J., KITTS, P., KOONIN, E.V., KORF, I., KULP, D., LANCET, D., LOWE, T.M., MCLYSAGHT, A., MIKKELSEN, T., MORAN, J.V., MULDER, N., POLLARA, V.J., PONTING, C.P., SCHULER, G., SCHULTZ, J., SLATER, G., SMIT, A.F., STUPKA, E., SZUSTAKOWSKI, J., THIERRY-MIEG, D., THIERRY-MIEG, J., WAGNER, L., WALLIS, J., WHEELER, R., WILLIAMS, A., WOLF, Y.I., WOLFE, K.H., YANG, S.P., YEH, R.F., COLLINS, F., GUYER, M.S., PETERSON, J., FELSENFELD, A., WETTERSTRAND, K.A., PATRINOS, A., MORGAN, M.J., DE JONG, P., CATANESE, J.J., OSOEGAWA, K., SHIZUYA, H., CHOI, S., CHEN, Y.J., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome, *Nature*, 409, 860-921.

LEIGH, F., KALENDAR, R., LEA, V., LEE, D., DONINI, P. and SCHULMAN, A.H., 2003, Comparison of the utility of barley retrotransposon families for genetic analysis by molecular marker techniques, *Molecular Genetics and Genomics*, 269 (4), 464-474.

LERAT, E., 2009, Identifying repeats and transposable elements in sequenced genomes: How to find your way through the dense forest of programs, *Heredity*, 104, 520-523.

LE ROUZIC, A., BOUTIN, T.S. and CAPY, P., 2007, Long-term evolution of transposable elements, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19375-19380.

LI, X-Q, 2009, Developmental and environmental variation in genomes, *Heredity*, 102, 323-329.

LI, H., FREELING, M., LISCH, D., 2010, Epigenetic reprogramming during vegetative phase change in maize, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (51), 22184-22189.

- LIPPMAN, Z., GENDREL, A.V., BLACK, M., VAUGHN, M.W., DEDHIA, N., McCOMBIE, W.R., LAVINE, K., MITTAL, V., MAY, B., KASSCHAU, K.D., CARRINGTON, J.C., DOERGE, R.W., COLOT, V. and MARTIENSSEN, R., 2004, Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control, *Nature*, 430, 471-476.
- LIPPMAN, Z. and MARTIENSSEN, R., 2004, The role of RNA interference in heterochromatic silencing, *Nature*, 431, 364-370.
- LIU, J.Y., SHE, C.W., HU, Z.L., XIONG, Z.Y., LIU, L.H. and SONG, Y.C., 2004, A new chromosome fluorescence banding technique combining DAPI staining with image analysis in plants, *Chromosoma*, 113, 16-21.
- LLORENS, C., MUNOZ-POMER, A., BERNAD, L., BOTELLA, H. and MOYA, A., 2009, Network dynamics of eukaryotic LTR retroelements beyond phylogenetic trees, *Biology Direct*, 4, 41.
- LÜLECİ, G., BAŞARAN, S., BAĞCI, G., KESER, I., 1990, *Sitogenetik uygulama yöntemleri*, Meteksan A.Ş.
- MADLUNG, A., COMAI, L., 2004, The effect of stress on genome regulation and structure, *Annals of Botany*, 94 (4), 481-495.
- MANEY, T., GINKEL, L.M., HUNTER, A.W., WORDEMAN, L., 1999, The kinetochore of higher eucaryotes: A molecular view, *International Review of Cytology*, 194, 67-131.
- MANNINEN, I. and SCHULMAN, A.H., 1993, *BARE-1*, a *copia*-like retroelement in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Plant Molecular Biology*, 22 (5), 829-846.
- MANSOUR, A., 2007, Epigenetic activation of genomic retrotransposons, *Journal of Cell and Molecular Biology*, 6 (2), 99-107.
- MARCO, A. and MARIN, I., 2005, Retrovirus-like elements in plants, *Recent Research Development Plant Sciences*, 3, 15-24.
- MARTIN, C., ZHANG, Y., 2007, Mechanisms of epigenetic inheritance, *Current Opinion in Cell Biology*, 19 (3), 266-272.
- MARTIENSSEN, R.A. and COLOT, V., 2001, DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi, *Science*, 293, 1070-1074.
- MATTICK, J.S., 2012, RNA driving the epigenetic bus, *The EMBO Journal*, 31, 515-516.
- MAY, B.P., LIPPMAN, Z.B., FANG, Y., SPECTOR, D.L., MARTIENSSEN, R.A., 2005, Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats, *Plos Genetics*, 1(6), e79.

MAYER, K.F.X., MARTIS, M., HEDLEY, P.E., SIMKOVA, H., LIU, H., MORRIS, J.A., STEUERNAGEL, B., TAUDIEN, S., ROESSNER, S., GUNDLACH, H., KUBALAKOVA, M., SUCHANKOVA, P., MURAT, F., FELDER, M., NUSSBAUMER, T., GRANER, A., SALSE, J., ENDO, T., SAKAI, H., TANAKA, T., ITOH, T., SATO, K., PLATZER, M., MATSUMOTO, T., SCHOLZ, U., DOLEZEL, J., WAUGH, R., and STEIN, N., 2011, Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics, *The Plant Cell*, 23, 1249-1263.

McCLINTOCK, B., 1950, The origin and behavior of mutable loci in maize, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36 (6), 344-355.

McCLINTOCK, B., 1953, Induction of instability at selected loci in maize, *Genetics*, 38 (6), 579-599.

McCLINTOCK, B., 1956, Controlling elements and the gene, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21, 197-216.

McCUE, A.D., NUTHIKATTU, S., REEDER, S.H., SLOTKIN, R.K., 2012, Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA, *Plos Genetics* 8 (2), e1002474.

McGINNIS, S. and MADDEN, T. L., 2004, BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 32, W20-W25.

MILAN, B., 1959, *Electrophoresis, theory, methods and applications*, third edition, Academic press, New York, 225, 59-7676.

MINKOVSKY, A., PATEL, S., PLATH, K., 2012, Concise review: Pluripotency and the transcriptional inactivation of the female mammalian X chromosome, *Stem Cells*, 30, 48-54.

MOORE, J.H., 2007, Bioinformatics, *Journal Of Cellular Physiology*, 213 (2), 365-369.

MOORHEAD, P.S., NOWELL, P.C., MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M., HUNGERFORD, D.A., 1960, Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood, *Experimental Cell Research*, 20 (3), 613-616.

MORAN, J.V. and MALIK, H.S., 2009, Diamonds and rust: How transposable elements influence mammalian genomes, *European Molecular Biology Organization Reports*, 10, 1306-1310.

MOSCONE, E.A., MATZKE, M.A. and MATZKE, A.J.M., 1996, The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco, *Chromosoma*, 105, 231-236.

MUOTRI, A.R., CHU, V.T., MARCHETTO, M.C.N., DENG, W., MORAN, J.V. and GAGE, F.H., 2005, Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition, *Nature*, 435, 903-910.

- OKOMATO, H., HIROCHIKA, H., 2001, Silencing of transposable elements in Plants, *Trends in Plant Science*, 6 (11), 527-534.
- PAGNOTTA, M.A., MONDINI, L. and PORCEDDU, E., 2009, Quantification and organization of *WIS2-1A* and *BARE-1* retrotransposons in different genomes of *Triticum* and *Aegilops Species*, *Molecular Genetics and Genomics*, 282, 245-255.
- PARDUE, M.L. and GALL, J.G., 1970, Chromosomal localization of mouse satellite DNA, *Science*, 168, 1356-1358.
- PARIS CONFERENCE, 1971, Standardization in human cytogenetics, Birth defects: Original Article Series, 8: 7, *The National Foundation*.
- PAULSON, K.E., MATERA, A.G., DEKA, N and SCHMID, C.W., 1987, Transcription of a human transposon-like sequence is usually directed by other promoters, *Nucleic Acids Research*, 15 (13), 5199-5215.
- PEARCE, S.R., HARRISON, G., LI, D., HESLOP-HARRISON, J.S., KUMAR, A., AND FLAVELL, A.J., 1996, The *Ty1-Copia* group of retrotransposons in *Vicia* species: copy number, sequence heterogeneity and chromosomal localisation, *Molecular and General Genetics*, 205, 305-315.
- PETERS, A.H.F.M., O'CARROLL, D., SCHERTHAN, H., MECHTLER, K., SAUER, S., SCHOFER, C., WEIPOLTSHAMMER, K., PAGANI, M., LACHNER, M., KOHLMAIER, A., OPRAVIL, S., DOYLE, M., SIBILIA, M., JENUWEIN, T., 2001, Loss of the *Suv39h* histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability, *Cell*, 107 (3), 323-337.
- PIDOUX, A.L. and ALLSHIRE, R.C., 2005, The role of heterochromatin in centromere function, *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 360, 569-579.
- POULTER, R.T.M., GOODWIN, T.J.D., 2005, DIRS-1 and the other tyrosine recombinase retrotransposons, *Cytogenetic and Genome Research*, 110, 575-588.
- POURKHEIRANDISH, M. and KOMATSUDA, T., 2007, The importance of barley genetics and domestication in a global perspective, *Annals of Botany*, 100 (5), 999-1008.
- RAMAGE, R.T., 1985, *Cytogenetics*, In: *Barley* (Agronomy Monograph No.26), Ed: RASMUSSEN, D.C., ASA-CSSA-SSSA, Madison, Wisconsin, 127-154.
- RAMAKRISHNA, W., DUBCOVSKY, J., PARK, Y-J., BUSO, C., EMBERTON, J., SANMIGUEL, P. and BENNETZEN, J.L., 2002, Different types and rates of genome evolution detected by comparative sequence analysis of orthologous segments from four cereal genomes, *Genetics*, 162 (3), 1389-1400.

ROBERTS, A.P., CHANDLER, M., COURVALIN, P., GUEDON, G., MULLANY, P., PEMBROKE, T., ROOD, J.I., SMITH, J., SUMMERS, A.O., TSUDA, M., BERG, D.E., 2008, Revised nomenclature for transposable genetic elements, *Plasmid*, 60 (3), 167-173.

ROBERTSON, K.D., 2005, DNA methylation and human disease, *Nature Reviews Genetics*, 6, 597-610.

RODRIGUEZ, M., O'SULLIVAN, D., DONINI, P., PAPA, R., CHIAPPARINO, E., LEIGH, F. and ATTENE, G., 2006, Integration of retrotransposons-based markers in a linkage map of barley, *Molecular Breeding*, 17, 173-184.

ROSENWEIG, B., LIAO, L.W. and HIRSH, D., 1983, Target sequences for the *C.elegans* transposable element Tc1, *Nucleic Acids Research*, 11 (20), 7137-7140.

RUBIN, G.M., KIDWELL, M.G., BINGHAM, P.M., 1982, The molecular basis of P-M hybrid dysgenesis: The nature of induced mutations, *Cell*, 29, 987-994.

SABOT, F. and SCHULMAN, A.H., 2006, Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: A hitchhiker's guide to the genome, *Heredity*, 97, 381-388.

SAISHO, D. and PURUGGANAN, M.D., 2007, Molecular phylogeography of domesticated barley traces expansion of agriculture in the old world, *Genetics*, 177, 1765-1776.

SANMIGUEL, P., TIKHONOV, A., JIN, Y-K., MOTCHOULSKAIA, N., ZAKHAROV, D., MELAKE-BERHAN, A., SPRINGER, P.S., EDWARDS, K.J., LEE, M., AVRAMOVA, Z., BENNETZEN, J.L., 1996, Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome, *Science*, 274, 765-768.

SCHULMAN, A.H., FLAVELL, A.J. and ELLIS, T.H.N., 2004, The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants, *Methods in Molecular Biology*, 260, 145-173.

SCHULMAN, A.H., KALENDAR, R., 2005, A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics, *Cytogenetic and Genome Research*, 110, 598-605.

SCHULTE, D., CLOSE, T.J., GRANER, A.G., LANGRIDGE, P., MATSUMOTO, T., MUEHLBAUER, G., SATO, K., SCHULMAN, A.H., WAUGH, R., WISE, R.P. and STEIN, N., 2009, The international barley sequencing consortium-At the threshold of efficient access to the barley genome, *Plant Physiology*, 149, 142-147.

SCHULTEN, H-J., GUNAWAN, B., OTTO, F., HASSMANN, R., HALLERMANN, C., NOEBEL, A., FUZESI, L., 2002, Cytogenetic characterization of complex karyotypes in seven established melanoma cell lines by multiplex fluorescence in situ hybridization and DAPI banding, *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 133 (2), 134-141.

SHIRASU, K., SCHULMAN, A.H., LAHAYE, T. and SCHULZE-LEFERT, P., 2000, A contiguous 66-kb barley DNA sequence provides evidence for reversible genome expansion, *Genome Research*, 10, 908-915.

SINGH, R.J., 2006, *Utilization of Genetic Resources for Barley Improvement*, Ed: SINGH, R.J. and JAUHAR, P.P., Genetic resources, *Chromosome Engineering, and Crop Improvement*, 2, 233-255.

SLOTKIN, R.K. and MARTIENSSEN, R., 2007, Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome, *Nature Reviews Genetics*, 8, 272-285.

SMIT, A.F. and RIGGS, A.D., 1996, Tiggers and DNA transposon fossils in the human genome, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1443-1448.

SPINNER, N.B., EUNPU, D.L., SCHMICKEL, R.D., ZACKAI, E.H., McELDREW, D., BUNIN, G.R., McDERMID, H. and EMANUEL, B.S., 1989, The Role of cytologic NOR variants in the etiology of Trisomi 21, *The American Journal of Human Genetics*, 44 (5), 631-638.

SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., ARNA, T. and SCHULMAN, A. H., 1996a, Retrotransposon *BARE-1* is a major, dispersed component of the barley (*Hordeum vulgare* L.) genome, *Plant Molecular Biology*, 30, 1321-1329.

SUONIEMI, A., NARVANTO, A. and SCHULMAN, A. H., 1996b, The *BARE-1* retrotransposon is transcribed in barley from an LTR promoter active in transient assays, *Plant Molecular Biology*, 31 (2), 295-306.

SUONIEMI, A., SCHMIDT, D. and SCHULMAN, A.H., 1997, *BARE-1* insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites, *Genetica*, 100, 219-230.

SZABO, M., KISS, J., OLASZ, F., 2010, Functional organization of the inverted repeats of IS30, *Journal of Bacteriology*, 192, 3414-3423.

SZYF, M., 2005, DNA methylation and demethylation as targets for anticancer therapy, *Biochemistry (Moscow)*, 70, 533-549.

TANSKANEN, J.A., SABOT, F., VICIENT, C., SCHULMAN, A.H., 2007, Life without GAG: The *BARE-2* retrotransposon as a parasite's parasite, *Gene*, 390, 166-174.

THORNBURG, B.G., GOTEA, V., MAKALOWSKI, W., 2005, Transposable elements as a significant source of transcription regulating signals, *Gene*, 365, 104-110.

VAN OOSTEROM, E.J., CECCARELLI, S. and PEACOCK, J.M., 1993, Yield response of barley to rainfall and temperature in mediterranean environments, *The Journal of Agricultural Science*, 121, 307-313.

- VAN VLIET, J., OATES, N.A. and WHITELOW, E., 2007, Epigenetic mechanisms in the context of complex diseases, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1531-1538.
- VANYUSHIN, B.F., MAZIN, A.L., VASILIEV, V.K., BELOZERSKY, A.N., 1973, The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 299 (3), 397-403.
- VANYUSHIN, B.F., KIRNOS, M.D., 1988, DNA methylation in plants, *Gene*, 74, 117-121.
- VENNER, S., FESCHOTTE, C. and BIEMONT, C., 2009, Dynamics of transposable elements: Towards a community ecology of the genome, *Trends in Genetics*, 25 (7), 317-323.
- VERMA, R.S. and LUBS, H.A., 1975, A simple R banding Technic, *American Journal of Human Genetics*, 27 (1), 110-117.
- VICIENT, C.M., SUONIEMI, A., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., TANSKANEN, J., BEHARAV, A., NEVO, E. and SCHULMAN, A.H., 1999a, Retrotransposon *BARE-1* and its role in genome evolution in the genus *Hordeum*, *The Plant Cell*, 11, 1769-1784.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R., ANAMTHAWAT-JONSSON, K., SUONIEMI, A. and SCHULMAN, A.H., 1999b, Structure, functionality and evolution of the *BARE-1* retrotransposon of barley, *Genetica*, 107, 53-63.
- VICIENT, C.M., JAASKELAINEN, M.J., KALENDAR, R. and SCHULMAN, A.H., 2001a, Active retrotransposon are a common feature of grass genomes, *Plant Physiology*, 125, 1283-1292.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R. and SCHULMAN, A.H., 2001b, *Envelope*-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants, *Genome Research*, 11, 2041-2049.
- VICIENT, C.M., KALENDAR, R. and SCHULMAN, A.H., 2005, Variability, recombination and mosaic evolution of barley *BARE-1* retrotransposon, *Journal of Molecular Evolution*, 61, 275-291.
- VON BOTHMER, R., JACOBSEN, N., BADEN, C., JORGENSEN, R.B., LINDELAURSEN, I., 1995, *An ecogeographical study of the genus Hordeum*, 2nd ed., systematic and ecogeographic studies on crop genepools 7. International plant genetic resources institute, Roma, 929-0432-292.
- VOYTAS, D.F., BOEKE, J.D., 2002, *Ty1* and *Ty5* of *Saccharomyces cerevisiae*, In *Mobile DNA II*. Edited by CRAIG, N.L., CRAIGIE, R., GELLERT, M., LAMBOWITZ, A.L., Washington DC: ASM Press; 631-662.
- VUKICH, M., GIORDANI, T., NATALI, T. and CAVALLINI, A., 2009, *Copia* and *gypsy* retrotransposons activity in sunflower (*Helianthus annuus* L.), *BMC Plant Biology*, 9, 150.

WALDEYER, W., 1888, Ueber karyokinese und ihre beziehungen zu den befruchtungsvorgängen, *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*, 32 (1), 1-122.

WAUGH, R., McLEAN, K., FLAVELL, A. J., PEARCE, S. R., KUMAR, A., THOMAS, B. B. T. , POWELL, W., 1997, Genetic distribution of *BARE-1* like retrotransposable elements in the barley genome revealed by Sequence-Specific Amplification Polymorphism (S-SAP), *Molecular and General Genetics*, 253 (6), 687-694.

WEIL, C., MARTIENSSEN, R., 2008, Epigenetic interactions between transposons and genes: Lessons from plants, *Current Opinion in Genetics and Development*, 18 (2), 188-192.

WESSLER, S.R., 2006, Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 103, 17600-17601.

WESSLER, S.R., 2009, *The Implicit Genome* [online], Eukaryotic transposable elements: teaching old genomes new tricks, http://www.plantbio.uga.edu/wesslerlab/The_Implicit_Genome.pdf [Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2012].

WESSLER, S., MICKLOS, D., 2009, *YouTube – Cold Spring Harbor Laboratory's Dolan DNA Learning Center* [online], Jumping Gene Caught in the Act, <http://www.youtube.com/user/DNALearningCenter#p/f/4/9MPiRx3SPMM> [Ziyaret Tarihi: 16 Şubat 2012].

WICKER, T., GUYOT, R., YAHIAOUI, N. and KELLER, B., 2003, CACTA transposons in *Triticeae*. A diverse family of high-copy repetitive elements, *Plant Physiology*, 132, 52-63.

WICKER, T., SABOT, F., HUA-VAN, A., BENNETZEN, J.L., CAPY, P., CHALHOUB, B., FLAVELL, A., LEROY, P., MORGANTE, M., PANAUND, O., PAUX, E., SANMIGUEL, P. and SCHULMAN, A.H., 2007, A unified classified classification system for eukaryotic transposable elements, *Nature Reviews Genetics*, 8, 973-982.

WICKER, T., TAUDIEN, S., HOUBEN, A., KELLER, B., GRANER, A., PLATZER, M., STEIN, N., 2009, A whole-genome snapshot of 454 sequences exposes the composition of the barley genome and provides evidence for parallel evolution of genome size in wheat and barley, *The Plant Journal*, 59 (5), 712-722.

WITTE, C-P., LE, Q.H., BUREAU, T., and KUMAR, A., 2001, Terminal-Repeat Retrotransposons in Miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (24), 13778-13783.

WOESE, C.R., KANDLER, O. and WHEELIS, M.L., 1990, Towards a natural system of organisms: Proposals for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.

WONG, T-W., McCUTCHAN, T., KOHLI, J., and SOLL, D., 1979, The nucleotide sequence of the major glutamate transfer RNA from *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Research*, 6 (6), 2057-2068.

WRIGHT, D.A., VOYTAS, D.F., 2002, *Athila4* of *Arabidopsis* and *Calypso* of soybean define a lineage of endogenous plant retroviruses, *Genome Research*, 12, 122-131.

YARRINGTON, R.M., RICHARDSON, S.M., HUANG, C.R. and BOEKE, J.D., 2012, Novel transcript truncating function of Rap1p revealed by synthetic codon-optimized Ty1 retrotransposon, *Genetics*, 90 (2), 523-535.

YODER, J.A., WALSH, C.P., BESTOR, T.H., 1997, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites, *Trends in Genetics*, 13 (8), 335-340.

YUNIS, J.J., ROLDAN, L., YASMINEH, W.G. and LEE, J.C., 1971, Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes, *Nature*, 231, 532-533.

ZEIN, I., JAWHAR, M., ARABI, M.I.E., 2010, Efficiency of IRAP and its-RFLP marker systems in accessing genetic variation of *Pyrenophora graminea*, *Genetics and Molecular Biology*, 33 (2), 328-332.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi Bahçelievler Fikret Yüzatlı İlköğretim Okulu'nda, orta öğrenimimi Güngören Atatürk İlköğretim Okulu'nda ve lise öğrenimimi Bahçelievler Kemal Hasoğlu Lisesi'nde tamamladım. 2004 yılında başladığım Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Biyoloji Bölümünden 2009 yılında mezun oldum. 2010 yılında İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programındaki yüksek lisans eğitimime Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI danışmanlığında başladım.

2011 yılında Yükseköğretim Kurulu'nun açmış olduğu ÖYP kapsamında, Amasya Üniversitesi, Fen – Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ne Araştırma Görevlisi olarak atandım. Aynı yılın Haziran ayında, İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda 35. madde ile görevlendirildim.