

154188

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GTP BAĞLAYICI PROTEİNLERDEN ARF1 VE SAR1'İN
Medicago truncatula BİTKİ TÜRÜNDE İNCELENMESİ

Biyolog Esra YÜCA

FBE Biyoloji Anabilim Dalı'nda
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nezhun GÖREN (YTÜ)
İkinci Tez Danışmanı : Prof.Dr. Abdülrezzak MEMON (TÜBİTAK-GMBAE)

Prof. Dr. Güler Tunçhan
E. Memon

Prof. Dr. Nezhun Gören
M. J. P.

Prof. Dr. A. R. Memon
E. Memon

İSTANBUL, 2004

Prof. Dr. S. K. ARİ
S. K. ARİ

Doç. Dr. Nazlı Arda
Nazlı Arda

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMA LİSTESİ	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÇİZELGE LİSTESİ	viii
ÖNSÖZ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ	3
2.1 Hücre İçi Vesikül Trafığı	3
2.2 Kalatrin Örtülü Vesiküller	3
2.3 COP (Coat Protein) Örtülü Vesiküller	4
2.3.1 COPI Örtülü Vesiküller	5
2.3.1.1 ARF1 (ADP Ribozilasyon Faktör).....	6
2.3.1.2 Katamer	8
2.3.1.3 Guanin Nükleotid Değiştirme Faktörü (GEF)	8
2.3.1.4 GTPaz Aktivasyon Proteinin (GAP).....	9
2.3.2 COPII Örtülü Vesiküller	9
2.3.2.1 SAR (“Secretion Associated Ras”) 1	10
2.3.2.2 Sec12.....	12
2.3.2.3 Sec23/24 ve Sec13/31 Protein Kompleksleri.....	12
2.4 Vesiküllerin Hedef Membranla Füzyonu.....	12
2.5 Bitkilerde COP Örtülü Vesiküller.....	13
2.6 <i>Medicago truncatula</i> Bitkisi	14
2.7 Baklagillerde Azot Fiske Edici Kök Nodüllerinin Gelişimi	15
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1 Materyal	18
3.1.1 Bitki Materyali	18
3.1.2 <i>Rhizobium</i> Bakterisi İçeren Toprak Örneği	18
3.1.3 Kullanılan Solüsyonlar.....	18
3.1.3.1 Hoagland Solüsyonu (Gatz, 1995).....	18
3.1.3.2 Protein Özütleme Tamponu	20
3.1.3.3 Protein Konsantrasyonu Belirlemede Kullanılan Solüsyonlar:	21

3.1.3.4	SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Jel Hazırlama, Yükleme ve Yürütme Solüsyonları	22
3.1.3.5	Transfer ve İmmunolojik Belirleme Solüsyonları	23
3.2	Metod	24
3.2.1	Bitkilerin Ekimi, Yetiştirilmesi ve Hasat Edilmesi.....	24
3.2.1.1	Tohum Yüzey Sterilizasyonu.....	24
3.2.1.2	Bitki Ekim ve Yetiştirme Koşulları	24
3.2.1.3	Hasat İşlemi	25
3.2.2	<i>Medicago truncatula</i> Bitkisinin Farklı Kısımlarından Protein Özütleme İşlemi...26	
3.2.3	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	28
3.2.4	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE).....	28
3.2.4.1	SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması	29
3.2.4.2	Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi	30
3.2.4.3	SDS-PAGE Jelinin Boyanması.....	30
3.2.4.4	SDS-PAGE Jellerinin Kurutulması.....	31
3.2.5	Western Blot	32
3.2.6	İmmünolojik Belirleme.....	32
4.	BULGULAR.....	35
4.1	Bitki Ekim Koşullarının Belirlenmesi	35
4.2	Farklı Farksiyonlara Ait Örneklerin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi .35	
4.3	<i>Medicago truncatula</i> 'da ARF1 ve SAR1 Proteinlerinin Nodülasyona Bağlı ve Farklı Bitki Kısımlarındaki Düzeylerinin İncelenmesi.....	38
4.3.1	2.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	38
4.3.1.1	2.5 Aylık Bitkilere Ait Toplam Homojenat Örnekleri ile Yapılan Çalışma	38
4.3.1.2	2.5 Ay Bitkilere Ait 13000 Pellet Örnekleri ile Yapılan Çalışma	41
4.3.1.3	2.5 Aylık Bitkilerin Yaprak ve Kök Kısımlarına Ait Süpernatant ve Pellet Örneklerinin Karşılaştırılması.....	43
4.3.2	3.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	44
4.3.2.1	3.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	44
4.3.2.2	3.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Kök ve Nodül Kısımları ile Nodülsüz Bitkilerin Kök Kısımlarındaki SAR1 Düzeylerinin Karşılaştırılması	46
4.3.2.3	3.5 Aylık Nodüllü ve Nodülsüz Bitkilerin Gövde Kısımlarından Elde Edilen 100000 ve 250000 g Örneklerinde SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi.....	47
4.3.3	6.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	48
4.3.3.1	6.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin Toplam Homojenat Örneklerinde İncelenmesi	48
4.3.3.2	6.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin 13000 g Süpernatant ve Pellet Örneklerinde İncelenmesi	50
4.4	<i>Medicago truncatula</i> 'da Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Proteinlerinin Düzeylerinin İncelenmesi	53
4.4.1	Kök Kısımında Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	53
4.4.2	Gövde Kısımında Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	55
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	57

5.1	<i>Medicago truncatula</i> 'da Nodül Oluşumunun ARF1 ve SAR1 Düzeylerine Etkisi	57
5.2	<i>Medicago truncatula</i> 'da Farklı Bitki Kısımlarında ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	58
5.3	<i>Medicago truncatula</i> 'da Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi	59
KAYNAKLAR		61



KISALTMA LİSTESİ

AP	Adaptör Protein Kompleksi
ARF1	ADP Ribozilasyon Faktör 1
ARF1-GDP	ARF1'in GDP bağlı formu
ARF1-GTP	ARF1'in GTP bağlı formu
BFA	Brefeldin A
COP	"Coat Protein"
ER	Endoplazmik Retikulum
GAP	GTPaz Aktivasyon Proteini
GEF	Guanin Nükleotid Değişirme Faktörü
Pell	Pellet
SAR1	"Secretion Associated Ras 1"
Spn	Süpernatant
T.H.	Toplam Homojenat



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 ARF1'in Golgi membranına toplanmasında öne sürülen model.	6
Şekil 2.2 ER membranında COPII örtü oluşumunun düzenlenmesi	11
Şekil 2.3 Çalışmada kullanılmak üzere, kontrollü koşullar altında yetistirilmiş olan 3.5 aylık <i>Medicago truncatula</i>	15
Şekil 2.4 Yoncada kök nodüllerinin gelişimi (Yentür,1995).	17
Şekil 3.1 Çalışmada kullanılmak üzere yetiştirilmiş olan 5. aydaki <i>Medicago truncatula</i> 'da legümen yapısı.	25
Şekil 3.2 Hasat işleminden önce görüntülenmiş olan 3.5 aylık <i>Medicago truncatula</i>	26
Şekil 3.3 Bitki kısımlarından elde edilen Toplam Homojenat örneklerinin fraksiyonlara ayrılması.	27
Şekil 3.4 İmmünojik belirleme yöntemi (Amersham Biosciences, 2002).	33
Şekil 4.1 BSA standartlarının 595 nm'de verdikleri absorbands değerlerine göre çizilen kalibrasyon eğrisi.	36
Şekil 4.2 <i>M. truncatula</i> 'dan 2.5 ay sonunda nodüllü ve nodülsüz bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama işleminin uygulandığı jel	39
Şekil 4.3 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay, Toplam Homojenat örnekleri için SAR1 antikoru kullanılarak gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	40
Şekil 4.4 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay, Toplam Homojenat örnekleri için ARF1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	40
Şekil 4.5 <i>M. truncatula</i> 'dan 2.5 ay sonunda nodüllü ve nodülsüz bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama işlemi uygulanan jel.	41
Şekil 4.6 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay, 13000 g pellet örnekleri için SAR1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	42
Şekil 4.7 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay, 13000 g pellet örnekleri için ARF1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	42
Şekil 4.8 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri için ARF1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	43
Şekil 4.9 <i>M. truncatula</i> 2.5 ay 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri için SAR1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünojik belirlemenin sonucu.	43
Şekil 4.10 <i>M. truncatula</i> 'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda Commasie boyama işleminin uygulandığı jel.	44
Şekil 4.11 <i>M. truncatula</i> 'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin immünojik belirleme sonucu ARF1 ve SAR1 düzeylerindeki farklar.	45
Şekil 4.12 <i>M. truncatula</i> 'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait 13000 g pellet örneklerinin immünojik belirleme sonucu.	45
Şekil 4.13 3.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın nodül, kök ve nodülsüz bitkiden elde edilen kök kısımlarına ait 250000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda Commasie boyama işleminin uygulandığı jel (N+: Nodüllü bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı).	46
Şekil 4.14 <i>M. truncatula</i> 'da 3.5 aylık nodüllü bitkiden nodül, kök ve nodülsüz bitkiden elde edilen kök kısımlarına ait 250000 g pellet örneklerinin SAR1 düzeylerindeki farklar (N+: Nodüllü bitki den elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı).	46
Şekil 4.15 3.5 aylık nodüllü ve nodülsüz <i>M. truncatula</i> 'nın gövde kısımlarına ait 100000 ve	

	250000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulandığı jel	47
Şekil 4.16	3.5 aylık nodüllü ve nodülsüz <i>M. truncatula</i> 'nın gövde kısımlarına ait 100000 ve 250000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SAR1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile analizi	48
Şekil 4.17	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök, nodül, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat Örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulanması ile elde edilen görüntü.....	49
Şekil 4.18	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın nodül, kök, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SAR1 protein düzeylerinin immünolojik belirleme ile analizi.	49
Şekil 4.19	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın nodül, kök, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin ARF1 protein düzeylerinin immünolojik belirleme ile analizi.	49
Şekil 4.20	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök, nodül, gövde ve yaprak kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulanması ile elde edilen görüntü.....	50
Şekil 4.21	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde SAR1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.	51
Şekil 4.22	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde ARF1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.	51
Şekil 4.23	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde SAR1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.	52
Şekil 4.24	6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde ARF1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.	52
Şekil 4.25	2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın köklerinde Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama uygulaması ile elde edilen görüntü	53
Şekil 4.26	Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın köklerinde SAR1 düzeylerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.27	Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın köklerinde ARF1 düzeylerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.28	2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın gövde kısımlarında Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama uygulaması ile elde edilen görüntü	55
Şekil 4.29	Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın gövde kısımlarında SAR1 düzeylerinin karşılaştırılması.	56
Şekil 4.30	Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık <i>M. truncatula</i> 'nın gövde kısımlarında ARF1 düzeylerinin karşılaştırılması.	56

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1 <i>Medicago truncatula</i> 'nın taksonomideki yeri.	14
Çizelge 3.1 Hoagland Solüsyonu İçeriği	19
Çizelge 3.2 Hoagland Solüsyonunda kullanılan Solüsyon III içeriği	19
Çizelge 3.3 Hoagland Solüsyonunda kullanılan Fe-EDTA içeriği	19
Çizelge 3.4 1 litre özütlemeye tamponu içeriği	21
Çizelge 3.5 <i>M. truncatula</i> 'nın hasat dönemleri ve bu dönemlerde bölümlere ayrılan bitki kısımları	26
Çizelge 3.6 Ayırma Jeli (%12 Akrilamid)	29
Çizelge 3.7 Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)	30
Çizelge 4.1 Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesinde kullanılan standart proteinlerin konsantrasyon ve 595 nm'de verdikleri absorpsiyon değerleri	35
Çizelge 4.2 <i>M. truncatula</i> yaprak, kök ve gövde örneklerinin toplam homojenat, 13000 g süpernatant ve pellet fraksiyonlarının 595 nm'deki absorbans değerleri ve konsantrasyonları.	37

ÖNSÖZ

Bana yaşamsal ve bilimsel alanda geniş deneyim kazandıran Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca tüm yardım ve destekleri ile her zaman yanımda olan ve iyi bir bilim insanı olma yolunda ışık tutan sayın hocam Prof. Dr. Nezhun Gören'e, özellikle içten teşekkürlerimi sunmak isterim.

Tez kapsamındaki deneylerin gerçekleştirildiği, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvarı imkanlarını ve bu tez konusu ile çalışmamı sağlayan, bizlerle bilimsel tecrübelerini paylaşan sayın hocam Prof. Dr. Abdülrezzak Memon'a,

Bilimsel yardım ve katkılarının yanında, manevi desteğini de her zaman hissettiğim ve kendisini tanımış olmaktan son derece mutluluk duyduğum sevgili Birsen Cevher Keskin'e,

En kararsız kaldığım anlarda bana yol gösteren, azmimin hiç sönmemesini sağlayan ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Şenay Vural Korkut ve Dr. Cemal Ün'e,

Deneyimlerini ve bir çok güzel anıyı benimle paylaşan, sevgili arkadaşlarım Emel Bıçakçı, Günseli Kurt ve Ürün Bayındır'a,

Yardımları için sevgili Çiğdem Metin'e,

TÜBİTAK GEMBAE'de yapmış olduğum çalışmalarım sırasındaki teknik yardımları için Ömer Kaçar'a,

Lisans öğrenimim boyunca edinmiş olduğum ve tez çalışmamda kullandığım temel Botanik bilgilerimde çok büyük payı olan sayın hocam Prof. Dr. Semahat Yentür'e,

Her zaman fikirlerime önem veren, gitmek istediğim yolda daima sevgi ve destekleri ile yanımda olan sevgili anneme ve sevgili babama teşekkür ederim.

ÖZET

Hücre içi salgı yolu Endoplazmik Retikulum (ER) ve Golgi ağını kapsar. Bu iki organel arasındaki taşıyım COP örtülü vesiküller aracılığı ile gerçekleştirilir. ARF1, COPI örtülü vesiküller tarafından Golgi keseciklerinden ER'a ve Golgi kesecikleri arasındaki geri yönlü taşıyımında önemli rol oynar. SAR1 COPII örtülü vesiküllerin oluşumuna katılır ve kargonun ER'dan Golgi keseciklerine taşıyımına aracılık eder. ARF1 ve SAR1 proteinlerinin bitki hücrelerindeki işlevleri ile ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Baklagil (*Leguminosae*) bitkileri ile yapılan moleküler biyoloji çalışmalarında model bitki olarak bilinen *Medicago truncatula* kullanıldı. *Medicago truncatula*'da farklı gelişim evrelerinde, farklı bitki kısımlarında ve nodül oluşumuna bağlı ARF1 ve SAR1 proteinlerinin düzeyleri incelendi. Farklı bitki kısımlarına ait protein örnekleri SDS-PAGE yöntemi ile ayrıştırılarak PVDF membrana aktarıldı. ARF1 ve SAR1 proteinlerinin incelenmesi immünolojik belirleme yöntemi ile gerçekleştirildi. İmmünolojik belirlemede *Arabidopsis thaliana* ARF1 ve SAR1 proteinlerine karşı geliştirilmiş olan antikorlar kullanıldı. SAR1 protein düzeyinin nodüllü köklerde nodülsüz olanlara göre daha yüksek olduğu belirlendi. *Rhizobium* kültürü bulunan toprakta yetiştirilmiş olan 2.5 aylık bitkilerin farklı kısımlarında yapılan incelemede köklerde SAR1 düzeyinin yaprak ve gövde kısımlarına oranla daha fazla olduğu saptandı. Bununla birlikte 3.5 aylık bitkilerin nodül ve kök kısımlarındaki SAR1 protein düzeyinin eşit olduğu belirlendi. Farklı gelişim evrelerinde, farklı bitki kısımlarında ve nodül gelişimine bağlı olarak ARF1 protein düzeyinde belirgin farklılıklar gözlenmedi. Bu çalışma *M. truncatula*'nın kök, gövde, yaprak ve nodül kısımlarında ARF1 ve SAR1 protein düzeylerindeki farklılıkları gösteren ilk araştırmadır.

Anahtar Kelimeler: *Medicago truncatula*, *Rhizobium*, vesiküler trafik, nodül oluşumu, ARF1, SAR1.

ABSTRACT

Secretory pathway involves Endoplasmic Reticulum (ER) and Golgi apparatus. COP coated vesicles mediate ER-Golgi transport. ARF1 plays an important role in the transport of cargo in COPI coated vesicles in retrograde transport from Golgi cisternae back to ER and retrograde transport between Golgi cisternae. SAR1 is a component of COPII coated vesicles and plays an important role in carrying cargo from ER to Golgi cisternae. Little is known about the ARF1 and SAR1 protein functions in plant cell.

In this study, we used Medicago truncatula known as a model leguminous plant in molecular biology studies. ARF1 and SAR1 protein levels are investigated in nodule formation, at different developmental stages and different plant parts of M. truncatula. Protein fractions from different parts of plant were isolated by different centrifugation steps. The protein samples were subjected to SDS-PAGE and were transferred on PVDF membrane. Immunoblotting was carried out with antibodies raised against ARF1 and SAR1 proteins from Arabidopsis thaliana. SAR1 protein level was higher in roots of nodulated plants compared to that of non nodulated ones. The SAR1 expression was high in roots compared to stems and leaves of the plants when grown for 2.5 months in Rhizobium treated soil. On contrary expression level of SAR1 in nodules and roots were found to be equal in 3.5 months old plants. Our data shows that, there is no difference in ARF1 expression level at different developmental stages in different parts of plant and also depend on nodulation. This study is a first report showing the differential expression of ARF1 and SAR1 in nodules, roots, shoots and leaves of M. truncatula.

Key Words: Medicago truncatula, Rhizobium, vesicular traffic, nodulation, ARF1, SAR1.

1. GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde tüm proteinlerin translasyonu sitosolde bulunan serbest ribozomlarda başlar. Bunlardan salgı proteinleri veya protein modifikasyonlarını gerçekleştirmek üzere, salgı yolunda yerleşik olarak kalacak olan proteinler, taşıdıkları belirli sinyal dizileri aracılığı ile Endoplazmik Retikulum (ER) lümenine yönlendirilirler (van Vliet vd., 2003). ER'a gelen proteinler, burada doğru şekilde katlanmalarının ardından en son hedeflerine taşınırlar. Salgı yolunun birbirini takip eden kompartmanları arasındaki ilişki, kargonun taşınımına aracılık eden vesiküller aracılığı ile gerçekleştirilir (Nickel ve Wieland, 1997). ER ve Golgi ağı arasındaki taşınım aracılığı eden vesiküllerin oluşumunda ARF1 ve SAR1 GTPaz'ları önemli rol alırlar. Maya ve memeli hücrelerinde ER ve Golgi ağı arasındaki vesikül aracılı taşınım ARF1 ve SAR1 proteinlerinin işlev gördüğü belirlenmiştir (Balch vd., 1992).

Bitkilerde ilk kez bir ARF proteininin varlığının saptandığı çalışmada, bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde ARF1 proteini tanımlanmıştır (Memon vd., 1993). Bitki hücrelerine yakın yapı benzerliğine sahip olan yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de insan ARF1'ine %90 benzerlik gösteren bir proteini kodlayan cDNA izole edilmiştir (Memon vd., 1995). Karnıbahar (*Brassica oleracea*) bitkisi hücrelerinde ARF1'in ER ve Golgi membranlarına toplandığı gösterilmiştir (Pimpl vd., 2000). *Arabidopsis*'de bulunan dokuz *Arf* geninden altısının, Sınıf I ARF'lara yüksek düzeyde amino asit dizi benzerliği gösteren ARF proteinlerini kodladığı belirlenmiştir (Jürgens ve Geldner, 2002). SAR1'e homoloji gösteren işlevsel bitki genleri izole edilmiştir (Aniento vd., 2003).

Yapılmış olan tüm bu çalışmalara karşın, ARF1 ve SAR1 proteinlerinin bitki hücrelerindeki fonksiyonları hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada *Medicago truncatula* bitkisinde farklı gelişim evrelerinde, farklı bitki kısımlarında ve nodül oluşumuna bağlı olarak değişen ARF1 ve SAR1 düzeyleri incelenmiştir. Bitkilerde farklı parametrelere göre değişen ARF1 ve SAR1 düzeyleri hakkındaki veriler, hücre içi vesiküler trafikte bu proteinlerin işlevleri hakkında önemli ip uçları sağlayacaktır.

Yapılmış olan bu çalışma aynı zamanda *Leguminosae* (Baklagil) ailesi bitkilerinin, toprakta bulunan *Rhizobium* bakterileri ile sürdürdükleri simbiyotik yaşam yolu ile, havadaki serbest azotu fikse etmelerinin hücre içi vesiküler trafiğe etkisini anlamada ön bilgi oluşturmıştır. Bu etkinin anlaşılmasının *Leguminosae* familyası bitkilerinde nodül oluşumu ile gerçekleşen protein içeriğine bağlı bitki kalitesinin artırılması yolunda önemli bir adım olduğu

düşünülmektedir.

Bu çalışmada ülkemizde önemli bir çayır-mera bitkisi olan *Medicago sativa* (yonca)'nın yakın akrabası olan *Medicago truncatula* bitkisi kullanılmıştır. *Medicago truncatula*, tetraploid bir genoma sahip olan *Medicago sativa*'dan daha küçük, diploid bir genoma sahip olup, tüm dünyada baklagil bitkileri ile ilgili olarak yürütülen moleküler biyoloji çalışmalarında model bitki olarak kullanılmaktadır.



2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Hücre İçi Vesikül Trafığı

Ökaryotik hücrelerde hücre içi protein taşınımı, örtü yapılarını oluşturan proteinlere göre adlandırılan küçük taşınım vesiküllerince gerçekleştirilir. Vesiküller tarafından gerçekleştirilen bu taşınım olayları vesiküler trafik olarak adlandırılır.

Vesiküler trafik yolunda ilk adım, vesikül örtü yapısını oluşturacak olan proteinlerin, sitosoldan verici membran bölümüne toplanmasıdır. Daha sonraki adımlar ise taşınım vesikülünün oluşması, oluştuğu membran bölgesinden tomurcuklanarak ayrılması ve en son olarak bu vesikülün hedef membranla füzyonudur (Seaman vd., 1996). Vesiküler trafikte, membranda meydana gelen her bir tomurcuklanma olayında, taşınım vesiküllerini farklı örtü proteinleri oluşturur ve bu örtü proteinleri doğrudan ya da dolaylı olarak kargo moleküllerinin seçiminde rol oynarlar (Schekman ve Orci, 1996).

Kalatrın örtülü vesiküller *trans*-Golgi ağından taşınımında ve endositozda, COPII örtülü vesiküller ER'dan çıkışta, COPI örtülü vesiküller ise Golgi ve ER ile Golgi kesecikleri arasındaki taşınımında görevlidirler (Wieland ve Harter, 1999). Diğer bir ifade ile COPII örtülü vesiküller yeni sentezlenen proteinlerin ER'dan taşınımına aracılık ederlerken; COPI örtülü vesiküller hücre içi taşınımın daha sonraki aşamalarında görev alırlar (Antonny ve Schekman, 2001).

COPI ve COPII örtülü vesiküllerin oluşumunda küçük GTPazlar örtü yapısının kurulmasını ve vesikül oluşumunu başlatır. GTPazlara bağlı GTP'nin hidrolizi bu örtü yapılarının dağılması için gereklidir. COPI ve COPII örtülü vesiküllerinin oluşumunu başlatan küçük GTPazlar ARF ve SAR proteinleri olup; bu proteinler önemli amino asit dizi benzerliğine sahiptirler (Barlowe, 1995).

2.2 Kalatrın Örtülü Vesiküller

İlk aydınlatılan membran örtü yapısı kalatrın örtüdür. Örtü yapısının oluşumu ve bu örtünün oluşturduğu vesikülün membran bölgesinden ayrılması için kalatrın, adaptin ve dinamin proteinleri gereklidir.

Kalatrın, üç kollu bir yapıya sahip olması nedeni ile triskelion olarak adlandırılan, üç ağır ve üç hafif zincire sahip olan bir moleküldür (Kirchhausen, 1999).

Adaptör protein kompleksinin (AP) dört altbirimi, adaptinler olarak adlandırılmıştır. AP'nin

çeşitli sınıflarını oluşturmak üzere bu adaptinler farklı şekillerde kombine olurlar. AP'ler hem kalatrinle hem de membrana bağlı kargo ile etkileşerek, membran ve kalatrinin bağlayan bir köprü rolü oynarlar (van Vliet vd., 2003, Kirchhausen, 1999).

Kalatrin örtülü vesikül oluşumunda, kalatrin molekülleri reseptör proteinlere tutunurlar. Endositozda bu etkileşim plazma membran adaptör protein kompleksi (AP) (α -adaptin, β -adaptin, AP50, AP17) ile sağlanır. *Trans*-Golgi'den oluşacak olan örtülü vesiküllerde ise kalatrin molekülleri lizozomal veya vakuolar proteinlerin trafiğinde rol alan protein reseptörlerini yakalar. Bu bölgeye toplanma plazma membran adaptörleri ile aynı role sahip belirli bir AP (β '-adaptin, γ -adaptin, AP47, AP19) ile gerçekleştirilir. Reseptörlerin sitoplazmik kuyrukları, adaptör proteinleri vesikül oluşum bölgesine çeken yönlendirme determinantlarına sahiptirler (Schekman ve Orci, 1996, Aniento vd., 2003).

Sitosolden *trans*-Golgi membranına toplanan AP aynı zamanda AP-1 olarak adlandırılır, AP-1 adaptör kompleksi bu bölgede aynı zamanda kalatrinle bir araya gelir, böyle bir oluşumu içeren membran bölgesi tomurcuklanmaya sevk edilir. ARF1 GTPazının, AP-1'in membrana toplanmasında gerekli olduğu gösterilmiştir. AP-1 adaptör kompleks *trans*-Golgi membranı üzerinde toplanırken; plazma membran üzerinde toplanan AP, AP-2 adaptör kompleks olarak adlandırılır. Her iki durumda da çözünmüş haldeki kalatrin, membranla birarada bulunan adaptörlere bağlanır (Seaman vd., 1996, Aniento vd., 2003).

Örtü yapısı tamamlanmış olan, kalatrin örtülü bir vesikülün membrandan ayrılması için bir GTPaz olan dinamin proteininin aktivitesi gereklidir. Dinamin bir periferik GTPaz olup, vesikülün membrandan ayrılmasından önce tomurcuğun boyun kısmının boğumlanmasında rol alır (Kirchhausen, 1999). Vesikülün ayrılacağı membran bölgesinin boyun kısmında kendiliğinden kurulan dinamin, kendine bağlı GTP'yi hidrolize ederek, örtü yapısı oluşmuş olan vesikülün membrandan ayrılmasını sağlar. Tomurcuklanmanın ardından oksilin proteini, kalatrin örtüye bağlanarak şaperon Hsc70 (Heat shock cognate 70)'in bu bölgeye toplanmasını sağlar. Hsc70, ATP hidrolizi ile kalatrin örtü yapısının dağılmasını sağlar, bu durum vesikülün, hedef membran ile füzyonu için şarttır (van Vliet vd., 2003).

2.3 COP (Coat Protein) Örtülü Vesiküller

Salgı yolundaki organeller, proteinlerin çeşitli hücre içi membran kompartmanlarına ve hücre yüzeyine yönlendirilmelerinde görev alırlar. Ökaryotik hücrelerde işlevleri açısından, her bir organelin özgün protein ve lipid içeriğine sahip olmaları gerekir (van Vliet vd., 2003). ER ve Golgi ağı, yerleşik proteinlerin ER'da birikmesi için etkin bir mekanizma ile işbirliği yaparlar.

İleri yönlü vesikül taşınımı (“anterograde”) ile membranlar ve proteinler Golgi ağına ulaştırılır, burada belirli protein ve lipidler geri yönlü vesikül taşınımı (“retrograde”) ile ER’a geri götürülmek üzere seçilirler. Bu işlemler dizisi, ileri yönlü taşınım için gerekli olan unsurların geri dönüşü ve iki organel arasındaki farklı protein ve lipid içeriğinin sürdürülmesi için gereklidir (Hadlington ve Denecke, 2000).

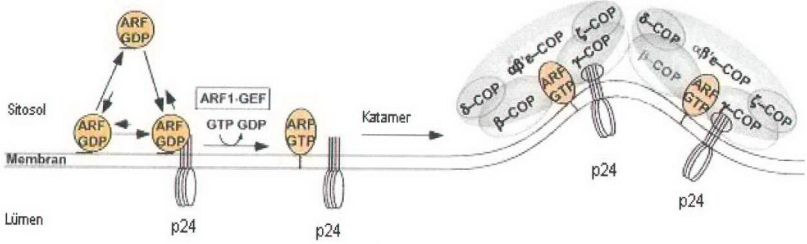
Verici membran yüzeyinde, vesikülü oluşturacak olan örtü yapısının kurulmasının genel bir mekanizması vardır. Küçük GTPaz (ARF1 ya da SAR1) GTP bağlı formunda membrana bağlı duruma gelmiş olmalıdır. Daha sonra heterooligomerik protein komplekslerinin membrana bağlanması ile örtü yapısı kurulur ve membran tomurcuklanmaya sevk edilir (Barlowe, 2000). Verici organeldeki membran proteinleri örtü yapısı oluşumunda önemli role sahiptirler. Bu transmembran proteinlerin iki işleve sahip olduğu ileri sürülmüştür. Bu işlevlerden ilki sitoplazmada çözünmüş halde bulunan örtü bileşenleri için sitosolik tarafta örtü reseptörü olarak; ikincisi ise lümen tarafında kargo proteinlerinin yönlendirilmesinde görev almalarıdır (Wieland ve Harter, 1999). COP örtülü vesiküller, p24 transmembran protein ailesine dahil olan p23 ve p24 proteinlerini içerirler. Bu proteinler COPI ve COPII örtü proteinleri ile etkileşirler. Ayrıca, bunlar vesikül tomurcuklanması sürecinde kargo reseptörü olarak görev alırlar (Gommel vd., 1999, 2001).

In vitro koşullarda lipozomlar ve saflaştırılmış vesikül örtü proteinleri kullanılarak, COP örtülü vesiküllerin oluşumu gerçekleştirilmiştir (Matsuoka ve Schekman, 2000).

2.3.1 COPI Örtülü Vesiküller

COPI örtü oluşumunun başlamasında ilk adım ADP ribozilasyon faktör 1 (ARF1)’in Golgi membranına bağlanmasıdır. Bu olayın gerçekleşmesinde reseptörler önemli rol oynarlar. Golgide yerleşik durumdaki transmembran protein p23, ARF1’in membrana bağlanması için gereklidir. p23 allellerinin her ikisinde de meydana getirilen hasarın, farelerde erken embriyonik letaliteye neden olduğu belirlenmiştir (Denzel, 2000). ARF1’in GDP bağlı formunun (ARF1-GDP) p23 ile etkileştiği, buna karşın GTP bağlı formunun (ARF1-GTP) p23’e belirgin bir afinitesinin olmadığı gösterilmiştir. ARF1 Golgi membranına GTP formunda bağlanmadan önce, ilk olarak p23 kargo reseptörünün sitoplazmik kısmı ile GDP formunda doğrudan etkileşir. p23’ün sitoplazmik kısmı ARF1-GDP için bir reseptördür. (Gommel vd., 2001, Aniento vd., 2003) Meydana gelen GDP-GTP değişimi ARF1’de konformasyonel değişime ve bağlı olduğu p24 ailesi proteininden ayrılmasına neden olur (Amor vd., 1994, Goldberg 1998). Bunun sonucunda örtü yapısı kurulmak üzere katamerler

membranın bu bölgesine toplanırlar; ARF-GTP katamerin γ -COP ve β -COP altbirimleri ile, p23'ün sitoplazmik kuyruğu ise γ -COP altbirimi ile etkileşir (Wieland ve Harter, 1999).



Şekil 2.1 ARF1'in Golgi membranına toplanmasında öne sürülen model. ARF-GDP membrana düşük afinite ile bağlanır, daha sonra p24'e bağlanarak membranla etkileşimini kararlı hale getirir. GDP-GTP değişiminden sonra ARF-GTP, p24'den ayrılır. ARF1-GTP ve p23, katamer altünitelerine bağlanır (Aniento vd., 2003).

Lümeninde çözünmüş halde bulunan ER yerleşik proteinleri, karboksit terminal bir yönlendirme sinyali (örneğin; HDEL, KDEL) taşırlar. Bu sinyal amino asit dizileri, bu proteinlerin ER'da birikmelerinden sorumludur. Maya ve memeli hücrelerinde bu sinyal motifleri transmembran bir reseptör olan ERD2 (ER-retention-defective) tarafından tanınırlar. ERD2, Golgi ağında bulunur ve ER'da yerleşik olarak kalması gereken proteinlerin Golgi ağından geri yönlü taşınımı için gereklidir. Mayada ERD2 geninin delesyonu letaldir. ERD2'nin bir bitki homoloğu *Arabidopsis thaliana*'da tanımlanmıştır (Hadlington ve Denecke, 2000).

Kargonun hedef membrana etkin şekilde ulaştırılabilmesi için, oluşan COPI vezikülünün örtü yapısının dağılması gerekir. Bu işlemde ARF'a bağlı GTP'nin hidrolize edilmesi şarttır; bu açıdan ARF proteini tarafından meydana getirilen GTPaz döngüsü, vesiküler trafikte önemli bir yere sahiptir (Goldberg, 1999, Poon vd., 1999).

2.3.1.1 ARF1 (ADP Ribozilasyon Faktör)

ARF1 proteini, ER-Golgi ağı arasındaki vesikül aracılı trafikte düzenleyici bir role sahip olup, Golgi keseciklerinden örtülü vesikül oluşumu için gereklidir (Kahn vd., 1992). ARF ilk olarak adenilat siklazin düzenleyici altbiriminin kolera toksin tarafından ADP-ribozilasyonunda bir kofaktör olarak keşfedilmiştir (Balch vd., 1992).

Küçük (21kD) bir GTP bağlayıcı protein olan ARF, GDP bağlı formda genel olarak sitoplazmada çözünmüş halde bulunur, buna karşın GTP bağlı aktif formu membrana sıkıca bağlıdır. ARF proteinleri yüksek derecede korunmuş proteinler olup; tüm ökaryotlarda bulunurlar (Donaldson ve Jackson, 2000).

Fungal metabolit brefeldin A (BFA)'nın Golgi kompleksi üzerinde ilk gözlenen etkisi protein salgı yolunun inhibe edilmesi olmuştur (Hunziker, 1992). ARF tarafından düzenlenen, COPI vezikül örtü proteinlerinin Golgi membranına geri dönüşümlü olarak bağlanması işleminin BFA tarafından inhibe ediliyor olması aslında, BFA'nın ARF üzerinde, GEF tarafından gerçekleştirilen guanin nükleotid değişiminin inhibe edilmesinden kaynaklanmaktadır (Teal vd., 1994).

Memeli ARF proteinleri üç sınıfa ayrılmıştır. Sınıf I (ARF1-ARF3), Sınıf II (ARF4 ve ARF5) ve Sınıf III (ARF6) (Hosaka vd., 1996). *Saccharomyces cerevisiae*'de üç ARF proteini vardır. Bu organizma için ARF1 ve ARF2, işlevsel olarak birbirinin yerini tutabilir ve bu hücrelerin canlı kalabilmeleri için bu iki proteinden en az birine ihtiyaçları vardır. ARF3 büyüme için esas değildir ve muhtemelen memeli ARF6 proteinine karşılık gelir. *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*'da memeli ARF'larına benzer ARF'ların varlığı belirlenmiştir (Donaldson ve Jackson, 2000).

Sınıf I ARF'lar ER-Golgi trafiğinde ve endozomal sistemde görev alırlar. Sınıf II ARF'ların fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. Sınıf III ARF proteini, ARF6, endozomal-plazma membran sistemde işlev görür (Donaldson ve Jackson, 2000).

Tüm ARF'lar amino terminal miristilasyon dizisi içerirler. Translasyon sonrası gerçekleşen N-miristilasyon, ARF'ların membranla olan guanin nükleotid bağımlı etkileşiminde önemlidir. ARF-GDP'nin ARF-GTP'ye dönüşümünün, amino terminalde bir konformasyonel değişime neden olduğu ve miristile grubun membrana girmesini sağladığı öne sürülmüştür. (Franco vd., 1996). ARF1-GDP/Sec7 yapısının (2.3.1.3) oluşumundan önce, ARF1'in miristile N-terminal heliksinin, membrana bağlı formda olması gerekir (Béraud-Dufour vd., 1999).

ARF'ın GDP bağlı inaktif formu sitosolikdir; buna karşın GTP bağlı ARF, miristilasyon dizisi aracılı olarak ikili lipid tabakası ile bir araya gelir (Goldberg 1998).

ARF1, COPI örtü oluşumunun yanında *trans*-Golgi'den taşınımında rol alan vesiküllerin oluşumuna da katılır (Barr ve Huttner, 1996). ARF1'in endositozda, kalatrin örtülü

vesiküllerin oluşumunda da rol aldığı gösterilmiştir (Lenhard vd., 1992). Ayrıca aktin yapısının kuruluşunda ARF6 proteininin rol aldığı saptanmıştır (Schafer vd., 2000).

2.3.1.2 Katamer

Katamer, COPI örtülü vesiküllerin önemli bir bileşeni olup; ER'da yerleşik membran proteinlerinin ve p23 ün sitoplazmik bölgesindeki ikili lizin motifine bağlanır. COPI örtülü vesiküllerinin önemli, tip I membran proteini olan p23'ün sitoplazmik bölgesi KKXX geri dönüş motifi ile katamerin γ altbirimi ile etkileşir (Harter ve Wieland, 1998; Nickel ve Wieland, 1998; Weidler vd., 2000).

600 kD'luk katamer, 7 altbirimden oluşur. α -COP (140 kDa), β -COP (107 kDa), γ -COP (97kDa), β' -COP (102 kDa), δ -COP (57 kDa), ϵ -COP (35 kDa), ζ -COP (20 kDa) altbirimleri bir araya gelerek katamer yapısını oluştururlar (Harter ve Wieland, 1996). Katamer altbirimlerinin *in vivo* biraraya gelişinde, tüm altbirimlerin doğrudan etkileştiği, oluşan katamerin 28 saatlik yarı ömürle kararlı halde kaldığı belirlenmiştir (Lowe ve Kreis, 1996).

2.3.1.3 Guanin Nükleotid Değişirme Faktörü (GEF)

ARF1'in aktivasyonu GEF'lerle kontrol edilir. ARF1 üzerindeki GDP-GTP değişimini katalizleyen GEFler (ARF GEFler) 200 amino asitten oluşan ve Sec7 olarak adlandırılan bir bölüme sahiptirler. Bu Sec7 bölümünün *in vitro* koşullarda, ARF üzerinde GDP'nin GTP'ye değişimi için yeterli olduğu gösterilmiştir (Donaldson ve Jackson, 2000). Sec7 bölümü ARF1'in anahtar bölgesine bağlanır ve bakiyeleri doğrudan GTPaz aktif bölgesine sokar (Goldberg 1998).

Gea1, mayada bulunmuş ilk GEF proteindir. İnsanda aydınlatılmış olan ARNO ("ARF nucleotide-binding-site-opener") proteini bir ARF-GEF olarak maya hücreleri ile korunmuş olan Sec7 bölgesini paylaşır (Chardin vd., 1996). ARNO Sec7 bölgesinin ARF1 ile etkileşim yeri belirlenmiştir (Mossessova vd., 1998). Sec7 bölümünü içeren GEF'ler ARF'ın regülasyonunu gerçekleştirerek, hücre içi membran kompartmanlarının yapı ve fonksiyonlarını kontrol ederler (Franco vd., 1998).

ARF GEF'lerin önemli iki ailesi bilinmektedir: ~200 kDa ve ~50 kDa'luk GEF'ler. ~200 kDa'luk GEF'ler, protein salgı yolunu bloke eden fungal metabolit BFA tarafından inhibe edilirken, ~50kDa'luk GEF'ler BFA'ya hassas değildirler (Togawa vd., 1999). BFA, ARF-GDP-GEF üçlüsünü stabil hale getirir ve böylece ARF aktivasyonu bloke olur.

Yüksek molekül ağırlıklı ARF GEF lerin Gea/GBF/GNOM ve Sec7/BIG altaileleri ER-Golgi

sisteminde işlev görürken; ARNO/sitohesin/GRP ve EFA6 altaileleri öncelikli olarak endozomal-plazma membran sisteminde işlev görürler. Tüm ARF GEF ler sitosolde çözünmüş halde bulunurlar (Donaldson ve Jackson, 2000).

2.3.1.4 GTPaz Aktivasyon Proteinin (GAP)

ARF tarafından GTP'nin hidrolize edilmesi olayı, Golgi kaynaklı COPI taşınım veziküllerinin örtü yapısının dağılmasında düzenleyici role sahiptir. Ayrıca bu GTP hidrolizi, membran kargolarının COPI veziküllerine alımı için de gereklidir (Malsam vd., 1999). ARF'ların çok düşük düzeyde intrinsik GTPaz aktivitesine sahip olmaları nedeni ile, ARF işlevi için bir GAP (ARF-GAP) gereklidir (Poon vd., 1999). Etkin GTP hidrolizi ARF1, ARF-GAP ve katamer üçlününün bir araya gelmesiyle gerçekleşir (Goldberg, 1999).

GAP'ler ARF'a bağlı GTP'nin hidrolizini teşvik eder, bunun sonucunda ARF, inaktif GDP bağlı formuna döner. Tüm ARF-GAP'ler 70 amino asitlik ortak bir GAP bölgesi içerirler. Bu bölgede, GAP aktivitesi için kritik olan çinko parmak motifi bulunur. Bu motife ek olarak tüm ARF GAP'ler bu bölgede, korunmuş bir arjinin taşırlar ve bu arjinin GAP aktivitesi için gereklidir (Donaldson ve Jackson, 2000, Wakeham vd., 2000).

İnsan hücrelerinde en az 15 gen, ARF-GAP kodlar. Bu proteinlerin tümü çinko parmak motifini içeren korunmuş ARF-GAP bölgesini içerirler (Randazzo ve Hirsch, 2004).

2.3.2 COPII Örtülü Veziküller

COPII örtülü veziküller, ilk olarak mayada belirlenmiş ve daha sonra memeli hücrelerinde de karakterize edilmiştir. COPII örtülü veziküller, salgı yolunda proteinlerin ER'dan Golgi ağına taşınımına aracılık eder. Maya ve memeli hücrelerinde COPII örtülü veziküllerinin oluşum mekanizması iyi anlaşılmış olup, bitkilerde COPII veziküllerinin bileşenleri son on yıl içinde tanımlanmıştır (Phillipson vd., 2001, Aniento vd., 2003).

Salgı yolunda ER'dan Golgi ağına taşınım reaksiyonu sürecinde, COPII örtülü veziküllerin *in vitro* tomurcuklanması için gerekli olan unsurlar: Membran, SAR1 proteini ile Sec23/24 ve Sec13/31 protein kompleksleridir. GTP varlığında bu proteinler, ER kaynaklı vezikülleri oluşturmak üzere membrana toplanırlar (Barlowe, 1995). SAR1, Sec23-Sec24 ve Sec13-Sec31 proteinlerinin, GTP'nin hidrolize olmayan analogunun bulunduğu ortamda, sentetik lipozomlardan COPII örtülü vezikülünün oluşumunda yeterli olduğu gösterilmiştir (Barlowe, 2003).

Membrana bağlı ve aktive edilmiş SAR1 proteini, tomurcuklanmayı başlatacak örtü yapısını

oluşturmak üzere, Sec23/24 ve Sec13/31 protein komplekslerini toplar (Şekil 2.2). SAR1'e bağlı GTP'nin hidrolize edilmesi, Sec23/24 kompleksinin Sec23 altbirimi tarafından teşvik edilir. SAR1, GTP'nin hidrolize edilmesi ile vesikülden ayrılarak serbest kalır ve COPII örtü kompleksinin dağılımı başlar. Örtü yapısının dağılması, kargoyu taşıyan vesiküllerin hedef Golgi ağına füzyonu için gereklidir (Barlowe, 1995).

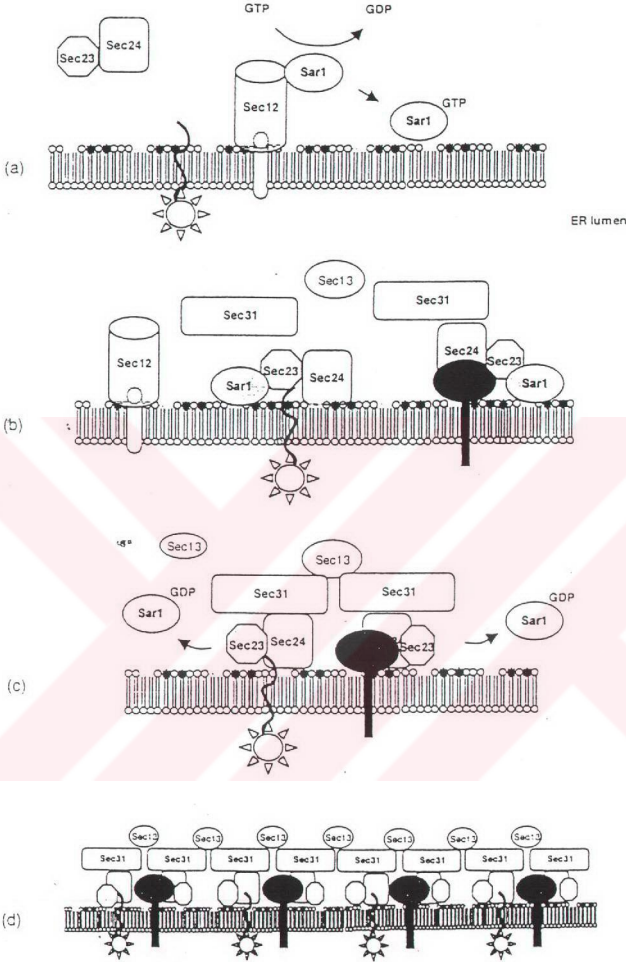
ER'dan taşınacak olan kargo SAR1-Sec23-Sec24 tomurcuklanma öncesi kompleksine bağlanması için belirli sinyal motifleri taşırlar. Çözünmüş kargo proteinleri örtü altünitelerine doğrudan bağlanamazlar, bunlar için transmembran kargo reseptörleri vardır (Barlowe, 2003).

ER salgı yolundaki ilk organelidir. ER'da kargonun seçimi ve ihraç edilmesi için COPII örtülü vesiküllerin oluşumunda, SAR1 GTPaz tek başına membran kargo seçimini, diğer sitosolik COPII örtü unsurları toplanmadan başlatabilir. Viral glikoprotein VSV-G (vesiküler somatitis virüs glikoprotein)'nin sitoplazmik kuyruğunun SAR1 ile doğrudan etkileştiği ve ardından COPII örtü oluşumunun başladığı gösterilmiştir (Aridor vd., 2001).

Özgün transmembran kargo proteinlerinde, di-hidrofobik ve di-asidik motifler bulunur. Bu sinyal dizileri sitoplazmik tarafta, COPII örtü altbirimleri tarafından tanınırlar. Çözünmüş haldeki kargo moleküllerinin ER'dan etkin taşınımı için reseptör proteinler gereklidir; çözünmüş kargoyu ER kaynaklı vesiküllere yönlendiren sinyal dizileri hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır (Barlowe, 2003).

2.3.2.1 SAR ("Secretion Associated Ras") 1

SAR1 GTPaz, ER'dan kargonun taşınımını gerçekleştiren COPII vesiküllerinin önemli bir örtü bileşenidir. ER'da yerleşik durumdaki Sec12 proteini, SAR1'in guanin nükleotid değişimini kataliz eder (Weissman vd., 2001). SAR1-GTP, lipid yüzeye doğrudan bağlanır (Antonny ve Schekman, 2001). 21kD'luk SAR1 GTPaz, ARF ailesi GTPazları ile yakın amino asit dizi benzerliğine sahiptir (Barlowe, 1995).



Şekil 2.2 ER membranında COPII örtü oluşumunun düzenlenmesi. (a) Sec12, sitosolde çözülmüş haldeki SAR1'i bağlar ve SAR1 üzerinde GDP-GTP değişimini teşvik eder. (b) SAR1-GTP membrana bağlandığında, Sec23/24 kompleksini ER membranına çeker. (c) Sec23, SAR1'e bağlı GTP'yi hidrolize ederek SAR1'in membrandan ayrılmasını sağlar. (d) Sec13/31 kompleksi Sec23/24 kompleksine bağlanır (Roth, 2000)

2.3.2.2 Sec12

Tip II transmembran proteinlerinin bir üyesi olan Sec12, ER'dan taşıyım vesiküllerinin tomurcuklanması için gereklidir. Sec12 proteini, SAR1'in guanin nükleotid değişimini kataliz eder (Barlowe ve Schekman, 1993, Weissman vd., 2001). İntegral bir membran glikoproteini olan Sec12 bu katalizi ER'nin sitosolik yüzünde, vesikül oluşum bölgesinde SAR1'i aktive ederek gerçekleştirir (Barlowe, 1995).

Sec12 proteininin amino terminal sitosolik bölümü, COPII örtülü vesiküllerle taşıyım için gereklidir (d'Enfert vd., 1991).

2.3.2.3 Sec23/24 ve Sec13/31 Protein Kompleksleri

400kDa'luk Sec23/24 kompleksi Sec23 ve Sec24 polipeptidlerini içerir. Sec23p 85kD'luk, SAR1'e özgün bir GTPaz aktive edici protein (GAP) dir. Sec24p 105kD'luk bir proteindir. 700kD'luk Sec13/31 kompleksi 34kD'luk Sec13p ve 150kD'luk Sec31p polipeptidlerinden oluşur (Barlowe, 1995).

Sar1-Sec23-Sec24 tomurcuklanma öncesi kompleksi ile yapılmış olan yapısal çalışmalarla, Sec23 altbiriminin SAR1 için bağlanma yüzeyi sağladığı belirlenmiştir. Sec23 alt birimi, COPII örtülü veziküllerin oluşumunda SAR1'e özgün GAP aktivitesine sahiptir (Barlowe, 2002, 2003). Sec24 altbiriminin kargo tanınmasında etkili olduğu öne sürülmüştür. SAR1 ve Sec23-24 protein kompleksinin var olduğu koşullarda, ER membranından kargo içeren tomurcuklanma öncesi kompleksi izole edilebilmiştir. Sec 24'ün tek başına ikili asidik bir motif taşıyan transmembran kargonun sitoplazmik yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir (Miller vd., 2002).

2.4 Vesiküllerin Hedef Membranla Füzyonu

Örtülü veziküllerde hedef membranla füzyon, örtü depolimerize olduktan sonra meydana gelir. Bu füzyona bir grup protein aracılık eder.

NSF ("N-etilmaleimide-sensitive fusion protein"), SNAP ("soluble NSF attachment protein") ve SNARE (SNAP reseptör) proteinleri, vesiküllerin taşıdıkları kargoyu boşaltmaları amacı ile hedef membrana füzyonunda gereklidirler (Söllner vd., 1993). Vesiküldeki (v-SNARE) ve hedef membrandaki (t-SNARE) SNARE'ler bir araya gelerek kompleks oluştururlar, bunun sonucunda iki membran füzyon olur ve kargo hedef bölgeye boşaltılmış olur. Her bir taşıyım vesikül tipinde özgün V-SNARE, ve hedef membranda da buna uygun t-SNARE proteinleri bulunur. NSF, SNARE komplekse SNAP yolu ile bağlanır ve ATP hidrolizini katalize eder; böylece SNARE kompleksi ayrılır ve sonraki taşıyım olaylarında tekrar kullanılırlar (van

Vliet vd., 2003).

2.5 Bitkilerde COP Örtülü Vesiküller

Bitkilerin hücre içi salgı yolu vesikül taşınımı ile yürütülen bir organeller ağıdır. Bitki salgı yolu boyunca proteinlerin yönlendirilmesinde, reseptörler tarafından, proteinlerin taşıdıkları sinyallerin özgün şekilde tanınması gereklidir. Çözünmüş proteinler için tanınma, lümeninde gerçekleşir. Bitkiler biyokimyasal yollarda maya ve memeli hücrelerinden farklı birçok özelliğe sahiptir. Bu farklılıklar esas olarak geç sekresyon yolunda, Golgi açısından vakuolar kompartmana taşınımında görülür (Hadlington ve Denecke, 2000; Aniento vd., 2003).

Golgi ağı bitki hücrelerinde birçok kesecikten oluşmuştur, bazı kaynaklarda diktiyozomlar olarak da adlandırılmışlardır. Bitki gelişimi ve hücre bölünmesinde Golgi ağı, glikolizasyon, protein yönlendirme ve hücre duvarı sentezinde önemli bir role sahiptir; polisakkarid ve proteinleri hücre duvarı veya vakuollere yönlendirme, ayrıca ER'dan kaçmış olan proteinleri geri göndermeye aracılık eder (Dupree ve Sherrier, 1998).

ER, bitkilerde de salgı yolunda doğru katlanmış olan proteinlerin modifikasyon ve Golgi ağına teslim edilmesinden sorumludur. Bunu gerçekleştirmek için ER'da yerleşik çok sayıda protein bulunur (Hadlington ve Denecke, 2000).

Hücre içi salgı yolu, bitkilerde gelişim ve morfogeneizde önemli rol oynar. Depo proteinlerinin birikimi, bitki hücre bölünmesi ve plazma membranının genişlemesi gibi olaylar, membranların, proteinlerin ve polisakkaritlerin, salgı yolundaki organeller aracılığı ile sentezi ve trafiği ile gerçekleştirilir (Matsuoka ve Bednarek, 1998).

Yapılan çalışmalar COPI örtü protein homologlarının bitki hücrelerinde de benzer rol oynadığı yolundaki kanıtları gün geçtikçe artırmaktadır; ancak bu protein homologları tam olarak karakterize edilememiştir. *In vitro* COPI örtülü vesikül analizlerinde, Karmabahar (*Brassica oleracea*) bitkisi hücrelerinde ARF1 ve katamerin sitosolden, karışık ER/Golgi membranlarına toplandığı gösterilmiştir (Pimpl vd., 2000; Aniento vd., 2003). Çeşitli memeli COPI örtü proteinlerine karşı üretilen antikolar kullanılarak pirinç (*Oryza sativa*) hücrelerinde COPI altbirimlerinin varlığı gösterilmiştir (Contreras vd., 2000).

Memeli ARF1'ine karşı hazırlanan antikor kullanılarak yapılan çalışmada, bitkilerde ilk kez bir ARF proteininin varlığı saptanmış, bezelye (*Pisum sativum*) bitkisinde ARF1 proteini tanımlanmıştır (Memon vd., 1993). Bitki hücrelerine yakın yapı benzerliğine sahip olan yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de insan ARF1'ine %90 benzerlik gösteren bir proteini

kodlayan cDNA izole edilmiştir. *C. reinhardtii*'de tanımlanan iki *Arf* kopyasından, birinin hücre bölünmesinde, diğerinin ışık etkisi ile anlatım yaptığı belirlenmiştir (Memon vd., 1995).

Arabidopsis'de bulunan dokuz *Arf* geninden altısının, Sınıf I ARF'lara %98-100 amino asit dizi benzerliği gösteren ARF proteinlerini kodladığı, diğer üç ARF'ın ise insan ARF1'ine %60 amino asit dizi benzerliği gösterdiği belirlenmiştir (Jürgens ve Geldner, 2002).

Arabidopsis COPII altbirim homologlarının ER'daki yerleşimi gösterilmiştir (Matsuoka ve Bednarek, 1998).

AtSec21p (γ -COP, katamerin 100-kD lik altbiriminin *Arabidopsis* homologu) ve *AtSec23* (COPII örtünün 85 kD'luk komponentinin *Arabidopsis* homologu) antikorlarının Kanıbahar (*Brassica oleracea*) bitkisine uygulanması ile bu proteinlerin varlığı, bu bitki hücrelerinin sitosol ve membran fraksiyonlarında gösterilmiştir (Movafeghi vd., 1999).

2.6 *Medicago truncatula* Bitkisi

Çizelge 1.1 *Medicago truncatula*'nın taksonomideki yeri [1]

Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Altsınıf	<i>Rosidae</i>
Takım	<i>Fabales</i>
Aile	<i>Fabaceae</i> (alt. <i>Leguminosae</i>)
Cins	<i>Medicago</i>
Tür	<i>Medicago truncatula</i>

Diploid, tek yıllık bir bitki olan *Medicago truncatula*, baklagil (*Leguminosae*) ailesine dahil olan türler için moleküler biyoloji çalışmalarında en uygun modeldir [2]. *M. truncatula* basit bir genom (2n=16) sahip olup, organizmalar arasında yapılmış olan genom içeriği ve organizasyonu karşılaştırmaları, *M. truncatula*, bezelye ve yonca (*Medicago sativa*) arasında yakınlık olduğunu göstermiştir [3].



Şekil 2.3 Çalışmada kullanılmak üzere, kontrollü koşullar altında yetistirilmiş olan 3.5 aylık *Medicago truncatula*.

Diğer bilinen baklagil bitkilerinden bezelye ve soya fasulyesi, *M. truncatula*'ya göre moleküler genetik çalışmalarında daha az transformasyon ve rejenerasyon etkinliği gösterdikleri gibi, her biri daha büyük genom boyutuna sahiptir. Ayrıca *M. truncatula* ile yakın akraba olan yonca (*Medicago sativa*) bitkisi poliploidi gösterir (Penmetsa ve Cook, 2000).

Bir baklagil olarak *M. truncatula*, en çok çalışılmış olan model bitki *Arabidopsis*'den farklı olarak azot fiske edici *Rhizobium* bakterisi ile simbiyotik bir yaşam sürer [3].

2.7 Baklagillerde Azot Fiske Edici Kök Nodüllerinin Gelişimi

Azot birçok bitki türü için en önemli sınırlayıcı elementtir. Toprakta sağlanan azot, genelde NO_3^- şeklindedir ve NH_3 şekline iki adımda indirgenir. İlk adım, nitratin nitrite indirgenmesi olup; bu adım bitki nitrat redüktazı tarafından katalizlenir. Bu enzimin etkin olması hazır halde bulunan nitrat varlığına ve ışığa bağlıdır (Lucinski vd., 2002).

Toprak, bitki-*Rhizobium* etkileşiminde doğal bir alandır. Toprakta bulunan mikroelement, organik madde ve diğer unsurlar nodülasyon oluşumunu etkiler (Pueppke, 1986).

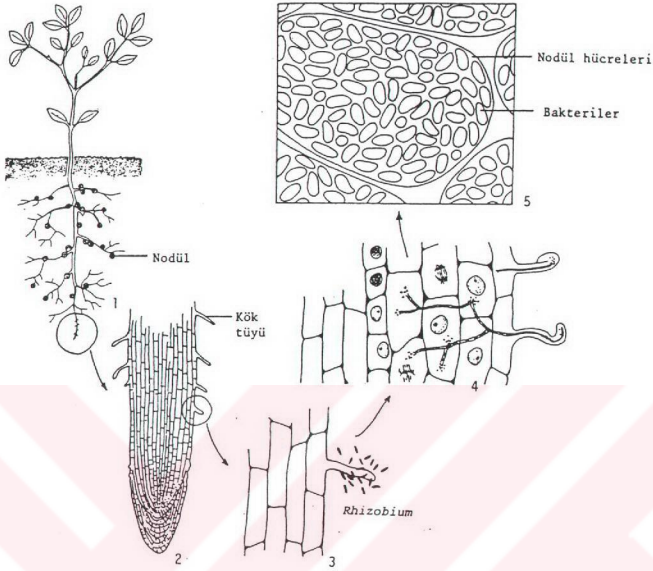
Baklagiller köklerinden toprağa flavonoid benzeri madde salarlar ve bu şekilde toprakta bulunan *Rhizobium* hücrelerinin aktivitelinde değişime neden olurlar. Farklı baklagil türleri özgün flavonoid benzeri maddeler salarak, nodülasyon sürecinde gerekli olan bakteriyel genleri aktive ederler (Grierson ve Covey, 1988). Kök nodüllerinin gelişimi bakteriler tarafından salınan sinyal molekülleri (Nod faktörleri) ile başlar. Bu temel sinyal molekül yapısı farklı *Rhizobium* türleri tarafından, konak bitkiye göre farklı Nod faktörler şeklinde modifiye edilir. Temel sinyal molekül yapısının biyosentezi için tüm *Rhizobium* ırklarında yüksek derecede korunmuşluk gösteren nodülasyon genleri (*nodABC*) gereklidir (John vd., 1995).

Toprakta *Rhizobium* hücreleri bitki kök tüyleri ile bir araya gelirler. Bu bir araya gelişin özgünlüğünün, bitki hücre duvarındaki lektinlerle bakteri hücre yüzeyinin etkileşimi sonucu gerçekleştiği ileri sürülmüştür. Bitki hücre duvarından enfeksiyon ipliği oluşur ve içteki kortikal hücrelere ilerler. Bunun sonucunda bu kortikal hücreler bölünür ve enfeksiyon ipliği de bölünerek daha içteki korteks hücrelerine doğru ilerler. Bakteriler enfeksiyon ipliğinin ucundan kortikal hücrelere boşaltılırlar ve bitki hücresi plazma membranı tarafından çevrilerek bakteroidler haline gelirler (Grierson ve Covey, 1988).

Nodüller, *Rhizobium* bakterilerinin atmosferik azotu, konak bitki tarafından azot kaynağı olarak kullanılabilen amonyak haline çevirmeleri için ortam sağlar (John vd., 1995).

Belirli kök hücre türleri Nod faktörlere farklı yanıtlar verirler. *Medicago* spp.'de kök tüyleri ve diğer kortikal hücreler, daha içteki korteks hücrelerine bakterileri ulaştırmak üzere enfeksiyon ipliğini oluştururlar. İçteki korteks hücreleri böylece bölünmeye teşvik edilirler ve bunu nodül meristemi oluşumu izler. Bu hücreler karakteristik periferik ve merkezi nodül dokularını oluşturmak üzere farklılaşırlar (Györgyey vd., 2000).

Bu çalışmada ilk defa baklagil bitkilerinde nodül gelişimi ile farklı bitki kısımlarında ve farklı gelişim evrelerinde küçük GTPaz'lardan ARF1 ve SAR1 in rolü incelenmiştir. Nodül gelişiminde bakteri enfeksiyonundan sonra bakteroidlerin oluşumu aşamasında yoğun şekilde meydana gelen vesikül aracılı taşınımında Rab1, Rab7 gibi küçük GTPazların rol oynadığı rapor edilmiştir (Cheon vd., 1993).



Şekil 2.4 Yoncada kök nodüllerinin gelişimi (Yentür,1995). *Rhizobium* bakterilerinin kök tüyleri ile bir araya gelmesi sonucu, kökün daha içteki dokularına doğru ilerleyen enfeksiyon ipliği oluşur. Bakteriler enfeksiyon ipliğinden korteks hücrelerine boşaltılırlar.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki Materyali

Medicago truncatula bitkisinin tohumları Göttingen Üniversitesi'nden sağlandı.

3.1.2 *Rhizobium* Bakterisi İçeren Toprak Örneği

Çalışmada *M. truncatula* köklerinde nodül gelişimini sağlamak için *Rhizobium* içeren toprak örneği kullanıldı. Bu toprak örneği, Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü'nden sağlandı.

3.1.3 Kullanılan Solüsyonlar

3.1.3.1 Hoagland Solüsyonu (Gatz, 1995)

Hoagland solüsyonu aşağıdaki stok solüsyonlardan taze olarak hazırlandı.

1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$: 11.5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Sigma- $M_A=115.0$), son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözülde.

1 M KNO_3 : 10.11 g KNO_3 (Sigma- $M_A=101.1$) son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözülde.

1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 23.62 g $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Sigma- $M_A=236.2$) son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözülde.

1 M $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 16.9 g $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma- $M_A=169.0$) son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözülde.

Çizelge 3.1 Hoagland Solüsyonu İçeriği

Solüsyon	Kullanılan Miktar
1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 ml
1 M KNO_3	6 ml
1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 ml
1 M MgSO_4	2 ml
Solüsyon III	1 ml
Fe-EDTA	0.2 ml
ddH_2O	Son hacim 1 litre, pH:5.5

Çizelge 3.2 Hoagland Solüsyonunda kullanılan Solüsyon III içeriği

H_3BO_3 (CARLO ERBA- $M_A=61.843$)	2.86 g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Fluka-Garantie- $M_A=197.91$)	1.81 g/l
ZnCl_2 (Merck- $M_A=136.28$)	0.11 g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Riedel- $M_A=170.48$)	0.05 g/l
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck- $M_A=241.95$)	0.025 g/l

Çizelge 3.3 Hoagland Solüsyonunda kullanılan Fe-EDTA içeriği

$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (J.T.BAKER- $M_A=372.24$)	37.3 mg/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (BAKER- $M_A=278.02$)	27.5 mg/l

N İçermeyen Hoagland Solüsyonu: Hoagland Solüsyonundaki 1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ yerine 1 M KH_2PO_4 (Merck- $M_A=136.09$), 1 M KNO_3 yerine 1 M KCl (Merck-74.56) aynı hacimlerde, 1 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ yerine 0.1 M $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich- $M_A=145.15$) 10 katı hacimde

kullanılarak hazırlandı.

1 M KH_2PO_4 : 13.6 g KH_2PO_4 son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözüldü.

1 M KCl : 7.46 g KCl son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözüldü.

0.1 M CaSO_4 : 1.45 g $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içerisinde çözüldü.

3.1.3.2 Protein Özütleme Tamponu

2 M Sukroz: 342.3 g sukroz, çift distile su içinde son hacim 1 litre olacak şekilde çözüldü, kaba filtre kağıdından geçirilerek 50 ml'lik tüplere ayrıldı. Hazırlanan stok sukroz solüsyonu -20°C 'de muhafaza edildi. (FLUKA- $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$, $M_A = 342.3\text{g}$)

0.1 M HEPES: 11.915 g HEPES çift distile su içinde son hacim 500ml olacak şekilde çözüldü, pH:7.2'ye ayarlandı. Solüsyon, kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra otoklavlandı. Hazırlanan stok solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi (SIGMA- N-[2-hidroksietil]piperazin- N'-[2-etansülfonik asit], $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$, $M_A = 238.3$).

1 M MgCl_2 : 20.331 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çift distile su içinde son hacim 100 ml olacak şekilde çözüldü, kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra otoklavlandı. Hazırlanan stok solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi. ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Fluka- $M_A = 203.31\text{g}$).

0.1 M Benamidin: 0.1566 g benamidin çift distile su içinde son hacim 10 ml olacak şekilde çözüldü. Hazırlanan stok solüsyon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünerek -20°C 'de muhafaza edildi. (SIGMA- $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{HCl}$ - $M_A = 156.6\text{g}$).

1 M DTT (Ditiyotreitöl): 3.084 g DTT çift distile su içinde son hacim 20 ml olacak şekilde çözüldü. Hazırlanan stok solüsyon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünerek -20°C 'de muhafaza edildi (Fermentas- dithiotreitöl- $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$, $M_A = 154.2\text{g}$).

0.1 M PMSF: 0.1742 g PMSF, Etanol (Riedel) içinde son hacim 10 ml olacak şekilde çözüldü. Hazırlanan stok solüsyon 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine bölünerek -20°C 'de muhafaza edildi (SIGMA- Fenilmetilsülfonilflorid- $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{SO}_2\text{F}$ $M_A = 174.19\text{g}$).

1 Litre Özütleme Tamponu

Stok olarak hazırlanan solüsyonlardan 1 litre özütleme tamponu hazırlamak için çizelge 3.4'de görülen miktarlarda kullanıldı. Hazırlanmasından sonra yarı ömrü 30 dakika olması

nedeni ile PMSF; özütleme tamponuna kullanımı 30 dakikayı geçtiği durumlarda tekrar eklendi. Kullanım sonunda artan özütleme tamponu, 50 ml'lik tüplere ayrılarak -20 °C'de muhafaza edildi; kullanılacağı zaman oda sıcaklığında çözülmesi sağlanarak, PMSF eklendikten sonra kullanıldı.

Çizelge 3.4 1 litre özütleme tamponu içeriği (Memon vd., 1993)

Solüsyon	Stok	Kullanılan miktar
Sukroz	2 M	500 ml
HEPES	0.1 M	100 ml
MgCl ₂	1 M	5 ml
EDTA	0.1 M	10 ml
PMSF	0.1 M	1 ml
Benzamidin	0.1 M	5 ml
DTT	1 M	10 ml

3.1.3.3 Protein Konsantrasyonu Belirlemede Kullanılan Solüsyonlar:

Stok BSA (Sığır Serum Albumin) Solüsyonu: 2 mg/ml BSA(Sigma) stok solüsyonu hazırlandı, -20 °C'de muhafaza edildi (Sigma).

Protein Standartları: 2 mg/ml konsantrasyonundaki stok BSA kullanılarak, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.5 mg/ml konsantrasyonlarında protein standartları hazırlandı.

BCA Protein Konsantrasyon Belirleme Kiti: BCA yöntemi için A ve B solüsyonlarından oluşan kit Sigma'dan ticari olarak sağlanmıştır.

A Solüsyonu İçeriği: Sodyum karbonat, sodyum bikarbonat, BCA, sodyum tartarat ve 0.2 N NaOH.

B Solüsyonu İçeriği: %4 bakır sülfat.

3.1.3.4 SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi) Jel Hazırlama, Yükleme ve Yürütme Solüsyonları

%30 Akrilamid-Bisakrilamid Karışımı: 116.68 g akrilamid, 3.32 g bisakrilamid son hacim 400 ml olacak şekilde çift distile su içinde çözöldü, steril filtreden geçirildi. Hazırlanan solüsyon ışıık almayacak şekilde +4 °C'de muhafaza edildi (Akrilamid: J. T. BAKER-CH₂:CHCONH₂, M_A= 71.08 g Bisakrilamid: SIGMA- N,N'-Methylene-bis-Acrylamide, M_A=154.2 g).

%10 SDS : 1 g SDS son hacim 10 ml olacak şekilde çift distile suda çözöldü. Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi (SIGMA- Sodyum dodesil sülfat- C₁₂H₂₅O₄SN_a, M_A= 288.4 g).

Ayırma Jeli Tamponu (1.5 M Tris-HCl pH 8.8): 18.16 g Tris son hacim 100ml olacak şekilde çift distile su içinde çözöölüp, pH 8.8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de muhafaza edildi (SIGMA- M_A=121.1 g).

Yükleme Jeli Tamponu (1 M Tris-HCl pH 6.8): 11.12 g Tris son hacim 100ml olacak şekilde çift distile su içinde çözöölüp, pH 6.8'e ayarlandı. Hazırlanan solüsyon +4 °C'de muhafaza edildi (SIGMA- M_A=121.1 g).

%10 APS: 0.1 g APS 1 ml çift distile su içinde, 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde pipetaj yapılarak çözöldü. %10 APS, SDS-PAGE jelinin dököleceğı zaman taze olarak hazırlandı (ALDRICH- Amonyum Persülfat- M_A=228.2 g).

5X SDS Yürütme Tamponu: 15.1 g Tris, 72 g Glisin (Merck-H₂NCH₂COOH-M_A=75.07), 5 g SDS son hacim 1litre olacak şekilde çift distile su içinde çözöldükten sonra pH:8.3'e ayarlandı, hazırlanan tampon kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi. Kullanım öncesi, 5 kez sulandırıldı.

Yükleme Tamponu: % 30 sukroz, %5 SDS ve %0.1 Bromofenol mavisi (Roth) çift distile su içinde çözöldü ve kaba filtre kağıdından geçirildi.

Coomassie Blue Protein Jeli Boyama Solüsyonu: % 0.25 (w/v) Coomassie Blue R250 (Roth), % 50 (v/v) metanol (Merck-CH₃OH-M_A=32.04) ve % 10 (v/v) asetik asit (Riedel-de Haën-C₂H₄O₂-M_A=60.05) çift distile su içerisinde çözöldükten sonra kaba filtre kağıdından geçirildi ve oda sıcaklığında muhafaza edildi

Poliakrilamid Jel Boya Çıkarma Solüsyonu: % 10 (v/v) metanol ve % 5 (v/v) asetik asit çift distile su içerisinde çözöldü, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Gümüş Boyama Solüsyonları:

Boya çıkarma solüsyonu: %30 Metanol (Merck), %7 Asetik asit (Merck) son hacime çift distile su ile tamamlandı.

DTT solüsyonu: 80 µl, 1 M stok DTT 250 ml çift distile su içinde çözülür.

AgNO₃ Solüsyonu: %0.2 AgNO₃ çift distile su içinde çözülür.

Görüntü Oluşturma Solüsyonu: 29.68 g Na₂CO₃ (Merck-M_A=105.99) ve 500 µl Formaldehid (Riedel de Haën) son hacim 1 l olacak şekilde çift distile su içinde çözülür.

Durdurma Solüsyonu: %1 Asetik asit son hacime çift distile su ile tamamlandı.

“Farmer’s Reducer” Boya Çıkarma Solüsyonu: 0.19 g K-ferrisiyanid (Sigma-K₃Fe(CN)₆-M_A=329.2), 2.4 g Na-tiyosülfat (Merck-Na₂S₂O₃.5H₂O-M_A=248.18) son hacim 250 ml olacak şekilde distile su içinde çözülür.

3.1.3.5 Transfer ve İmmunolojik Belirleme Solüsyonları

%0.1 Ponceau S : 0.1 g Ponceau S (SIGMA- 3-Hidroksi-4-[2-sülfo-4-(4-sülfo-fenilazo)fenilazo]-2,7-naftalendisülfonikası- C₂₂H₁₂N₄O₁₃S₄Na₄- M_A=760.6) 5 ml asetik asit eklenerek son hacim 100 ml olacak şekilde çift distile su içinde çözülür, kaba filtre kağıdından geçirildikten sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Transfer Tamponu: 12.08 g Tris, 56.25 g Glisin ve 1 litre Metanol son hacim 5 litre olacak şekilde çift distile su içinde çözülür, +4 °C’de muhafaza edildi.

10X PBS: 80 g NaCl (Riedel- de Haën- M_A=58.44), 2 g KCl (Merck- M_A=74.56), 7.9 g Na₂HPO₄.2H₂O (Merck- M_A=177.99), 2 g KH₂PO₄ (Merck- M_A=136.09) son hacim 1 litre olacak şekilde çift distile su içinde çözülürken sonra pH:7.4’e ayarlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında muhafaza edildi. Kullanımdan önce 10 kez sulandırıldı.

PBST: 1 l PBS solüsyonuna 500µl Tween 20 (Merck-M_A=1227.72) eklenerek karıştırıldı.

Bloklama Solüsyonu: % 5 süt tozu PBS içinde çözülür.

Primer antikor: Heidelberg Üniversitesi’nden sağlanan poliklonal AtARF1 ve AtSAR1 antikorları %1 BSA içeren PBST solüsyonunda 1:2500 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Sekonder antikor: Bio-Rad firmasından ticari olarak sağlanan, HRP işaretli sekonder antikor, %1 BSA içeren PBST solüsyonunda 1:2500 oranında seyreltilerek kullanıldı.

3.2 Metod

3.2.1 Bitkilerin Ekimi, Yetiştirilmesi ve Hasat Edilmesi

Medicago truncatula tohumları Göttingen Üniversitesi'nden legümenler içinde elde edildi. Her legümenenden yaklaşık 8 tohum çıkarıldı ve bu işlemin tamamlanmasının ardından tohum sterilizasyonuna başlandı. Tohumlar legümenenden çıkarıldıklarında, en geç bir ay içinde ekim işleminin gerçekleştirilmesine dikkat edildi.

3.2.1.1 Tohum Yüzey Sterilizasyonu

- Distile suya %10 çamaşır suyu ve %0.1 Tween 20 eklendi. Bu sıvıda tohumlar, otomatik çalkalayıcı üzerinde 5 dakika bırakıldı.
- Steril şartlar altında, çamaşır suyu ve Tween 20 içeren solüsyon uzaklaştırılarak, 6-8 defa steril distile su ile çalkalandı.

3.2.1.2 Bitki Ekim ve Yetiştirme Koşulları

Tohumların ekildiği toprak, 1.5/1.5/1 oranında bahçe toprağı, çiçek toprağı ve nehir kumu karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan toprağın bir kısmı özel otoklav torbalarında otoklavlandı, otoklavlanmayan kısmı, *Rhizobium* içeren ve hazır halde alınan özel toprak ile karıştırıldı. Ekim işlemi iki grup halinde, nodül oluşumunun beklendiği grubun ekim işlemi *Rhizobium* içeren ve nodül oluşumunun istenmediği grup *Rhizobium* içermeyen toprak kullanılarak gerçekleştirildi.

Bitkiler 16/8 saat aydınlık/karanlık periyodunda, 22-24 °C sıcaklık ve %70 nem koşullarındaki bitki büyüme kabinlerinde yetiştirildi.

Her iki bitki gurubuna da (Nodül oluşumu beklenen ve beklenmeyen bitki grupları) gelişimlerinin ilk ayında iki günde bir, daha sonraki dönemlerde ise hergün sulama yapıldı. Nodül gelişiminin istenmediği guruba haftada bir kez %20 Hoagland solüsyonu verildi. Legüm bitkilerinde toprakta kullanılabilir azotun hazır halde bulunması, nodül gelişimini olumsuz yönde etkileyeceğinden, bu bitki gurubu için özel olarak hazırlanan azotsuz Hoagland solüsyonu kullanıldı, haftada bir kez %20 azotsuz Hoagland solüsyonu verildi.

Göttingen Üniversitesi'nden örnek olarak gönderilmiş olan sınırlı sayıdaki tohumlar ekilerek, çalışma süresince çok sayıda yeni tohum elde edildi. Tohumların taşındığı legümen yapılarının oluşumu 5. ayda gözlemlendi.



Şekil 3.1 Çalışmada kullanılmak üzere yetiştirilmiş olan 5. aydaki *Medicago truncatula*'da legümen yapısı.

2.1.3 Hasat İşlemi

ay sonunda, *Rhizobium* içeren toprakta yetişen bitkilerin bazı kök kısımlarında nodül oluşumunun başladığı, *Rhizobium* içermeyen toprakta yetişenlerde ise böyle bir oluşumun gerçekleşmediği gözlemlendi. Nodüllü ve nodülsüz bitkiler 2.5 aylıkken hasat edilmeye başlandı. 2.5 aylık bitkinin kök, yaprak ve gövde kısımları ayrıldı. 2.5 aydan sonra bitkiler 3.5 ve 6.5 aylık dönemlerde hasat edildi. Bu dönemlerde hasat edilen bitkiler nodül, kök, yaprak ve gövde kısımlarına ayrıldı. Hasat işlemi +4 °C soğuk odada gerçekleştirildi, ayrılan bitki kısımları tartıldıktan sonra sıvı azotta donduruldu ve sonra -80 °C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.2 Hasat işleminden önce görüntülenmiş olan 3.5 aylık *Medicago truncatula*.

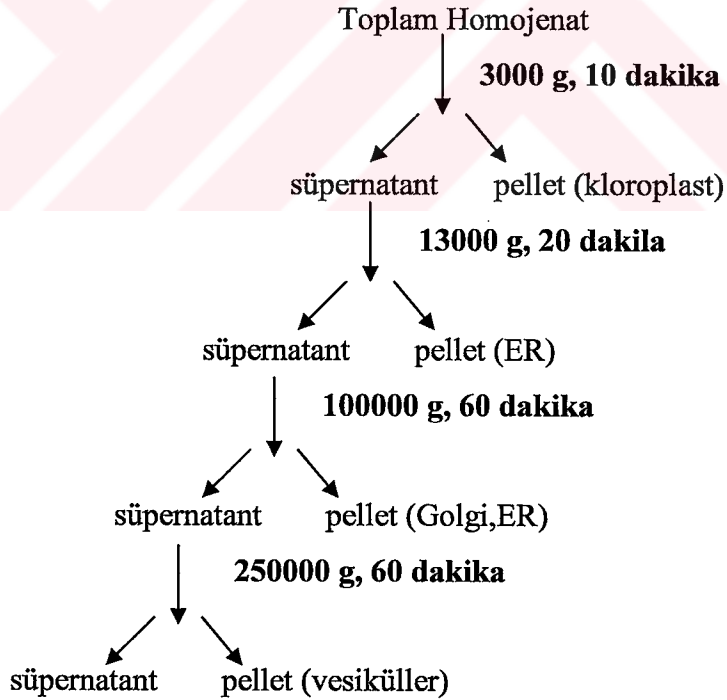
Çizelge 3.5 *M. truncatula*'nın hasat dönemleri ve bu dönemlerde bölümlere ayrılan bitki kısımları.

Bitki Hasat Dönemleri	Ayrılan Bitki Kısımları
2.5 ay	Yaprak, gövde ve kök
3.5 ay	Yaprak, gövde, kök ve nodül
6.5 ay	Yaprak, gövde, kök ve nodül

3.2.2 *Medicago truncatula* Bitkisinin Farklı Kısımlarından Protein Özütleme İşlemi

Bitki kısımlarından protein özütleme işlemi, Memon vd.'nin (1993) geliştirdikleri yöntemde değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.3).

- -80 °C'den alınan bitkiler, daha önce -20 °C'de soğutulmuş havanda, üzerlerine sıvı azot dökülerek toz haline gelene kadar ezildi.
- 1 g bitki için 1.5 ml özütleme tamponu kullanılarak hazırlanan homojenat 3 katlı tülbentten süzüldü.
- Tülbentten süzülen toplam homojenat, santrifüj cihazında 3000 g'de 10 dakika çöktürüldü, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra kloroplastları içeren pellet, özütleme tamponunda homojenize edildi.
- 3000 g süpernatant kısımları 13000 g'de 20 dakika çöktürüldü, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra bir miktar ER içeren pellet, özütleme tamponunda homojenize edildi.
- 3.5 ay ve 6.5 ay bitki özütlerinin 13000 g süpernatant kısımları 100000 g'de 60 dakika çöktürüldü, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra Golgi ve ER içeren pellet, özütleme tamponunda homojenize edildi.
- 3.5 ve 6.5 ay bitki özütlerinin 100000 g süpernatant kısımları 250000 g'de 60 dakika çöktürüldü, süpernatant kısmı ayrıldıktan sonra vesikülleri içeren pellet, özütleme tamponunda homojenize edildi.



Şekil 3.3 Bitki kısımlarından elde edilen Toplam Homojenat örneklerinin fraksiyonlara ayrılması.

3.2.3 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Protein örnekleri arasında ARF1 ya da SAR1 protein düzeylerinin karşılaştırılabilmesi için SDS-PAGE jeldeki kuyuların her birine eşit miktarda protein yüklendi. Eşit yükleme yapabilmek amacı ile örneklerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için Bicinchoninic Asit (BCA) yöntemi kullanıldı. BCA protein assay, protein konsantrasyonunun spektrofotometrik belirlenmesinde oldukça duyarlı bir yöntemdir. Protein moleküllerinin bazik ortamda Cu^{+2} ile reaksiyona girmesi sonucu Cu^{+1} oluşur. BCA, oluşan Cu^{+1} iyonunu yüksek duyarlılıkla belirler. Bir Cu^{+1} iyonu ile iki BCA molekülünün etkileşimi sonucu mor renkli reaksiyon ürünü oluşur. Oluşan bu ürünün 595nm'de verdiği absorbansa göre örneklerin protein konsantrasyonları belirlendi.

BCA protein konsantrasyon belirleme prosedürü (Pierce, BCA Protein Assay Reagent, Instructions) mikrotitrasyon kabında gerçekleştirildi.

- 50:1 oranında A ve B solüsyonlarını içeren çalışma solüsyonu hazırlandı, taze olarak kullanıldı.
- Mikrotitrasyon kabı kuyularına, standartlardan ve protein konsantrasyonları belirlenecek örneklerin her birinden 10 μl konuldu. Her bir kuyuya 200 μl çalışma solüsyonu eklendi.
- Mikrotitrasyon kabındaki örnekler 30 saniye çalkalandı.
- Mikrotitrasyon kabının üzeri streç film ile kaplandıktan sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
- Mikrotitrasyon kabı okuyucusunda (BioRad ELISA okuyucu) 595 nm'de gerçekleştirilen okuma işleminde kör örneğin verdiği absorbans ile okuyucu cihaz sıfırlanarak, protein standartlarının ve örneklerin verdikleri absorbans değerleri belirlendi.
- Protein standartlarının konsantrasyon değerleri absise (x eksenine), 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri ise ordinata (y eksenine) yerleştirilerek bir grafik oluşturuldu.
- Oluşturulan grafikte eğrinin denklemi $A^{595} = 0.021 + 0.406[\text{BSA}]$ ($y = 0.021 + 0.406x$) ve denklemin doğruluğu $R = 0.99622$ olarak belirlendi. Protein örneklerinin 595 nm'de verdikleri absorbans değerleri belirlenen denkleme yerleştirilerek her birinin protein konsantrasyonu bulundu.

3.2.4 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)

Protein konsantrasyonları belirlenen örnekler SDS-PAGE yöntemi ile molekül

ağırlıklarına göre bantlara ayrıldı. SDS-PAGE’de Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanıldı.

3.2.4.1 SDS-PAGE Jelinin Hazırlanması

Çalışmada ayırma (%12 Akrilamid) ve yükleme (%5 Akrilamid) jellerinden oluşan, kesikli SDS-PAGE mini jeli hazırlandı.

- Elektroforez sisteminin camları ile hazırlanan kasete mikropipet yardımı ile ayırma jeli döküldü ve hava kabarcıklarının kalmaması için jelin üzerine 150 µl bütanol eklendi.
- Polimerizasyon için yaklaşık 45 dakika beklendi, polimerize olan jelin üzerindeki bütanol dökülerek, jel distile su ile birkaç kez yıkandı.
- Ayırma jelinin üzerindeki fazla su, kaset yan çevirilerek kağıt havlu yardımı ile alındı.
- Ayırma jelinin üzerine, hazırlanan yükleme jeli döküldü ve kuyuların oluşumu için kasete polimerizasyondan önce tarak yerleştirildi.
- Yükleme jelinin polimerizasyonundan sonra tarak çıkarıldı ve kaset elektroforez sistemine yerleştirildi.

Çizelge 3.6 Ayırma Jeli (%12 Akrilamid)

ddH ₂ O	1.6 ml
% 30 Akrilamid karışımı	2.0 ml
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 ml
% 10 (w/v) SDS	0.05 ml
% 10 (w/v) APS	0.05 ml
TEMED*	0.002 ml

*(Bio-Rad- N, N, N, N'-Tetra-metil-etilendiamin)

Çizelge 3.7 Yükleme Jeli (% 5 Akrilamid)

ddH ₂ O	1.4 ml
% 30 Akrilamid karışımı	0.33 ml
1 M Tris (pH 6.8)	0.25 ml
% 10 (w/v) SDS	0.02 ml
% 10 (w/v) APS	0.02 ml
TEMED	0.002 ml

3.2.4.2 Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi ve Elektroforez İşlemi

- Protein örnekleri -20 °C'den çıkarılarak buz içine alındı, çözülmeleri sağlandı.
- Mikrosantrifüj tüplerine 1'er µl 1 M DTT konuldu.
- Daha sonra 40 ve 20 µg protein içeren hacimdeki örnekler, mikrosantrifüj tüplerine eklendi.
- Her bir tüpte eşit hacimde örnek karışımı bulunması amacı ile, DTT ve protein örneklerini içeren tüplere hesaplanan hacimlerde özütleme tamponu eklendi.
- Tüpe en son olarak 50:50, 60:40 veya 70:30 oranlarında örnek karışımı:yükleme tamponu olacak şekilde yükleme tamponu eklendi.
- Hazırlanan örnek karışımlarının kısa süre santrifüjlenip, tüm materyelin tüpün dip kısmına toplanması sağlandıktan sonra 95 °C'de 5 dakika denatürasyon işlemi uygulandı.
- Denatürasyondan sonra tüplerin tekrar kısa süreli santrifüjlenmesi ile örnek karışımı jele yüklenmeye hazır hale getirildi.
- Örnekler jele yüklendikten sonra yükleme jelini geçene kadar 70 V'da, ayırma jeli boyunca 160 V'da yürütüldü.

3.2.4.3 SDS-PAGE Jelinin Boyanması

Jellerin boyanmasında Coomassie Boyama ve Gümüş Boyama yöntemleri kullanıldı. Tüm jeller önce Coomassie Boyama yöntemi ile boyandı; ancak daha az protein örneği (20 µg) yüklenmiş olan jellerdeki protein bant görüntüsünün yeterli olmaması nedeni ile aynı jeller, bu boyama işleminden sonra, daha hassas saptama sınırına sahip olan Gümüş Boyama yöntemi ile boyandı.

Coomassie Boyama:

- Elektroforez tamamlandıktan sonra kasetin camları ayrılarak jel çıkarıldı ve oda sıcaklığında gece boyu Coomassie Blue Boyama Solüsyonu içerisinde otomatik çalkalama cihazı ile çalkalandı.
- Boyama işleminin ardından jel, boya solüsyonundan alınarak boya çıkarma solüsyonunda 1-2 saat çalkalandıktan sonra protein bantları görünür hale geldi.
- Boya çıkarma solüsyonu uzaklaştırılarak, yenisi eklendi ve bir süre sonra bantlar daha belirgin hale geldi (Memon vd., 1993a).

Hızlı Coomassie Boyama:

Alternatif olarak hızlı Coomassie Boyama işlemi de uygulandı.

- Boyama solüsyonuna alınan jel, 60 °C’de 30 dakika çalkalandı.
- Boya solüsyonundan alınan jel, boya çıkarma solüsyonu içerisinde 60 °C’de protein bantlar görünür hale gelene kadar çalkalandı.
- Boya çıkarma solüsyonu uzaklaştırılarak, yenisi eklendi ve bir süre sonra bantlar daha belirgin hale geldi.

Gümüş Boyama

- Daha önce Coomassie boyama yöntemi ile boyanan, ancak belirgin protein bant görüntüsü elde edilemeyen jeller, gümüş boyama için hazırlanmış olan boya çıkarma solüsyonuna alınarak 1-2 dakika çalkalandı ve Coomassie boya uzaklaştırıldı.
- Çift distile su içerisinde 3 kez 10’ar dakika çalkalandı.
- DTT solüsyonunda 30 dakika çalkalandı.
- Çift distile su içerisinde kısa süreli çalkalandı.
- AgNO₃ solüsyonunda 30 dakika çalkalandı.
- Çift distile su içerisinde kısa süreli çalkalandı.
- Görüntü oluşturma solüsyonu 2 kez uygulanarak görüntü oluşuncaya kadar, kısa süreli çalkalandı.
- Görüntü oluşumu, durdurma solüsyonu ile durduruldu.
- “Farmer’s Reducer” boya çıkarma solüsyonunda en iyi bant görüntüsü elde edilinceye kadar çalkalandı.
- Boya çıkarma işlemi, çift distile su içerisinde yapılan çalkalama işlemi ile durduruldu.

3.2.4.4 SDS-PAGE Jellerinin Kurutulması

Jeller boyama işleminden sonra, jel kurutma sisteminde “Cellophane Support” (Bio-Rad) tabakaları kullanılarak kurutuldu. Jeller kurutma işleminden önce çift distile su içerisinde

birkaç saat çalkalandı. Kurutma sisteminin boyutlarında kesilen “cellophane” tabakalar çift distile su içerisinde su ile doyurulduktan sonra, bir tabakası kurutma sisteminin üzerine yayıldı, bu tabakanın üzerine jel konulduktan sonra bunun üzerine diğer “cellophane” tabakası kaplandı. Son olarak kurutma sisteminin diğer parçası en üste konularak kenarlardan mandallarla tutturularak, gece boyu kurumaya bırakıldı.

3.2.5 Western Blot

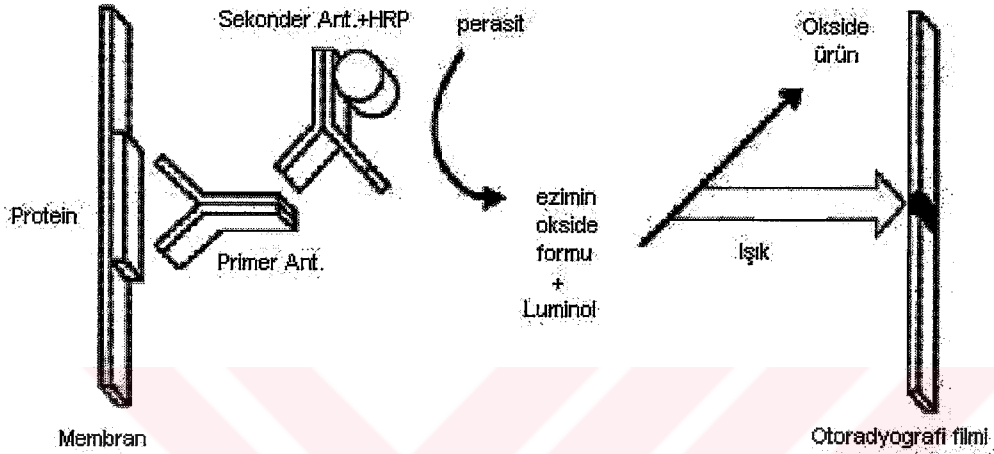
SDS-PAGE yöntemi ile molekül ağırlıklarına göre bantlarına ayrılan proteinler, immünolojik belirlemede kullanılmak üzere 0.45 µm por çapındaki PVDF membrana (Millipore) aktarıldı. Bio-Rad Islak Western Blotlama cihazı kullanıldı.

- Sistemin pedleri transfer tamponu içinde ıslatıldı ve hava kabarcıkları alındı. PVDF membran metanolde 5 dakika bekletildi.
- Kasetin bir yüzeyine, hava kabarcıkları uzaklaştırılmış olan pedlerden biri ve üzerine, jelin boyutlarına göre kesilmiş ve transfer tamponu ile ıslatılmış olan 3 mm Wattmann kağıdı yerleştirildi.
- Wattmann kağıdının üzerine, elektroforez ile bantlarına ayrılmış olan proteinleri içeren jel, jelin üzerine de sıra ile membran, ikinci Wattmann kağıdı ve ikinci ped yerleştirildi. Membran yerleştirilmeden önce metanolden alınarak birkaç saniye transfer tamponunda bekletildi.
- Kaset kapatılarak transfer tamponunun bulunduğu transfer tankına yerleştirildi.
- Transfer işlemi +4 °C soğuk odada, 60 dakika süre ile 1 A akımda gerçekleştirildi.
- Protein bantlarının transfer olduğu membran Ponceau S solüsyonunda birkaç dakika boyandı, boya uzaklaştırıldı ve bantlar görünür hale geldikten sonra her örneğe ait bantların eşit olduğunu belirlemek için, görüntüleme cihazında membranın görüntüsü alındı.
- Örneklerle birlikte yüklenmiş olan, molekül ağırlığı bilinen standart protein bantlarının üzeri kurşun kalemle çizildi.
- İmmünolojik belirleme prosedürüne hemen başlanmadığı durumda membran, kuruması önlenecek şekilde streç filme sarılarak +4 °C’de muhafaza edildi.

3.2.6 İmmünolojik Belirleme

İmmünolojik belirlemede ECL (“Enhanced Chemiluminescence”) “Western blotting” belirleme kiti (Amersham) kullanıldı. “ECL Western blotting” belirleme yöntemi, ışık emilimli, radyoaktif olmayan bir yöntem olup, HRP (“Horseradish Peroxidase”) işaretli

antikorlarla doğrudan ya da dolaylı olarak bağlı olan antijenleri belirler. Luminolün fenol gibi kimyasallar varlığında HRP ile oksidasyonu sonucunda ECL reaksiyonu gerçekleştirilir (Şekil 3.4). Bu reaksiyon sonucunda meydana gelen ışıma 60 dakika sürer (Amersham Biosciences, 2002).



Şekil 3.4 İmmunolojik belirleme yöntemi (Amersham Biosciences, 2002)

- Proteinlerin transfer edildiği membran, özgün olmayan bağlanma bölgelerini bloke etmek amacı ile bloklama solüsyonu içerisinde oda sıcaklığında 1 saat veya +4 °C soğuk odada gece boyu çalkalandı. Sonraki tüm inkübasyon ve yıkama işlemleri oda sıcaklığında, otomatik çalkalayıcı üzerinde gerçekleştirildi.
- Bloklama solüsyonu uzaklaştırılarak, membran PBST ile iki kez 2'şer dakika süre ile yıkandı.
- Membran, primer antikor solüsyonu ile 60 dakika inkübe edildi.
- PBST ile 3 kez 20'şer dakika yıkama yapıldı.
- Membran, Sekonder antikor solüsyonu ile 30 dakika süre ile inkübe edildi.
- PBST ile 3 kez 20'şer dakika yıkama yapıldı.

- ECL belirleme kitinin içinde yer alan solüsyon 1 ve solüsyon 2 membranın üzerini kaplamaya yetecek kadar (0.125 ml/cm^2 membran), eşit hacimlerde karıştırılarak belirleme solüsyonu hazırlandı.
- Temiz bir cam yüzeye alınan membranın üzerine, mikropipet yardımı ile belirleme solüsyonu uygulandı ve membran ters çevrilerek 3 dakika inkübe edildi.
- Işıma reaksiyonu başlamış olan membran, özgün ışımının belirlenmesi amacı ile kasete alınarak üzeri asetat kağıdı ile kaplandı.
- Kaset karanlık odaya götürülerek burada, üzeri asetat kağıdı ile kaplı membran üzerine X –OMAT otoradyografi filmi (Kodak) yerleştirildi.
- Film her deney için optimize edilen süre boyunca kasette bırakıldıktan sonra, karanlık odada, film banyo işlemi yapıldı. Geliştirme solüsyonunda (Kodak) 2 dakika, distile suda 1 dakika ve Fiksativte (Kodak) 7 dakika süre ile bekletildi. Görüntü oluşumu gözlendikten sonra, fiksativten alınan film akan suda 5 dakika süre ile yıkandı ve en son olarak distile sudan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

4. BULGULAR

4.1 Bitki Ekim Koşullarının Belirlenmesi

Yapılan ilk ekim işlemlerinde, sterilizasyon işleminin hemen ardından toprağa ekim işlemi gerçekleştirildi; ancak bu durumda çok düşük bir çimlenme yüzdesi (% 15-20) gözlemlendi. Bu nedenle yüzey sterilizasyonundan sonra tohumlar steril distile su içinde, otomatik çalkalayıcı üzerinde gece boyu bırakıldı. Gece boyu su içinde kalan tohumların testalarında gevşeme, hatta bazılarında radikula oluşumunun başladığı gözlemlendi. Bu durumdaki tohumlar toprağa ekildiğinde çok daha fazla çimlenme oranı (% 60- 70) elde edildi.

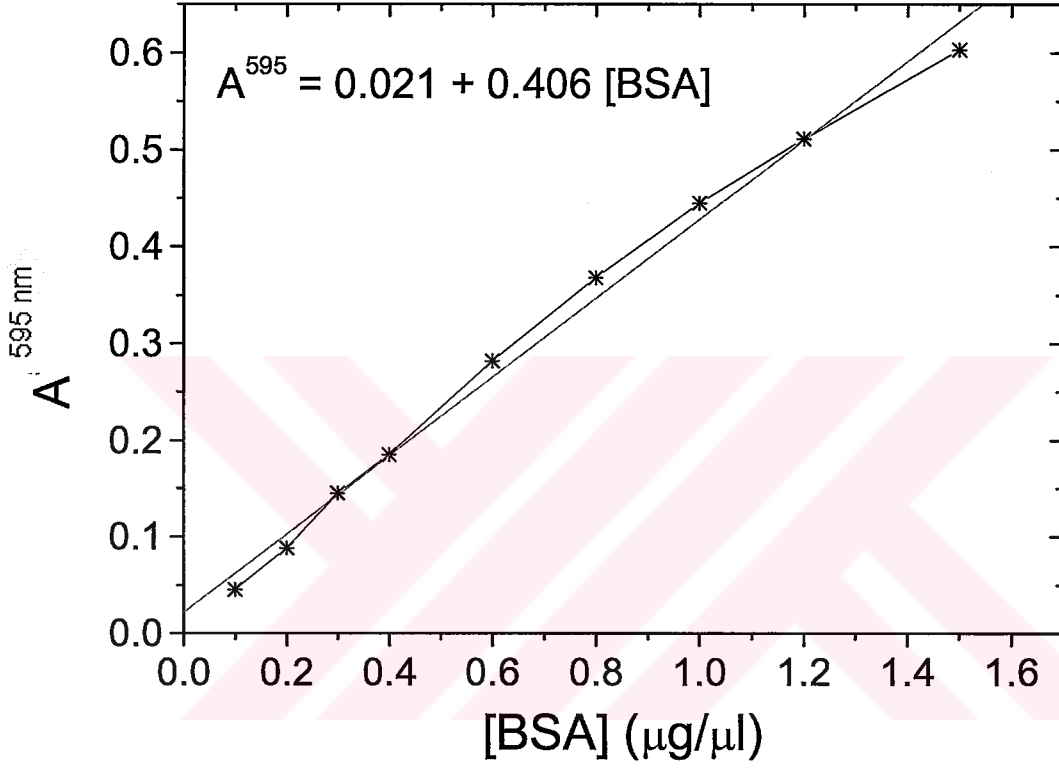
4.2 Farklı Fraksiyonlara Ait Örneklerin Protein Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen tüm süpernatant ve pellet fraksiyonlarının protein konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile hazırlanan standart protein örneklerinin konsantrasyon değerleri ve 595 nm’de verdikleri absorbans değerlerine (Çizelge 4.1) göre bir kalibrasyon eğrisi çizildi (Şekil 4.1). Eğri denklemi belirlendi ve bu denkleme göre örneklerin protein konsantrasyonları 3.2.3’de açıklanan yöntemle belirlendi.

Denklemin doğruluk değeri $R=0.99622$ bulunmuştur.

Çizelge 4.1 Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesinde kullanılan standart proteinlerin konsantrasyon ve 595 nm’de verdikleri absorpsiyon değerleri.

Standart protein (BSA)	A_{595}	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Standart protein 1	0.045	0.1
Standart protein 2	0.088	0.2
Standart protein 3	0.142	0.3
Standart protein 4	0.185	0.4
Standart protein 5	0.282	0.6
Standart protein 6	0.368	0.8
Standart protein 7	0.445	1
Standart protein 8	0.511	1.2
Standart protein 9	0.603	1.5



Şekil 4.1 BSA standartlarının 595 nm’de verdikleri absorbans değerlerine göre çizilen kalibrasyon eğrisi. R=0.99622

Çizelge 4.2 *M. truncatula* yaprak, kök ve gövde örneklerinin (1/30 dilüsyon) 595 nm'deki absorbans değerleri ve protein konsantrasyonları (T.H: Toplam Homojenat, spn:süpernatant, pell: pellet)

Protein Örnekleri	A ₅₉₅	Konsantrasyon (µg/µl)
Yaprak, 2.5 ay, T.H.	0.163	0.350
Yaprak, 3.5 ay, T.H.	0.213	0.473
Yaprak, 6.5 ay, T.H.	0.193	0.423
Yaprak, 2.5 ay, 13000 g spn	0.141	0.296
Yaprak, 3.5 ay, 13000 g spn	0.121	0.246
Yaprak, 6.5 ay, 13000 g spn	0.168	0.362
Yaprak, 2.5 ay, 13000 g pell	0.254	0.574
Yaprak, 3.5 ay, 13000 g pell	0.143	0.300
Yaprak, 6.5 ay, 13000 g pell	0.145	0.305
Gövde, 2.5 ay, T.H.	0.125	0.256
Gövde, 3.5 ay, T.H.	0.100	0.194
Gövde, 6.5 ay, T.H.	0.101	0.197
Gövde, 2.5 ay, 13000 g spn	0.098	0.190
Gövde, 3.5 ay, 13000 g spn	0.085	0.158
Gövde, 6.5 ay, 13000 g spn	0.122	0.249
Gövde, 2.5 ay, 13000 g pell	0.142	0.298
Gövde, 3.5 ay, 13000 g pell	0.088	0.165
Gövde, 6.5 ay, 13000 g pell	0.128	0.263
Kök, 2.5 ay, T.H.	0.056	0.086
Kök, 3.5 ay, T.H.	0.061	0.098
Kök, 6.5 ay, T.H.	0.078	0.140
Kök, 2.5 ay, 13000 g spn	0.039	0.044
Kök, 3.5 ay, 13000 g spn	0.047	0.064
Kök, 6.5 ay, 13000 g spn	0.081	0.147
Kök, 2.5 ay, 13000 g pell	0.038	0.042
Kök, 3.5 ay, 13000 g pell	0.138	0.288
Kök, 6.5 ay, 13000 g pell	0.137	0.286

4.3 *Medicago truncatula*'da ARF1 ve SAR1 Proteinlerinin Nodülasyona Bağlı ve Farklı Bitki Kısımlarındaki Düzeylerinin İncelenmesi

Rhizobium bulunan ve bulunmayan ortamda yetiştirilen bitkilerden; *Rhizobium*'lu ortamda yetişen gurbun köklerinde nodül oluşumu gözlemlendi, diğur gurupta ise böyle bir oluşuma rastlanmadı.

Nodüllü ve nodülsüz bitkilerin kök, gövde ve yaprak kısımlarından özütlenen ve santrifüj işlemi sonunda elde edilen farklı fraksiyonlara ait proteinler 3.2.4'de açıklanan biçimde SDS-PAGE ile ayrıştırıldı. Jeli boyama işleminin sonucunda, örneklerdeki protein konsantrasyonlarının belirlenmesi ile elde edilen verilere göre, jele yüklenen belirli miktardaki proteinlerin jelin her kuyusunda eşit miktarlarda olduğu gözlemlendi.

İki set halinde hazırlanan jellerden biri protein bantlarını görüntülemek amacı ile boyandı, diğesindeki proteinler ise 3.2.5'de açıklanan biçimde "Western Blot" tekniğı ile PVDF membrana aktarıldı. Tüm kuyulardaki bantların membrana eşit şekilde aktarıldığı, Ponceau S boyama işlemi ile belirlendi. Bu membrana 3.2.6'da açıklanan biçimde ARF1 ve SAR1 antikorları kullanılarak immünoojik belirleme işlemi uygulandı. İmmünoojik belirleme işlemi sonucunda, SDS-PAGE ile bantlarına ayrıştırılan protein örneklerindeki ARF1 ve SAR1 proteinlerine özgün bantlar ve bu iki proteinin farklı örneklerdeki düzeyleri karşılaştırmalı olarak belirlendi.

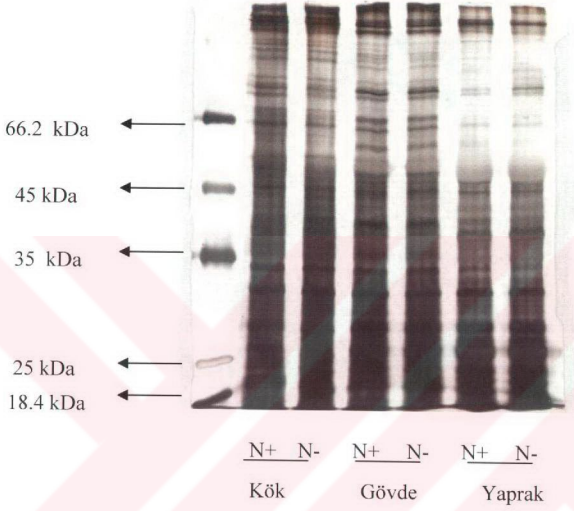
4.3.1 2.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

2.5 aylık nodüllü ve nodülsüz bitkiden elde edilen farklı bitki kısımlarına ait protein örnekleri jele yan yana yüklenerek, nodül oluşumunun farklı bitki kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 düzeylerine etkisi incelendi.

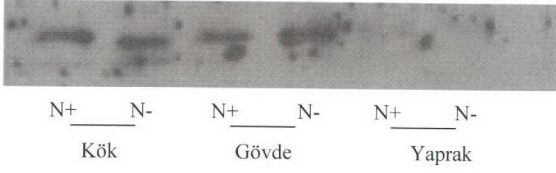
Nodül gelişiminin etkisinin yanında, aynı zamanda farklı bitki kısımlarına ait örnekler de yan yana yüklenmiş olduğundan; nodül etkisi göz önüne alınmaksızın, farklı bitki kısımları arasındaki ARF1 ve SAR1 düzeyleri de bu uygulama ile gözlemlendi.

4.3.1.1 2.5 Aylık Bitkilere Ait Toplam Homojenat Örnekleri ile Yapılan Çalışma

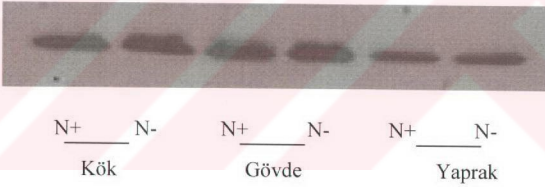
Aynı bitki kısımlarının nodüllü ve nodülsüz örneklerinde SAR1 ve ARF1 düzeylerinde belirgin bir fark gözlenmedi; ancak nodül oluşumu etkisinin dışında, farklı bitki kısımları arasında SAR1 düzeyinde fark gözlemlendi. Kök ve gövde kısımlarında SAR1 düzeyinin yüksek, yaprak kısmında en düşük olduğu gözlemlendi. ARF1 düzeyinde böyle belirgin bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.3, 4.4). Jeldeki her kuyuya Şekil 4.2'deki planda 40µg protein yüklendi.



Şekil 4.2 *M. truncatula*'dan 2.5 ay sonunda nodüllü ve nodülsüz bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama işleminin uygulandığı jel (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı).



Şekil 4.3 *M. truncatula* 2.5 ay, Toplam Homojenat örnekleri için SAR1 antikorunu kullanarak gerçekleştirilen immünojenetik belirlemenin sonucu. (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı. N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı).

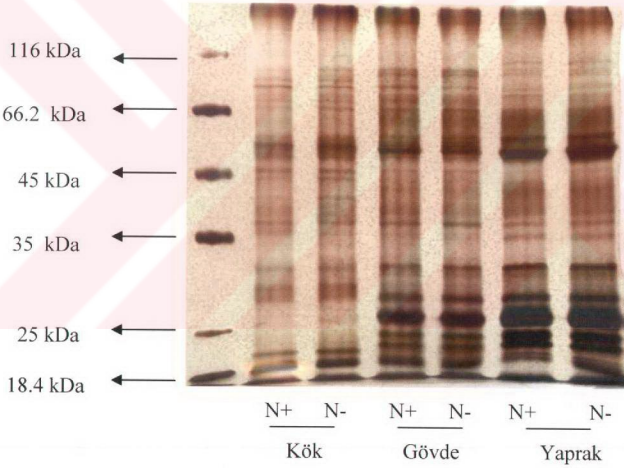


Şekil 4.4 *M. truncatula* 2.5 ay, Toplam Homojenat örnekleri için ARF1 antikorunu kullanarak gerçekleştirilen immünojenetik belirlemenin sonucu. (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı. N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı).

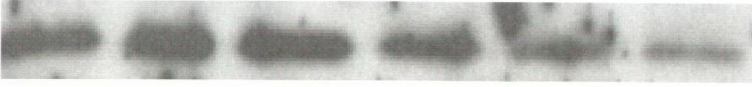
4.3.1.2 2.5 Ay Bitkilere Ait 13000 Pellet Örnekleri ile Yapılan Çalışma

13000 g pellet örnekleri içerisinde kök kısımlarına ait olanlar, seyreltik olmaları nedeni ile jele Şekil 4.5'deki planda 20 µg yüklenebildi; diğer örneklerden 40 µg yüklendi. SAR1 antikor kullanılarak gerçekleştirilen immünolojik belirleme sonucunda, kök örnekleri diğer bitki kısımlarına ait protein örneklerinin yarı miktarı kadar yüklenmesine karşın; en fazla sinyali vermiştir. SAR1 düzeyinin en düşük yaprak kısımlarında olduğu gözlemlendi. ARF1 düzeylerinde belirgin farklılık gözlenmedi.

Aynı bitki kısımlarının nodüllü ve nodülsüz örneklerinde, SAR1 ve ARF1 düzeylerinde belirgin bir fark gözlenmedi (Şekil 4.6, 4.7).



Şekil 4.5 *M. truncatula*'dan 2.5 ay sonunda nodüllü ve nodülsüz bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama işlemi uygulanan jel. (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı. N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı).



N+ _____ N-
Kök

N+ _____ N-
Gövde

N+ _____ N-
Yaprak

Şekil 4.6 *M. truncatula* 2.5 ay, 13000 g pellet örnekleri için SAR1 antikorunu kullanımı ile gerçekleştirilen immünojenik belirlemenin sonucu. (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı. N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda bitkiden elde edilen bitki kısmı).



N+ _____ N-
Kök

N+ _____ N-
Gövde

N+ _____ N-
Yaprak

Şekil 4.7 *M. truncatula* 2.5 ay, 13000 g pellet örnekleri için ARF1 antikorunu kullanımı ile gerçekleştirilen immünojenik belirlemenin sonucu. (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı. N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı).

4.3.1.3 2.5 Aylık Bitkilerin Yaprak ve Kök Kısımlarına Ait Süpernatant ve Pellet Örneklerinin Karşılaştırılması

Nodüllü ve nodülsüz bitki örneklerinde nodül gelişimine bağlı ARF1 ve SAR1 düzeylerinde fark görülmedi. 13000 g pellet ve süpernatant fraksiyonları arasında ARF1 düzeylerinde bir fark olmadığı (Şekil 4.8); SAR1 düzeylerinin kök ve yaprak kısımlarının pellet fraksiyonlarında daha yüksek olduğu (Şekil 4.9) gözlemlendi.



pell spn

pell spn

pell spn

pell spn

N+ Kök

N- Kök

N+ Yaprak

N- Yaprak

Şekil 4.8 *M. truncatula* 2.5 ay 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri için ARF1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünolojik belirlemenin sonucu (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı, pell: pellet, spn: süpernatant).



pell spn

pell spn

pell spn

pell spn

N+ Kök

N- Kök

N+ Yaprak

N- Yaprak

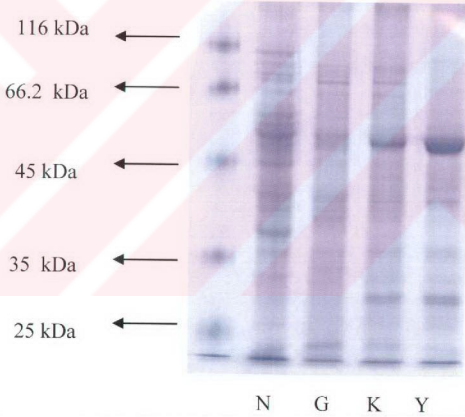
Şekil 4.9 *M. truncatula* 2.5 ay 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri için SAR1 antikoru kullanımı ile gerçekleştirilen immünolojik belirlemenin sonucu (N+: *Rhizobium* içeren ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: *Rhizobium* içermeyen ortamda yetişen bitkiden elde edilen bitki kısmı, pell: pellet, spn: süpernatant).

4.3.2 3.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

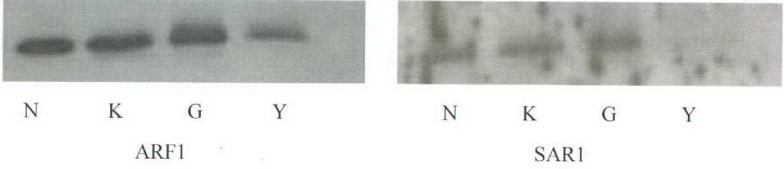
4.3.2.1 3.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

Farklı bitki kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 düzeyleri Toplam Homojenat ve 13000 g pellet örneklerinde incelendi. Toplam Homojenat örneklerinin ARF1 ve SAR1 düzeylerinde nodül, kök ve gövde kısımları için belirgin bir fark olmadığı; yaprak kısımlarında ise her iki protein düzeylerinin diğer bitki kısımlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).

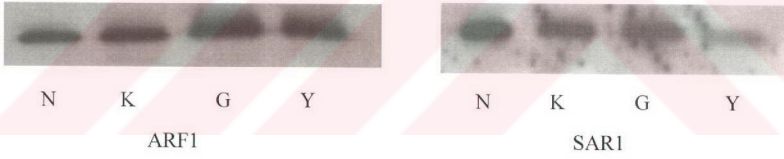
13000g pellet örneklerinde tüm bitki kısımlarında ARF1 düzeyinin değişmediği, yaprak dışındaki bitki kısımlarında SAR1 düzeylerinin aynı olduğu, yaprak için SAR1 düzeyinin diğer bitki kısımlarına göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12). Örnekler jelle Şekil 4.10'da görülen planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi.



Şekil 4.10 *M. truncatula*'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda Commasie boyama işleminin uygulandığı jel (K: Kök, N: Nodül, G: Gövde, Y: Yaprak).



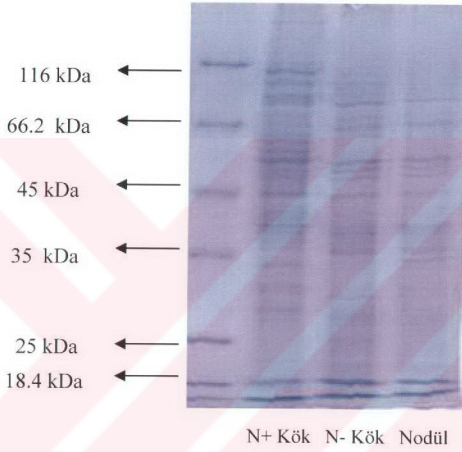
Şekil 4.11 *M. truncatula*'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin immünolojik belirleme sonucu ARF1 ve SAR1 düzeylerindeki farklar (K: Kök, N: Nodül, G: Gövde, Y: Yaprak).



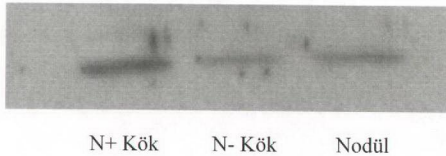
Şekil 4.12 *M. truncatula*'dan 3.5 ay sonunda nodüllü bitkilerden elde edilen bitki kısımlarına ait 13000 g pellet örneklerinin immünolojik belirleme sonucu ARF1 ve SAR1 düzeylerindeki farklar (K: Kök , N: Nodül, G: Gövde, Y: Yaprak).

4.3.2.2 3.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Kök ve Nodül Kısımları ile Nodülsüz Bitkilerin Kök Kısımlarındaki SAR1 Düzeylerinin Karşılaştırılması

3.5 aylık bitkilerden nodüllü olanların kök ve nodül kısımları ile nodülsüz bitkilerin kök kısımlarına ait 250000 g pellet örnekleri kullanılarak bu bitki kısımlarındaki SAR1 düzeyleri karşılaştırıldı. Örnekler jele Şekil 4.13'de görülen planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi. 25000 g pellet fraksiyonunda nodüllü köklerde SAR1 düzeyinin nodülsüz köke ve nodül kısımlarına göre daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.13 3.5 aylık *M. truncatula*'nın nodül, kök ve nodülsüz bitkiden elde edilen kök kısımlarına ait 250000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulandığı jel (N+: Nodüllü bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı).

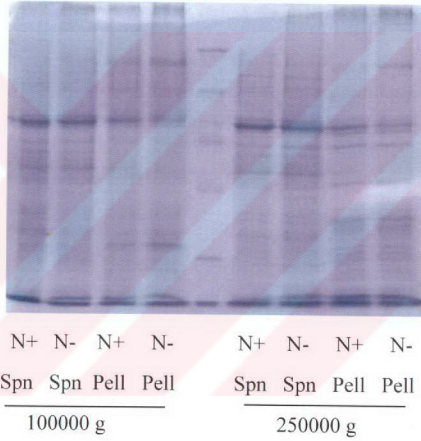


Şekil 4.14 *M. truncatula*'da 3.5 aylık nodüllü bitkiden nodül, kök ve nodülsüz bitkiden elde edilen kök kısımlarına ait 250000 g pellet örneklerinin SAR1 düzeylerindeki farklar (N+: Nodüllü bitki den elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı).

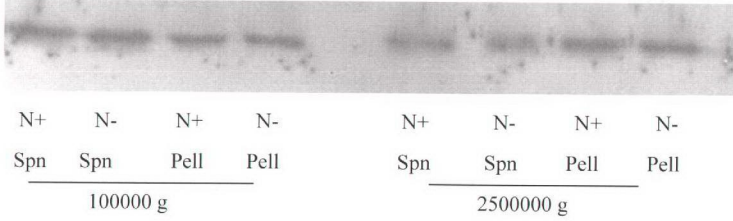
4.3.2.3 3.5 Aylık Nodüllü ve Nodülsüz Bitkilerin Gövde Kısımlarından Elde Edilen 100000 ve 250000 g Örneklerinde SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

100000 ve 250000 g örnekleri jele Şekil 4.15'de görülen planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi.

Nodüllü ve nodülsüz bitkilere ait 100000 ve 250000 g süpernatant ve pellet örneklerinde, SAR1 düzeyinde nodül oluşumuna bağlı bir değişimin olmadığı; ancak fraksiyonlar arasındaki karşılaştırma bakımından 250000 g süpernatant örneklerinin diğer fraksiyonlardan daha düşük SAR1 düzeyine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.16).



Şekil 4.15 3.5 aylık nodüllü ve nodülsüz *M. truncatula*'nın gövde kısımlarına ait 100000 ve 250000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Coomassie boyama işleminin uygulandığı jel (N+: Nodüllü bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı, Spn: Süpernatant, Pell: Pellet).



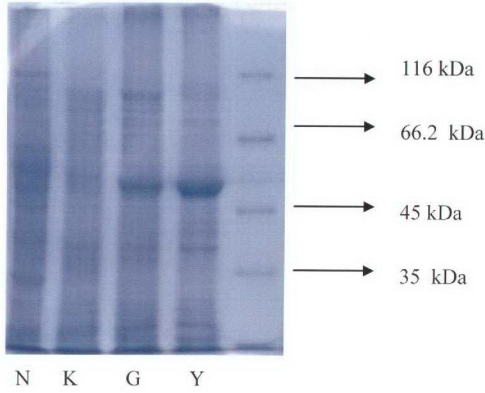
Şekil 4.16 3.5 aylık nodüllü ve nodülsüz *M. truncatula*'nın gövde kısımlarına ait 100000 ve 250000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SAR1 düzeylerinin immünolojik belirleme yöntemi ile analizi (N+: Nodüllü bitkiden elde edilen bitki kısmı, N-: Nodülsüz bitkiden elde edilen bitki kısmı, Spn: Süpernatant, Pell: Pellet).

4.3.3 6.5 Aylık Dönemde Hasat Edilen Bitki Örneklerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

4.3.3.1 6.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin Toplam Homojenat Örneklerinde İncelenmesi

Toplam homojenat örnekleri jele Şekil 4.17'de görülen planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi.

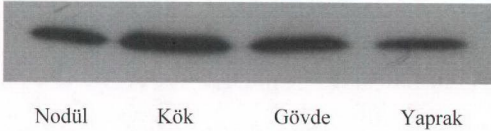
Farklı bitki kısımlarının (Kök, nodül, gövde ve yaprak) toplam homojenat örneklerinde ARF1 düzeylerinde belirgin bir fark olmadığı, SAR1 düzeyinin ise kök kısmında en yüksek, yaprak kısmında en düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18, 4.19).



Şekil 4.17 6.5 aylık *M. truncatula*'nın kök, nodül, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat Örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulanması ile elde edilen görüntü (K: Kök, N: Nodül, G: Gövde, Y: Yaprak)



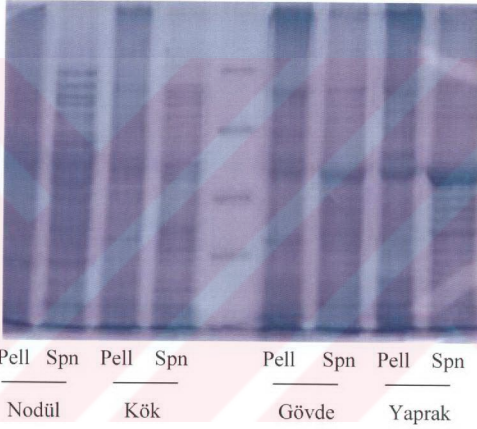
Şekil 4.18 6.5 aylık *M. truncatula*'nın nodül, kök, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin SAR1 protein düzeylerinin immünolojik belirleme ile analizi.



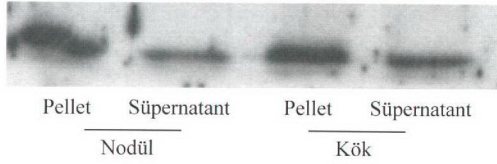
Şekil 4.19 6.5 aylık *M. truncatula*'nın nodül, kök, gövde ve yaprak kısımlarına ait Toplam Homojenat örneklerinin ARF1 protein düzeylerinin immünolojik belirleme ile analizi.

4.3.3.2 6.5 Aylık Nodüllü Bitkilerin Farklı Kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin 13000 g Süpernatant ve Pellet Örneklerinde İncelenmesi

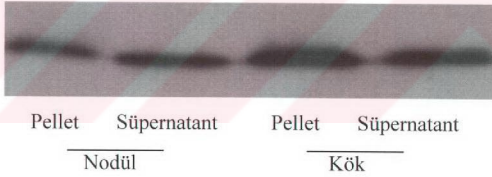
Farklı bitki kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri jele Şekil 4.20’ de görülen planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi. Yaprak dışındaki her bitki kısmı için pellet örneklerinde SAR1 düzeyinin daha yüksek olduğu, yaprak kısmına ait süpernatant ve pellet örneklerinde ARF1 ve SAR1 düzeylerinin diğer bitki kısımlarına göre en düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.21, 4.22, 4.23, 4.24).



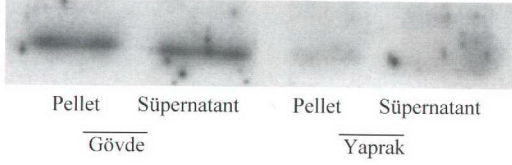
Şekil 4.20 6.5 aylık *M. truncatula*’nın kök, nodül, gövde ve yaprak kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonunda Commasie boyama işleminin uygulanması ile elde edilen görüntü (Pell: Pellet, Spn: Süpernatant).



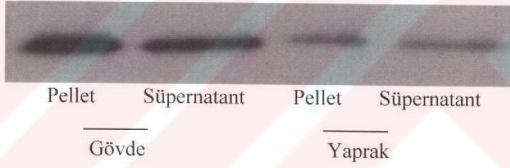
Şekil 4.21 6.5 aylık *M. truncatula*'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde SAR1 düzeylerinin immunolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.



Şekil 4.22 6.5 aylık *M. truncatula*'nın kök ve nodül kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde ARF1 düzeylerinin immunolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.



Şekil 4.23 6.5 aylık *M. truncatula*'nın gövde ve yaprak kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde SAR1 düzeylerinin immunolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.



Şekil 4.24 6.5 aylık *M. truncatula*'nın gövde ve yaprak kısımlarına ait 13000 g süpernatant ve pellet örneklerinde ARF1 düzeylerinin immunolojik belirleme yöntemi ile karşılaştırılması.

4.4 *Medicago truncatula*'da Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Proteinlerinin Düzeylerinin İncelenmesi

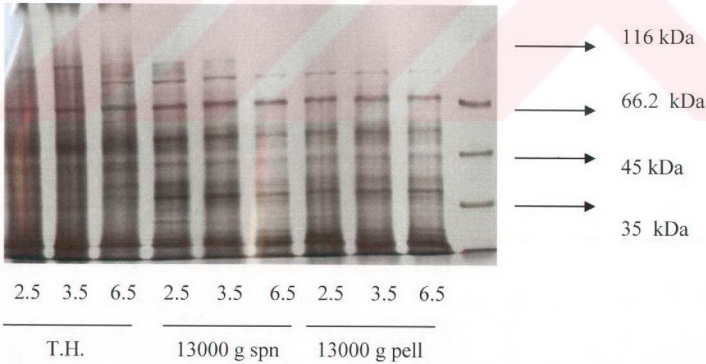
Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık bitkiler arasındaki ARF1 ve SAR1 düzeyleri karşılaştırıldı.

4.4.1 Kök Kısımında Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

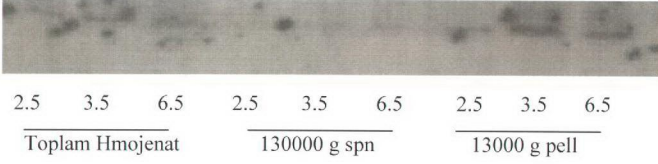
2.5, 3.5 ve 6.5 aylık bitkilerin köklerinden elde edilen Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örnekleri jele Şekil 4.25'deki planda, her kuyuda 20 µg protein olacak şekilde yüklendi.

SAR1 düzeylerinde Toplam Homojenat ve 13000 g süpernatant örneklerinde farklı gelişim evreleri arasında fark olmadığı, 13000 g pellet örneklerinde SAR1 düzeyinin 2.5 ayda diğer gelişim evrelerine göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca, SAR1 düzeyinin tüm gelişim evreleri için 13000 g süpernatant örneklerinde en düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26).

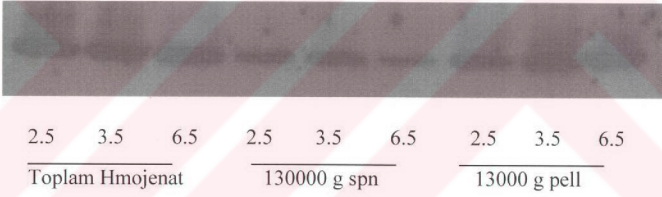
ARF1 düzeylerinde farklı gelişim evreleri arasında belirgin bir farklılık olmadığı; Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri arasında süpernatant örneklerinin daha düşük SAR1 düzeyine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26, 4.27).



Şekil 4.25 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın köklerinde Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama uygulaması ile elde edilen görüntü (pell: Pellet, spn: Süpernatant, T.H: Toplam Homojenat).



Şekil 4.26 Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın köklerinde SAR1 düzeylerinin karşılaştırılması.

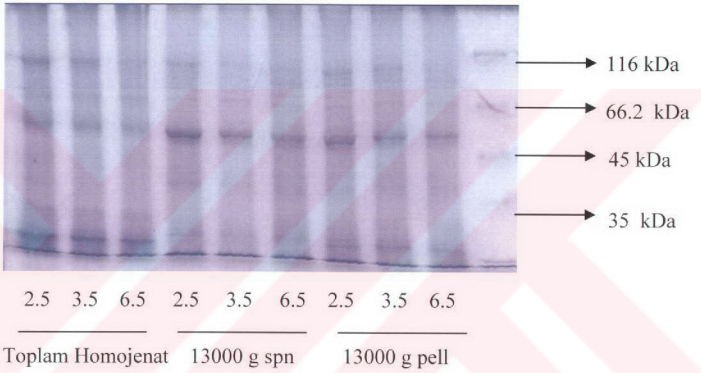


Şekil 4.27 Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın köklerinde ARF1 düzeylerinin karşılaştırılması.

4.4.2 Gövde Kısımında Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

2.5, 3.5 ve 6.5 aylık bitkilerin gövde kısımlarından elde edilen Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örnekleri jele Şekil 4.28 deki planda, her kuyuda 40 µg protein olacak şekilde yüklendi.

13000 g pellet örnekleri arasında, 2.5 ayda SAR1 protein düzeyinin daha fazla olduğu (Şekil 4.29), ARF1 için belirgin bir fark olmadığı (Şekil 4.30) gözlemlendi.



Şekil 4.28 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın gövde kısımlarında Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinin SDS-PAGE analizi sonucunda gümüş boyama uygulaması ile elde edilen görüntü (spn: Süpernatant, pell: Pellet).



2.5	3.5	6.5	2.5	3.5	6.5	2.5	3.5	6.5
Toplam Homojenat			130000 g spn			13000 g pell		

Şekil 4.29 Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın gövde kısımlarında SAR1 düzeylerinin karşılaştırılması.



2.5	3.5	6.5	2.5	3.5	6.5	2.5	3.5	6.5
Toplam Hmojenat			130000 g spn			13000 g pell		

Şekil 4.30 Toplam Homojenat, 13000 g süpernatant ve 13000 g pellet örneklerinde 2.5, 3.5 ve 6.5 aylık *M. truncatula*'nın gövde kısımlarında ARF1 düzeylerinin karşılaştırılması.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *Medicago truncatula* bitkisinde GTP bağlayıcı proteinlerden ARF1 ve SAR1'in varlığı ile bu proteinlerin farklı bitki kısımlarındaki, farklı gelişim evrelerindeki ve nodül gelişimine bağlı olarak değişen düzeyleri incelendi.

Medicago truncatula'da ARF1 ve SAR1'in protein düzeyinde varlığı, bitki gelişim evreleri ve nodül gelişimi üzerindeki rolü ilk kez bu çalışma ile gösterilmiştir.

5.1 *Medicago truncatula*'da Nodül Oluşumunun ARF1 ve SAR1 Düzeylerine Etkisi

2.5 aylık bitki örnekleri kullanılarak yapılan deneyler (4.3.1) sonucu elde edilen verilere göre, *M. truncatula*'nın gelişiminin bu evresinde köklerde ve diğer bitki kısımlarındaki ARF1 ve SAR1 düzeylerine nodül gelişiminin etkisinin olmadığı belirlendi (Şekil 4.3, 4.4, 4.6, 4.7). Aynı zamanda çalışmanın bu bölümünde yaprak dokusundaki ARF1 ve SAR1 düzeyinin diğer dokulara göre çok daha az olduğu belirlendi (5.2). Nodüllü ve nodülsüz bitkiden elde edilen aynı bitki kısımlarına ait protein örneklerinin ARF1 ve SAR1 düzeylerinde farklılık gözlenmedi. Nodül gelişiminin erken evresinde, doku miktarında ve buna bağlı olarak hücre bölünmesinde belirgin bir artış olmaz. Bu nedenle bitkinin bu evresinde vesiküler trafikte ve bunda görev alan ARF1 ve SAR1 düzeylerinde nodül oluşumuna bağlı bir artışın olmayacağı beklenir.

Rhizobium içeren toprakta yetiştirilmiş olan bitkilerin köklerindeki nodüllerin, 3.5 aylık dönemde, protein izolasyonunda kullanılmak üzere köklerden toplanılabilecek boyuta geldiği gözlemlendi.

3.5 aylık bitki örnekleri kullanılarak yapılan deneylerde (4.3.2) ilk olarak nodüllü kökler ile bu köklerden toplanmış nodül dokuları ve nodülsüz bitki kök dokuları arasında, vesikülleri ve bir miktar ER içeren fraksiyonda SAR1 düzeyleri karşılaştırıldığında, nodüllü kök dokusunda SAR1 düzeyinin, tek başına nodül dokusundan ve nodül içermeyen kök dokusundan daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).

3.5 ay sonunda nodül dokusu hacminin arttığı gözlemlendi ve buna bağlı olarak bu dokuda hücre bölünmelerinin, protein sentezinin ve sentezlenen bu proteinlerin ileri yönlü taşınımında görev alan SAR1'in düzeyinde artış olacağı düşünüldü. Gelişimini sürdürmekte olan 3.5 aylık bitkinin kök kısmı da gelişimini sürdürmekte ve kök doku hacmi artmaktadır. Hem kök dokusundaki hem de nodül dokusundaki artışa bağlı olarak en yüksek SAR1 düzeyi, nodül içeren kök dokusunda gözlenmiştir.

Bu görüşe paralel olarak, Memon vd.'nin (yayınlanmamış veri) erken gelişim evresindeki bezelye köklerinin farklı kısımlarında (en uç meristemetik kısım, orta kök kısmı ve üst kök kısmı) yapmış olduğu çalışmada, küçük GTP bağlayıcı proteinlerin düzeyinin meristemetik kök ucu kısmında daha fazla olduğu gözlenmiştir. Meristemetik kök dokusunda diğer kök kısımlarına göre daha fazla hücre bölünmesi olduğundan, bu dokudaki hücrelerde daha fazla protein sentezlenir ve buna bağlı olarak, proteinlerin ileri yönlü taşınımında görev alan SAR1 düzeyinin de diğer kök kısımlarındakine göre daha yüksek olması beklenir.

Cheon vd. tarafından yapılan çalışmada soyafasulyesinde nodül oluşumunda, küçük GTP bağlayıcı proteinlerden Rab1 ve Rab7'nin önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu proteinlerin nodül boyutunda ve azot fiksasyonunda önemli etkisi olduğu ileri sürülmüştür (Cheon vd., 1993). GTP bağlayıcı proteinlerin azot fiksasyonuna bu şekilde bir etkisinin olması, bitki kalitesinin artırılmasında önemlidir. *M. truncatula*'nın nodül bulunan kök kısmında SAR1 düzeyinin fazla olması, bu GTP bağlayıcı proteinin de nodül boyutunda ve azot fiksasyonunda etkili olabileceğini akla getirmektedir.

3.5 aylık nodüllü ve nodülsüz bitkilerin gövde kısmına ait örneklerin ER içeren ve vezikülleri içeren fraksiyonlarında SAR1 düzeyinin incelenmesi sonucunda bu dokudaki SAR1 düzeyinde nodül oluşumuna bağlı bir fark olmadığı belirlendi (Şekil 4.16).

5.2 *Medicago truncatula*'da Farklı Bitki Kısımlarında ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

2.5 aylık bitkilerle yapılan çalışma ile aynı zamanda 2.5 aylık bitkide, farklı bitki kısımları (kök, gövde ve yaprak) arasındaki ARF1 ve SAR1 düzeylerinin karşılaştırması yapıldı. ARF1 düzeyinde belirgin bir fark olmadığı (Şekil 4.4, 4.7); SAR1 düzeyinin nodüllü ve nodülsüz bitki örneklerinin her ikisinin de kök kısımlarında, özellikle membrana bağlı konumda (pellet fraksiyonunda) en fazla, yaprak kısmında ise en düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3, 4.6). Yeni gelişmekte olan bitkilerde kök meristemleri en aktif bölünme geçiren dokulardır; buna bağlı olarak bu dokularda artan protein sentezi ile birlikte ER-Golgi ağı arası vesiküler trafikte artış olduğu; ER-Golgi ağı arası trafiğin önemli bir bileşeni olan SAR1'in köklerdeki yüksek düzeyinin de buna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışma kapsamında tüm evrelere ait, farklı bitki kısımlarının aynı fraksiyonlarındaki protein örnekleri arasında ARF1 düzeylerinde fark gözlenmedi. Bu durumun, ARF1'in ER-Golgi ağı arası COPI vesikülleri dışında, kalatrin örtülü vesiküller tarafından yürütülen hücre içi taşınımında da görev almasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

2.5 ay bitki kısımlarının 13000 g süpernatant ve pellet örnekleri karşılaştırıldığında, SAR1 düzeyinin pellet örneklerinde daha yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9). 13000 g pellet fraksiyonu bir miktar ER içerir; SAR1 bu fraksiyondaki ER'a bağlı durumda, vesikül örtü yapısının oluşumuna katılmış durumdadır. Sitozolik fraksiyonda SAR1 düzeyinin daha az olması bu şekilde açıklanabilir.

3.5 aylık nodüllü bitkilerin kök, gövde, yaprak ve nodül kısımlarında ARF1 ve SAR1 düzeyleri incelendiğinde de 2.5 aylık örneklerle benzer şekilde ARF1 düzeylerinde belirgin bir fark olmadığı, yaprak kısmında SAR1 düzeyinin ise en düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11, 4.12). Kök kısmındaki SAR1 düzeyinin, 2.5 aylık bitkide diğer bitki kısımlarından çok daha yüksek olduğu gözleminin yanında, 3.5 ayda bu farkın azaldığı da gözlenmiştir. Bu durumun kök meristemlerindeki bölünmelerin bitki gelişim evreleri ilerledikçe azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

3.5 aylık farklı bitki kısımları ile yapılan çalışmada nodül kısmının kök kısmı ile aynı ARF1 ve SAR1 düzeyine sahip olduğu belirlendi, buna bağlı olarak nodül dokularında da kök dokusunda olduğu gibi protein sentezinin ve hücre bölünmelerinin yüksek düzeyde olduğu düşünüldü.

6.5 aylık farklı bitki kısımlarında tüm hücre fraksiyonlarını içeren toplam homojenat örneklerinde ve ER içeren fraksiyonda ARF1 ve SAR1 düzeylerinin kök kısmında en fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.18, 4.19). Yaprak hacmindeki artışının en düşük olduğu 6.5 aylık dönemde bu bitki kısmındaki ARF1 ve SAR1 düzeyinin diğer bitki kısımlarına göre en düşük olduğu gözlemlendi. 6.5 aylık dönemde hasat edilen bitkilerin köklerindeki nodüllerin çoğunun yapılarının bozulmaya başladığı gözlemlendi. Ayrıca bu evrede elde edilen nodüllerin boyutlarında 3.5 aylık döneme göre bir artış gözlenmedi. Bitkilerin hasat edildiği bu ileri evrede nodül dokusu artışının durduğu, buna bağlı olarak bu kısımlarda daha önceki gelişim evresine göre vesiküler trafiğin ve bunda görev alan proteinlerden ARF1 ve SAR1'in düzeyinde de azalma olduğu düşünülmektedir.

5.3 *Medicago truncatula*'da Farklı Gelişim Evrelerinde ARF1 ve SAR1 Düzeylerinin İncelenmesi

2.5, 3.5 ve 6.5 aylık bitki örneklerinin kök kısımlarına ait ER fraksiyonunda SAR1 düzeyinin 2.5 aylık gelişim evresine göre, 3.5 aylık dönemde daha fazla olduğu; gövde kısmında ise ER içeren fraksiyonda 2.5 ayda SAR1 protein düzeyinin daha fazla olduğu gözlemlendi (Şekil 4.26, 4.29). Bitkide hücre bölünmelerinin oldukça sık gerçekleştiği kök kısmında gelişim evresi

ilerledikçe, artan doku miktarına paralel olarak, protein sentezi ve bu proteinlerin taşınımında görev alan vesiküllerin yapısına katılan SAR1 düzeyinde de artış olacaktır. Tek yıllık bir bitki olan *M. truncatula*'da ilerleyen hasat dönemindeki bitkiler gelişimlerini büyük ölçüde tamamlamışlardır. Bu sebeple kök dokusunda SAR1 düzeyinin 6.5 aylık dönemde 3.5 aylık döneme göre daha düşük olmasının, 6.5 aylık dönemde bitkideki protein sentez ve taşınımının daha az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bitkilerde hücre içi taşınım olayları ve bunda görev alan proteinler hakkındaki bilgiler yalnız bitki hücrelerindeki çalışmalar için değil; tüm ökaryotik hücrelerdeki çalışmalar için önemlidir. Erken salgı yolundaki taşınımında önemli rolü olan ARF1 ve SAR1 proteinlerinin bitkilerdeki işlevlerini anlamada ilk adımı oluşturan bu çalışma, aynı zamanda *Leguminosae* (Baklagil) ailesi bitkilerinde nodül yapısının oluşumunun hücre içi vesiküler trafiğe etkisini anlamada önemli veriler sağlamıştır. GTP bağlayıcı proteinlerin azot fiksasyonuna etkisinin daha iyi belirlenmesi ile baklagil bitkilerinin protein miktar ve kalitesinin artırılması kolaylaşacaktır.

KAYNAKLAR

Amersham Biosciences, (2002), "Principles of ECL Western Blotting".

Amor, J.C., Harrison, D.H., Kahn, R.A. ve Ringe, D., (1994), "Structure of the Human ADP-Ribosylation Factor 1 Complexed with GDP", *Nature*, 372:704-708.

Aniento, F., Helms, B. ve Memon, A.R., (2003), "The Golgi Apparatus and The Plant Secretory Pathway", Blackwell, 36-62.

Antonny, B., Schekman, R., (2001), "ER Export: Public Transportation by the COPII Coach", *Current Opinion in Cell Biology*, 13:438-443.

Aridor, M., Fish, K.N., Bannykh, S., Weissman, J., Roberts, T.H., Lippincott-Schwartz, J. ve Balch, W.E., (2001), "The Sar1 GTPase Coordinates Biosynthetic Cargo Selection with Endoplasmic Reticulum Export Site Assembly", *The Journal of Cell Biology*, 152:213-229.

Balch, W.E., Kahn, R.A. ve Schwaninger, R., (1992), "ADP-Ribosylation Factor Is Required for Vesicular Trafficking between the Endoplasmic Reticulum and the *cis*-Golgi Compartment", *The Journal of Biological Chemistry*, 267:13053-13061.

Barlowe, C. ve Schekman, R., (1993), "SEC12 Encodes a Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Essential for Transport Vesicle Budding from the ER", *Nature*, 365:347-349.

Barlowe, C., (1995), "COPII: A Membrane Coat That Forms Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles", *FEBS Letters*, 369:93-96.

Barlowe, C., (2000), "Traffic COPs of the Early Secretory Pathway", *Traffic*, 1:371-377.

Barlowe, C., (2002), "COPII-Dependent Transport from the Endoplasmic Reticulum", *Current Opinion in Cell Biology*, 14:417-422.

Barlowe, C., (2003), "Signals for COPII-Dependent Export From the ER: What's the Ticket Out?", *Trends in Cell Biology*, 13:295-300.

Barr, F. ve Huttner, W.B., (1996), "A Role For ADP-Ribosylation Factor 1, But Not COP I, in Secretory Vesicle Biogenesis From the *trans*-Golgi Network", *FEBS Letters*, 384:65-70.

Béraud-Dufour, S., Paris, S., Chabre, M. ve Antonny, B., (1999), "Dual Interaction of ADP Ribosylation Factor 1 with Sec7 Domain and with Lipid Membranes during Catalysis of Guanine Nucleotide Exchange", *The Journal of Biological Chemistry*, 274:37629-37636.

Chardin, P., Paris, S., Antonny, B., Robineau, S., Béraud-Dufour, S., Jackson, C.L. ve Chabre, M., (1996), "A Human Exchange Factor for ARF Contains Sec7- and Pleckstrin-Homology Domains", *Nature*, 384:481-484.

Cheon, C., Lee, N.G., Siddique, A. M., Bal, A. K. ve Verma, D. P. S., (1993), "Roles of Plant Homolgs of Rab1p and Rab7 in the Biogenesis of the Peribacteroid Membrane, a Subcellular Compartment *de novo* During Root Nodule Symbiosis", *EMBO Journal*, 12:4125-4135.

Contreras, I., Ortiz-Zapater, E., Castilho, L.M. ve Aniento, F., (2000), "Characterization of Cop I Coat Proteins in Plant Cells", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273:176-182.

d'Enfert, C., Wuestehube, L.J., Lila, T. ve Schekman, R., (1991), "Sec12p-Dependent

Membrane Binding of the Small GTP-binding Protein Sar1p Promotes Formation of Transport Vesicles from the ER", *The Journal of Cell Biology*, 114:663-670.

Denzel, A., Otto, F., Girod, A., Pepperkok, R., Watson, R., Rosewell, I., Bergeron, J.J.M., Solari, R.C.E. ve Owen, M.J., (2000), "The p24 Family Member p23 is Required for Early Embryonic Development", *Current Biology* 10:55-58.

Donaldson, J.G. ve Jackson C.L., (2000), "Regulators and Effectors of the ARF GTPases", *Current Opinion in Cell Biology*, 12:475-482.

Dupree, P. ve Sherrier D.J., (1998), "The Plant Golgi Apparatus", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1404:259-270.

Franco, M., Chardin, P., Chabre, M. ve Paris, S., (1996), "Myristoylation-facilitated Binding of the G Protein ARF1_{GDP} to Membrane Phospholipids Is Required for Its Activation by a Soluble Nucleotide Exchange Factor", *The Journal of Biological Chemistry*, 271:1573-1578.

Franco, M., Boretto, J., Robineau, S., Monier, S., Goud, B., Chardin, P. ve Chavrier, P., (1998), "ARNO3, a Sec7-domain Guanine Nucleotide Exchange Factor for ADP Ribosylation Factor 1, is Involved in the Control of Golgi Structure and Function", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:9926-9931.

Gatz, C., (1995), "Methods in Cell Biology", Academic Pres., U.S.A.

Goldberg, J., (1998), "Structural Basis for Activation of ARF GTPase: Mechanisms of Guanine Nucleotide Exchange and GTP-Myristoyl Switching", *Cell*, 95:237-248.

Goldberg, J., (1999), "Structural and Functional Analysis of the ARF1-ARFGAP Complex Reveals a Role for Coatamer in GTP Hydrolysis", *Cell*, 96:893-902.

Gommel, D., Orci, L., Emig, E.M., Hannah, M.J., Ravazzola, M., Nickel, W., Helms, J.B., Wieland, F.T. ve Sohn, K., (1999), "p24 and p23, the Major Transmembrane Proteins of COPI-coated Transport Vesicles, Form Hetero-oligomeric Complexes and Cycle Between the Organelles of the Early Secretory Pathway", *FEBS Letters*, 447:179-185.

Gommel, D.U., Memon, A.R., Heiss, A., Lottspeich, F., Pfannstiel, J., Lechner J., Reinhard, C., Helms J.B., Nickel W. ve Wieland F.T., (2001), "Recruitment to Golgi Membranes of ADP-Ribosylation Factor 1 is Mediated by the Cytoplasmic Domain of p23", *The EMBO Journal*, 20:6751-6760.

Grierson, D. ve Covey, S.N., (1988), "Plant Molecular Biology", Blackie, New York, 123-140.

Györgyey, J., Vaubert, D., Jiménez-Zurdo, J.I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, A. ve Kondorosi, E., (2000), "Analysis of Medicago truncatula Nodule Expressed Sequence Tags", *The American Phytopathological Society*, 13:62-71.

Hadlington, J.L. ve Denecke, J., (2000), "Sorting of Soluble Proteins in the Secretory Pathway of Plants", *Current Opinion in Plant Biology*, 3:461-468.

Harter, C. ve Wieland, F., (1996), "The Secretory Pathway: Mechanisms of Protein Sorting and Transport", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1286:75-93.

Harter, C. ve Wieland, F.T., (1998), "A Single Binding Site for Dilysine Retrieval Motifs and p23 within the γ Subunit of Coatamer", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:11649-11654.

- Hosaka, M., Toda, K., Takatsu, H., Torii, S., Murakami, K. ve Nakayama, K., (1996), "Structure and Intracellular Localization of Mouse ADP-Ribosylation Factors Type 1 to 6 (ARF1-ARF6)", *J. Biochem.*, 120:813-819.
- Hunziker, W., Whitney, J.A. ve Mellman, I., (1992), "Brefeldin A and the Endocytic Pathway", *FEBS*, 307:93-96.
- Jürgens, G. ve Geldner, N., (2002), "Protein Secretion in Plants: from the *trans*-Golgi Network to the Outer Space", *Traffic*, 3:605-613.
- John, M., Röhrig, H., Schmidt, J. Ve Schell, J., (1995), "Molecular Biology In The Land of Nodules", *Biofutur-Février*, 19-21.
- Kahn, R.A., Randazzo, P., Serafini, T., Weiss, O., Rulka, C., Clark, J., Amherdt, M., Roller, P., Orci, L. ve Rothman, J.E., (1992), "The Amino Terminus of ADP-ribosylation Factor (ARF) Is a Critical Determinant of ARF Activities and Is a Potent and Specific Inhibitor of Protein Transport", *The Journal of Biological Chemistry*, 267:13039-13046.
- Kirchhausen, T., (1999), "Adaptors for Clathrin-Mediated Traffic.", *Annu. Rev. Cell Biol.*, 15:705-732.
- Laemmli, U.K., (1970), "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227:680-685.
- Lenhard, J.M., Kahn, R.A. ve Stahl, P.D., (1992), "Evidence for ADP-ribosylation Factor (ARF) as a Regulator of *in vitro* Endosome-Endosome Fusion", *The Journal of Biological Chemistry*, 267:13047-13052.
- Lowe, M. ve Kreis, T.E., (1996), "*In Vivo* Assembly of Coatamer, the COP-I Coat Precursor", *The Journal of Biological Chemistry*, 271:30725-30730.
- Lucinski, R., Polcyn, W. ve Ratajczak, L., (2002), "Nitrate Reduction and Nitrogen Fixation in Symbiotic Association *Rhizobium*-legumes", *Acta Biochimica Polonica*, 49:537-546.
- Malsam, J., Gommel, D., Wieland, F.T. ve Nickel, W., (1999), "A role for ADP Ribosylation Factor in the Control of Cargo Uptake During COPI-coated Vesicle Biogenesis", *FEBS Letters*, 462:267-272.
- Matsuoka, K. ve Bednarek, S.Y., (1998), "Protein Transport Within The Plant Cell Endomembrane System: An Update", *Current Opinion in Plant Biology*, 1:463-469.
- Matsuoka, K. ve Schekman, R., (2000), "The Use of Liposomes to Study COPII- and COPI-Coated Vesicle Formation and Membrane Protein Sorting", *METHODS*, 20:417-428.
- Memon, A.R., Clark, G.B. ve Thompson, G.A., (1993) "Identification of an ARF Type Low Molecular Mass GTP-Binding Protein in Pea", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193:809-813.
- Memon, A.R., Herrin, D.L. ve Thompson, G.A., (1993a) "Intracellular Translocation of a 28 kDa GTP-Binding Protein During Osmotic Shock-Induced Cell Volume Regulation in *Dunaliella salina*", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1179:11-22.
- Memon, A.R., Hwang, S., Deshpande, N., Thompson, G.A. ve Herin, D.L., (1995), "Novel Aspects of The Regulation of a cDNA (Arf1) From *Chlamydomonas* With High Sequence Identity to Animal ADP-Ribosylation Factor 1", *Plant Molecular Biology*, 29:567-577.

- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S. ve Schekman, R., (2002), "Cargo Selection into COPII Vesicles is Driven by the Sec24p Subunit", *The EMBO Journal*, 21:6105-6113.
- Mossessova, E., Gulbis, J.M. ve Goldberg, J., (1998), "Structure of the Guanine Nucleotide Exchange Factor Sec7 Domain of Human Arno and Analysis of the Interaction with ARF GTPase", *Cell*, 92:415-423.
- Movafeghi, A., Happel, N., Pimpl, P., Tai, G.H. ve Robinson, D.G., (1999), "Arabidopsis Sec21p and Sec23p Homologs. Probable Coat Proteins of Plant COP-Coated Vesicles", *Plant Physiology*, 119:1437-1445.
- Nickel, W. ve Wieland, F.T., (1997), "Biogenesis of COPI-coated Transport Vesicles", *FEBS Letters*, 413:35-400.
- Nickel, W. ve Wieland, F.T., (1998), "Biosynthetic Protein Transport Through the Early Secretory Pathway", *Histochem. Cell Biol.*, 109:477-486.
- Penmetsa, R.V. ve Cook, D.R., (2000), "Production and Characterization of Diverse Developmental Mutants of *Medicago truncatula*", *American Society of Plant Physiologists*, 123:1387-1397.
- Phillipson, B.A., Pimpl, P., daSilva, L.L.P., Crofts, A.J., Taylor, J.P., Movafeghi, A., Robinson, D.G. ve Denecke, J., (2001), "Secretory Bulk Flow of Soluble Proteins Is Efficient and COPII Dependent", *The Plant Cell*, 13:2005-2020.
- Pierce, BCA Protein Assay Reagent, Instructions
- Pimpl, P., Movafeghi, A., Coughlan, S., Denecke, J., Hillmer, S. ve Robinson, D.G., (2000), "In Situ Localization and in Vitro Induction of Plant COPI-Coated Vesicles", *The Plant Cell*, 12:2219-2235.
- Poon, P.P., Cassel, D., Spang, A., Rotman, M., Pick, E., Singer, R.A. ve Johnston, C., (1999), "Retrograde Transport from the Yeast Golgi is Mediated by two ARF GAP Proteins with Overlapping Function", *The EMBO Journal*, 18:555-564.
- Pueppke, S.G., (1986), "Nodule Distribution on Legume Roots: Specificity and Response to the Presence of Soil", *Soil Biol. Biochem.*, 18:601-606.
- Randazzo, P.A. ve Hirsch, D.S., (2004), "ARF GAPs: Multifunctional Proteins that Regulate Membrane Traffic and Actin Remodelling", *Cellular Signalling*, 16:401-413.
- Roth, M.G., (2000), *GTPases*, Oxford University Press, U.K.
- Schafer, D.A., D'Souza-Schorey, C. ve Cooper, J.A., (2000), "Actin Assembly at Membranes Controlled by ARF6", *Traffic*, 1:892-903.
- Schekman, R. ve Orci, L., (1996), "Coat Proteins and Vesicle Budding", *Science*, 271:1526-1533.
- Seaman, M.N.J., Sowerby, P.J. ve Robinson, M.S., (1996), "Cytosolic and Membrane-associated Proteins Involved in the Recruitment of AP-1 Adaptors onto the Trans-Golgi Network", *The Journal of Biological Chemistry*, 271:25446-25451.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. ve Rothman, J.E., (1993), "SNAP Receptors Implicated in Vesicle Targeting and Fusion", *Nature*, 362:318-324.

Teal, S.B., Hsu, V.W., Peters, P.J., Klausner, R.D. ve Donaldson, J.G., (1994), "An Activating Mutation in ARF1 Stabilizes Coatamer Binding to Golgi Membranes", *The Journal of Biological Chemistry*, 269:3135-3138.

Togawa, A., Morinaga, N., Ogasawara, M., Moss, J. ve Vaughan, M., (1999), "Purification and Cloning of a Brefeldin A-inhibited Guanine Nucleotide-exchange Protein for ADP-ribosylation Factors", *The Journal of Biological Chemistry*, 274:12308-12315.

Van Vliet, C., Thomas, E.C., Merino-Trigo, A., Teasdale, R.D. ve Gleeson, P.A., (2003), "Intracellular Sorting and Transport of Proteins", *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 83:1-45.

Wakeham, D.E., Ybe, J.A., Brodsky, F.M. ve Hwang, P.K., (2000), "Molecular Structures of Proteins Involved in Vesicle Coat Formation", *Traffic*, 1:393-398.

Weidler, M., Reinhard, C., Friedrich, G., Wieland, F.T. ve Rösch, P., (2000), "Structure of the Cytoplasmic Domain of p23 in Solution: Implications for the Formation of COPI Vesicles", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 271:401-408.

Weissman, J.T., Plutner, H. ve Balch, W.E., (2001), "The Mammalian Guanine Nucleotide Exchange Factor mSec12 is Essential for Activation of the Sar1 GTPase Directing Endoplasmic Reticulum Export", *Traffic*, 2:465-475.

Wieland, F. ve Harter, C., (1999), "Mechanisms of Vesicle Formation: Insights From the COP System", *Current Opinion in Cell Biology*, 11:440-446.

Yentür, S., (1995), "Bitki Anatomisi", İstanbul Üniversitesi Yayınları, 227, İstanbul.

INTERNET KAYNAKLARI

[1] <http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/SP000156.htm>

[2] <http://www.medicago.org/MtNews/Med.org-News20031222.html>

[3] <http://www.noble.org/medicago/index.html>

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 10.01.1980

Doğum yeri İstanbul

Lise 1994-1997 Ataköy Cumhuriyet Lisesi

Lisans 1997-2001 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2002-2004 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Programı

Çalıştığı kurum(lar)

2001-Devam ediyor YTÜ Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Araştırma Görevlisi

