

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Chlamydomonas reinhardtii* ARİLSÜLFATAZ GENLERİNİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN SEMİ-KANTİTATİF PCR ve qPCR YÖNTEMLERİ ile
BELİRLENMESİ**

Fatma SALARVAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

EKİM 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Chlamydomonas reinhardtii* ARİLSÜLFATAZ GENLERİNİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN SEMİ-KANTİTATİF PCR ve qPCR YÖNTEMLERİ ile
BELİRLENMESİ**

Fatma SALARVAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

EKİM 2021

ANTALYA

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

***Chlamydomonas reinhardtii* ARİLSÜLFATAZ GENLERİNİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN SEMİ-KANTİTATİF PCR ve qPCR YÖNTEMLERİ ile
BELİRLENMESİ**

**Fatma SALARVAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP)
tarafından FYL-2020-5425 nolu proje ile desteklenmiştir.**

EKİM 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Chlamydomonas reinhardtii* ARİLSÜLFATAZ GENLERİNİN EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN SEMİ-KANTİTATİF PCR ve qPCR YÖNTEMLERİ ile
BELİRLENMESİ**

Fatma SALARVAN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 11/10/2021 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY (Danışman)

Doç. Dr. Arzu ÜNAL

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

ÖZET

***Chlamydomonas reinhardtii* ARİLSÜLFATAZ GENLERİNİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN SEMİ-KANTİTATİF PCR ve qPCR YÖNTEMLERİ ile BELİRLENMESİ**

Fatma SALARVAN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Ekim 2021; 64 sayfa

Arilsülfatazlar, sülfatı diğer moleküllerden hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzimler mikroorganizmalar ve hayvanlarda bulunmaktadır, fakat literatürde bitkilerde arilsülfataz enziminin bulunmadığı ve bitkilerde sülfataz aktivitesinin olmadığı savunulmaktadır. İnsanda arilsülfataz genlerindeki mutasyonlar farklı hastalıklara sebep olmaktadır. Bu veriler arilsülfatazların biyoteknoloji, tıp ve ziraat alanlarında önemli enzimler olduğunu göstermektedir. Çalışmada model organizma *Chlamydomonas reinhardtii* genomunda bulunan 19 adet arilsülfataz (ARS) geni Phytozome veri tabanında belirlenmiş, gen ve protein sekansları alınmıştır. Literatürde bunlardan *ARS1* ve *ARS2* genleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır; bu tez çalışması diğer 17 gen modeli üzerine yapılan ilk fonksiyonel çalışmadır. Biyoinformatik araçlarla olası protein sekanslarının domain, motif ve moleküler filogeni analizleri yapılmıştır. Biyoinformatik çalışmalar gen modellerinin arilsülfataz proteinleri olduğunu desteklemiştir. Bu genlerin sülfat eksikliğinde transkripsiyon seviyelerinde değişiklik olup olmadığını belirlemek için RT-PCR analizleri yapılmıştır. RT-PCR analizleri için *C. reinhardtii* hücreleri, ilk olarak normal besi yerinde (TAP) çoğaltılıp ardından sülfatsız besi yerine (TAP -S) geçirilmiş ve belirli zaman aralıklarında kültürlerden örnekler alınmıştır. Alınan örneklerden RNA izolasyonu yapılmış, ardından RNA'lar cDNA'ya çevrilmiş ve cDNA'lar ile PCR reaksiyonları kurulmuştur. Sonuçlar, 17 ARS geninden *ARS6*, *ARS7*, *ARS11*, *ARS12*, *ARS13*, *ARS17* ve *ARS19*'da sülfatsız ortamda transkripsiyonda artış olduğunu göstermiştir; fakat bu artış pozitif kontrol genindeki (*ARS2*) artış kadar yüksek değildir. İlginç olarak, diğer genlerdeki artış 5. saat sülfat açlığında görülürken, *ARS17* genindeki artış 24. saatte görülmüştür. *C. reinhardtii* ve diğer organizmalardaki ARS protein dizileri kullanılarak filogenetik ağaç çizilmiştir. Ağaçta *C. reinhardtii* proteinlerinin, *Volvox carteri* proteinleri ile yakın dallarda olduğu; *Homo sapiens* ve bakteri türleri ile ayrı grupta kümelendiği görülmüştür. Sonuç olarak *C. reinhardtii* genomunda 19 ARS geni bulunduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar ilerideki uygulamalara ışık tutacaktır.

ANAHTAR KELİMELE: Arilsülfataz enzimi, ARS genleri, *Chlamydomonas reinhardtii*, Gen ekspresyon analizi, Sülfat eksikliğine aclimasyon

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Doç. Dr. Arzu ÜNAL

Doç. Dr. Hasan MEYDAN

ABSTRACT

DETERMINATION OF EXPRESSION LEVELS OF *Chlamydomonas reinhardtii* ARYLSULFATASE GENES BY SEMI-QUANTITATIVE PCR and qPCR METHODS

Fatma SALARVAN

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

October 2021; 64 pages

Arylsulfatases are enzymes that hydrolyze sulfate from other molecules. These enzymes are found in microorganisms and animals, but it is argued in the literature that there is no arylsulfatase enzyme in plants and that there is no sulfatase activity in plants. Mutations in the arylsulfatase genes in humans cause different diseases. These data show that arylsulfatases are important enzymes in the fields of biotechnology, medicine and agriculture. In the study, 19 arylsulfatase (ARS) genes in the genome of the model organism *Chlamydomonas reinhardtii* were determined in the Phytozome database, and their gene and protein sequences were obtained. In the literature, although there are studies on ARS1 and ARS2 genes; this thesis is the first functional study on 17 other gene models. Domain, motif and molecular phylogeny analyzes of possible protein sequences were performed with bioinformatics tools. Bioinformatics studies have supported that the gene models are arylsulfatase proteins. RT-PCR analyzes were performed to determine whether there were changes in the transcription levels of these genes in sulfate deficiency. For RT-PCR analyses, *C. reinhardtii* cells were first grown in normal medium (TAP) and then transferred to sulfate-free medium (TAP-S) and samples were taken from cultures at certain time intervals. RNA was isolated from the samples taken, then RNAs were converted into cDNA and PCR reactions were established with cDNAs. Results showed increased transcription in sulfate-free media in ARS6, ARS7, ARS11, ARS12, ARS13, ARS17 and ARS19; however, this increase is not as high as the increase in the positive control gene (ARS2). Interestingly, the increase in other genes was seen at the 5th hour of sulfate starvation, while the increase in the ARS17 gene was seen at the 24th hour. Phylogenetic tree was drawn using ARS protein sequences from *C. reinhardtii* and other organisms. In the tree, *C. reinhardtii* proteins are in close branches with *Volvox carteri* proteins while they were clustered in a separate group with *Homo sapiens* and bacterial species. As a result, 19 ARS genes were found in the *C. reinhardtii* genome. These results will shed light on future applications.

KEYWORDS: Acclimation to sulfate rate, Arylsulfatase enzyme, ARS genes, *Chlamydomonas reinhardtii*, Gene expression analysis

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Assoc. Prof. Dr. Arzu ÜNAL

Assoc. Prof. Dr. Hasan MEYDAN

ÖNSÖZ

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesi ve bu çalışmanın her aşamasında yönlendirici, destekleyici ve teşvik edici yardımları ve değerli tavsiyeleri için sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma sınavımda jüri üyesi olmayı kabul eden değerli hocalarım Doç. Dr. Arzu ÜNAL'a ve Doç. Dr. Hasan MEYDAN'a teze olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez projemin gerçekleşmesi sürecini destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim süremde aynı laboratuvarında birlikte çalışma şansı bulduğum Gizem Hatice Havutcu'ya deneyler sırasındaki yardımları ve desteği için teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ilgili konularda vakit ayırıp yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Hasan MEYDAN'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar ortamını ve cihazlarını kullanmamıza imkan sağlayan Prof. Dr. Faik KANTAR'a, Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya, Prof. Dr. Tarlan Mammedov'a ve Doç. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e ve Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarına teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yanımda olan, maddî-mânevi her türlü desteği veren aileme özellikle de annem Nezahat CANLI'ya, ablam Tuğba ÜNAL'a ve abim Tamer Tahir ÜNAL'a teşekkürü bir borç bilirim. Hayatımın her alanında olduğu gibi, tez çalışmamı hazırlarken de her aşamada bana yardımcı olan sevgili eşim Mustafa SALARVAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Sülfür ve Önemi	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Mikroalgler	4
2.2. Model Organizma <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5
2.3. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ’nin Yaşam Döngüsü.....	7
2.4. Arılsülfataz Enzimi ve Önemi	8
2.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ’nin Sülfür Aklimasyon Mekanizması	10
2.6. Biyoinformatik ve Biyoinformatiğin Amaçları.....	11
2.6.1. Çalışmada kullanılan veri tabanları, programlar ve algoritmalar	12
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	15
3.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar	15
3.3. Kullanılan Primerler	18
3.3.1. Primerlerin sulandırılması	19
3.4. Hücre Kültürü.....	19
3.4.1. Hemositometre ile hücre sayımı	20
3.5. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu.....	20
3.6. Agaroz Jel Elektrophorezi ve Örneklerin Yürütülmesi.....	22
3.7. Revers (Ters) Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	23
3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction- PCR)	24
3.9. Arılsülfataz Genlerinin Filogeni Analizi	25
3.10. Arılsülfataz Genlerinin Biyoinformatik Analizi.....	25
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1. Biyoinformatik Analiz Bulguları.....	28

4.1.1. Transmembran domain analizi	29
4.1.2. Protein lokalizasyon analizi	31
4.1.3. Domain analizi	32
4.1.4. Motif analizi (Sülfataz 1 ve Sülfataz 2)	33
4.1.5. Sinyal peptid analizi	36
4.1.6. Filogenetik analizler	38
4.2. RT-PCR Bulguları	39
4.3. RT-PCR ve Biyoinformatik Analiz Bulgularının Yorumları	41
5. SONUÇLAR	51
6. KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas reinhardtii* Arilsülfataz Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Semi-Kantitatif PCR ve qPCR Yöntemleri ile Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/10/2021

Fatma SALARVAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde orantı
<	: Küçüktür
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µL /µl	: Mikrolitre
∞	: Sonsuz
bp	: Baz çifti
g	: Gram
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojenin gücü
H	: Hidrojen
h	: Saat
H ⁺	: Hidrojen iyonu
L	: Litre
M	: Mega (10 ⁶)
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
O	: Oksijen
OH ⁻	: Hidroksit iyonu
O-S	: Oksijen-sülfür bağı
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
S	: Sülfür
SO ₄ ⁻²	: Sülfat iyonu

Tezde kullanılan ondalık ayraç noktaadır. Örneğin; 8.60

Kısaltmalar

ARS	: Arilsülfataz
ARSA	: Arilsülfataz A
ARSB	: Arilsülfataz B
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
<i>C. reinhardtii</i>	: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
CBLP	: Chlamydomonas β -subunit-like polypeptide
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNase	: Deoksiribonükleazsız
pI/Mw	: İzoelektrik noktası / Moleküler ağırlık
kDa	: Kilo dalton
MLD	: Metakromatik Lökodistrofi
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
PCR	: Polymerase Chain Reaction/ Polimer Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RNase	: Ribonükleazsız
RT-PCR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SAC1	: Sülfür Aklimasyon Proteini 1
TAP	: Tris Asetat Fosfat
TAP -S	: Sülfatsız Tris Asetat Fosfat
T _m	: Erime sıcaklığı
XSO ₄ ⁻²	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfate

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Sülfatın doğadaki biyojeokimyasal döngüsü	1
Şekil 2. 1. Alg üreme fazları	4
Şekil 2. 2. <i>C. reinhardtii</i> gamet çiftlerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü	6
Şekil 2. 3. <i>C. reinhardtii</i> 'nin yaşam döngüsü	8
Şekil 2.4. Sülfür açlığına (-S) aklimasyondaki düzenleyici yollar ve bileşenler	10
Şekil 4.1. TMHMM sunucusundan elde edilen grafiksel çıktılar	30
Şekil 4.2. ARS1 proteinin Prosite veri tabanındaki motif analiz sonucu	33
Şekil 4.3. <i>C. reinhardtii</i> 'de bulunan ARS proteinlerinin sülfataz motifleri	33
Şekil 4.4. Sülfataz motifi	34
Şekil 4.5. Bazı organizmalarda bulunan Sülfataz 1 motifinin hizalaması	35
Şekil 4.6. Bazı organizmalarda bulunan Sülfataz 2 motifinin hizalaması	35
Şekil 4.7. SignalP sunucusundan elde edilen örnek grafiksel çıktılar	37
Şekil 4.8. Phobius sunucusundan elde edilen örnek grafiksel çıktılar	38
Şekil 4.9. <i>C. reinhardtii</i> ve bazı diğer organizmalardaki ARS protein dizilerinin filogenetik ağacı	39
Şekil 4.10. 1.kültür, 2.kültür ve 3.kültürle yapılan RT-PCR sonuçları	40
Şekil 4.11. Fosfat açlığı çeken hücrelerin RT-PCR sonucu	41
Şekil 4.12. Strenkert vd.'nin RNA sekans çalışması	49
Şekil 4.13. Sülfat açlığı çeken hücrelerin RT-PCR sonuçları	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları.....	15
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besi yerleri ve solüsyonların içeriği	16
Çizelge 3.3. Hutner iz element solüsyonu ve sülfatsız iz element solüsyonu içeriği	17
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler ve dizilimleri	18
Çizelge 3.5. PCR bileşenleri	24
Çizelge 3.6. PCR döngüsünde bir döngüye karşılık gelen basamakların (sıcaklık-zaman) sıralı gösterimi.....	24
Çizelge 3.7. Phytozome ve NCBI’da bulunan bazı arilsülfataz (ARS) gen modelleri	26
Çizelge 4.1. Phytozome veri tabanında bulunan <i>C. reinhardtii</i> ’nin arilsülfataz (ARS) gen modelleri ve analizleri	28
Çizelge 4.2. <i>C. reinhardtii</i> ’ de bulunan ARS proteinlerinin SMART veri tabanındaki transmembran analizi sonuçları	29
Çizelge 4.3. <i>C. reinhardtii</i> ’de bulunan ARS proteinlerinin lokalizasyon analizi PredAlgo programı analiz sonucu	31
Çizelge 4.4. <i>C. reinhardtii</i> ’ de bulunan ARS proteinlerinin Pfam veri tabanındaki domain analizi sonucu.....	32
Çizelge 4.5. <i>C. reinhardtii</i> ’nin ARS proteinlerinin sinyal peptidlerinin hizalaması sonucu	37
Çizelge 5. 1. Biyoinformatik analizler ve RT-PCR sonuçlarının özeti	51

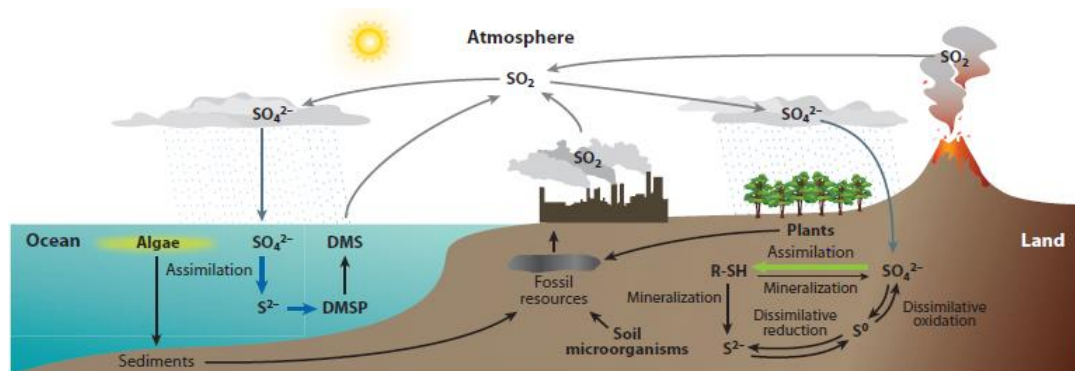
1. GİRİŞ

Dünyada yaşamı destekleyen en yaygın canlı türlerinden olan yegane olgu alglerdir. Algler fotosentez ile atmosfere net oksijen sağlayan organizmalardır. Algler, güneş enerjisi sayesinde fotosentez yaparak karmaşık yapılı şeker halinde besin maddesi üretmeleri sebebiyle çok önemli bir yere sahiptirler. Mikroskobik alglerin Dünya'nın oksijen kaynağı olmalarının yanı sıra atmosferik karbondioksitin depolanmasında da önemli bir role sahiptirler. Besin zincirinin ilk halkasıdır ve yaşam döngüleri sona erdiğinde çoğunlukla bakteri ve mantarlar tarafından ayrıştırılmaktadırlar. Bu nedenle yaşam döngülerini kontrol eden çevresel faktörler ekoloji için oldukça önemlidir. Yaşam döngülerinin sonunda deniz ortamında dip çamuruna katkı yaparlar ya da denizdeki besin tuzu deposuna geri dönerler. Karbon döngüsüne katkıları ise çok daha uzun süreçlerde olur (Thao vd. 2017).

Deniz bilimleri alanında küresel katkıları olduğu bilinen algler, son senelerde dünyada insan nüfusu ve enerji talebi artıka yeni bir doğal enerji kaynağı olarak ilgi çekmektedir. Alglerin diğer fotosentez yapan bitkilere göre üstünlüğü CO₂ sabitleme oranı, güneş ışığını depolaması ve enerjiye dönüştürme oranının daha yüksek olmasına dayanmaktadır. CO₂ sabitleme oranı algler için %3, bitkiler için ise %0.2-2 aralığındadır (Saydam ve Senyuv 2002). Yıl boyu kültüre alınabilmeleri, tarıma uygun olmayan alanlarda üretilebilmeleri, suyu ve güneş enerjisini en verimli kullanan sistemler olmaları nedeniyle; enerji kaynağı, gübre, yem hammadde gibi alanlarda kullanılmaktadır (Santos vd. 2015).

1.1. Sülfür ve Önemi

Sülfür, küresel ekosistemde dolaşan önemli bir unsurdur (Şekil 1.1). Sülfür doğada hem organik hem de inorganik formlarda bulunmaktadır. (Takahashi vd. 2011). Sülfat (SO₄²⁻) +VI redoks durumunda sülfür içerir. Sülfat; doğada en oksitlenmiş ve en yaygın olarak bulunan sülfür formudur. Bitkiler ve mikroorganizmalar, sülfatın sülfite indirgenmesini ve organik metabolitlere katılmasını sağlarlar. Şekil 1.1.'de görüldüğü gibi sülfat, bitkiler (yeşil ok) ve algler (mavi ok) tarafından asimile edilir. Toprak mikroorganizmaları, dissimilatif reaksiyonlarda sülfür kullanır ve organik sülfatın inorganik (iyonik) formlarına mineralizasyonunu sağlarlar. Sülfür atmosfere okyanuslardan, volkanlardan ve antropojenik aktiviteler yoluyla uçucu bileşikler olarak salınabilir. Uçucu sülfür bileşikleri atmosferde sülfata oksitlenir (Takahasi vd. 2011).



Şekil 1.1. Sülfatın doğadaki biyojeokimyasal döngüsü

Sülfatın sülfite indirgenmesi, enerjiye bağımlı asimilatif bir işlemdir. Etçiller, bitkiler tarafından üretilen indirgenmiş sülfür bileşiklerine ihtiyaç duymaktadır. Atık bitki ve hayvan kalıntılarındaki organik sülfür, mikroorganizmalar tarafından ayrıştırılabilir ve daha sonra inorganik sülfata dönüştürülebilir. Anaerobik ortamda, sülfat ve sülfür azaltıcı bakteriler dissimilatif sülfat azalmasından enerji elde edebilir, sülfür de atmosferde çevrilir. Algler, bir kısmı atmosfere salınan dimetilsülfür (DMS) olarak uçucu hale gelen dimetilsülfoniopropionatı (DMSP) sentezler (Şekil 1.1.). Volkanlardan çıkan sülfür ve sülfür dioksit gazları, kaplıcalar ve ağır endüstriler uçucu sülfürün ek kaynaklarıdır. Bu uçucu bileşikler atmosferdeki sülfata oksitlenir ve yağmur yağarken biyosfere geri dönüştürülür. Bu nedenle sülfür toprak, su ve atmosferik ortamlarda küresel olarak mineraller ve uçucular olarak çevrilir ve canlı organizmaların asimilatif ve yayıcı yollarında metabolize edilir (Leustek vd. 2000; Saito 2004; Giordano vd. 2005; Norici vd. 2005).

Sülfür tüm canlı organizmalarda olduğu gibi bitkiler için de temel bir besin elementidir. Kükürdün bitkiler için mutlak gerekli bir besin elementi olduğu 1800'lü yıllardan beri bilinmesine karşın toprak verimliliği açısından gereken önem gösterilmemiştir. Sülfür bitkide birçok protein, koenzim, tioredoksin ve sülfolipidlerin yapısında bulunmaktadır. Kükürdün peptidlerin sentezinde, redoks reaksiyonlarında, protein yapısının dayanıklılığında ve disülfid bağının (S-S) oluşumunda çok önemli rolü bulunmaktadır (Zhao vd. 1999).

Sülfür topraktaki yüksek pH problemini çözümlemede önemli bir yere sahiptir. Kükürdün toprağı asitleştirme etkisi vardır. Sülfür, su ve oksijen bulunan ortamlarda toprak bakterileri (*Thiobacillus spp.*) tarafından oksidasyona uğratarak, sülfürik aside dönüşür ve böylece toprak pH'sını düşürerek toprakta bağlanmış bitki besin maddelerinin bitki tarafından alınabilir hale gelmesini sağlamaktadır (Anonim 1). Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, toprak ve bitkide sülfür noksanlığının son yıllarda gittikçe yaygınlaştığını ortaya koymuştur (Eraslan vd. 2008).

Chlamydomonas reinhardtii toprakta yaşayan bir yeşil alg türü olduğu için biyogübre olarak kullanılabilme potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Topraktaki biyolojik aktivite çoğunlukla yüzey toprağında yoğunlaşmıştır. Biyolojik unsurlar toplam toprak hacminin çok küçük bir kısmını (< % 0.5) kapsarlar ve topraktaki toplam organik maddenin %10'dan daha azını meydana getirirler (Sönmez 2014). Bu biyolojik ögeler başlıca toprak organizmalarından, özellikle de mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Topraktaki önemsiz sayılabilecek varlıklarına rağmen, mikroorganizmalar nitrojen, sülfür ve fosfor döngüsü ile organik kalıntıların ayrışmasında anahtar rol oynar ve böylece küresel ölçekte besin ve karbon döngüsüne etki ederler (Pankhurst vd. 1997; Nielsen ve Winding 2002). Çoğu kez tahmin edilemez doğalarının ve biyosentetik kapasitelerinin benzersiz oluşu mikroorganizmaları hem yaşam bilimlerinde hem de diğer alanlarda özellikle zor problemleri çözmek üzere uygun adaylar haline getirmiştir (Higa ve Parr 1994). Kimyasal gübre ve pestisitlerin kullanımından kaynaklanan problemlerin ortadan kaldırılmasında mikroorganizmaların kullanışlı olduklarının bilinmesinden bu yana, tarımsal sürdürülebilirlik adına biyolojik alternatifler araştırılmış, geliştirilmiş ve uygulandıkları koşullara adaptasyon sağlamalarına dair çalışmalar hız kazanmıştır (Sönmez 2014). Biyogübre, aktif ya da pasif durumdaki bakteri, fungus, aktinomiset ve alg gibi mikroorganizmaları tekli veya kombine halde bünyesinde bulunduran ürünler için kullanılan kapsamlı bir terimdir. Bunun yanında,

biyogübreler ‘biyo-inokulantlar’ ya da ‘mikrobiyal kültürler’ olarak da bilinmektedirler (Sönmez 2014). Son olarak biyogübreler; toprak, tohum ya da bitki yüzeylerine uygulandığında içerdiği canlı mikroorganizmaların rizosfer ya da bitki içerisinde kolonileşmesiyle konukçusu olduğu bitkiye temel besinlerin sağlanmasında artış gerçekleştirerek gelişimi teşvik eden biyolojik maddelerdir (Vessey 2003).

Anlaşıldığı gibi sülfür canlılar için vazgeçilemez bir makro elementtir. İnorganik sülfat ancak bitkiler ve fotosentetik mikroorganizmalar tarafından redükte edilerek diğer moleküllerin sentezinde kullanılabilir; hayvanlar ise sülfat içeren proteinleri yiyerek sülfat ihtiyaçlarını karşılarlar (Leustek vd. 2000; Takahashi vd. 2011). Bu sebeple doğadaki sülfür döngüsü için fotosentetik organizmaların bu aktiviteleri çok önemlidir. Sülfat eksikliği bitki gelişimini negatif yönde etkilemektedir (Zhao vd. 1999; Nikiforova vd. 2003; Maruyama-Nakashita 2017). Sülfat eksikliği altında, toprakta bulunan mikroorganizmalar organik moleküllerin yapısında bulunan sülfatı alınabilir forma dönüştürmek için hücre dışına sülfataz enzimleri salgılayarak besin eksikliğine adaptasyon sağlayabilirler. Diğer bir deyişle arilsülfatazlar, bitkilerin topraktan sülfat alımı için gerekli enzimlerdir. Fakat literatürde bitkilerde arilsülfataz enzimi bulunmadığı ve bitkilerin sülfataz aktivitesinin olmadığı savunulmaktadır (Knauff vd. 2003). Bu durumda bitkiler sülfat eksikliği altında toprak mikroorganizmalarının sülfataz aktivitesine ihtiyaç duyarlar. Toprak mikroorganizmalarının aktiviteleri bitki beslenmesi için önemlidir.

Bu çalışmada, tek hücreli mikroskobik bir yeşil alg olan *Chlamydomonas reinhardtii* seçilmiştir. *C. reinhardtii*, tek bir kloroplasta sahip, tek hücreli, ökaryotik bir alg olup, akuatik sistemlerde yaygın olarak bulunur. Bu tür fotosentez, hücre döngüsü ve flagellar süreç çalışmaları da dahil olmak üzere hücre fizyolojisi ve biyokimyasının birçok alanında model organizma olarak kullanılmıştır (Harris 2001). Daha da önemlisi, bir ökaryotik tek hücreli organizma modeli olan *C. reinhardtii* toksikoloji, abiyotik strese tolerans veya organik ve inorganik kirli suların remediasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (Mendez-Alvarez vd. 1999; Wang vd. 2007). *C. reinhardtii*, metaller gibi doğal toksik maddelere sahip çeşitli ekotoksikolojik araştırmalarda da kullanılmıştır (Szivák vd. 2009).

Çalışmada model organizma *C. reinhardtii* genomunda 19 adet arilsülfataz geni (ARS) belirlenmiştir. Bu genlerden *ARS1* ve *ARS2* genleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (de Hostos vd. 1988; Aksoy vd. 2013), fakat diğer gen modelleri üzerine yapılmış fonksiyonel çalışma literatürde mevcut değildir. Amacımız diğer gen modellerinden mRNA üretilip üretilmediğini saptamak ve transkript düzeylerinin sülfat eksikliği altında değişip değişmediğini RT-PCR çalışmalarıyla moleküler düzeyde belirlemek olmuştur. Ayrıca biyoinformatik yöntemler kullanılarak bu genlerden sentezlenen olası protein sekanslarının sülfataz domaini, sülfataz motifi ve moleküler filogeni analizleri yapılmıştır.

Tezin ilerleyen bölümlerinde, konu ile ilgili terimler hakkında genel bilgiler verilmiş, daha önce yapılan çalışmalara değinilmiş, çalışmada kullanılan materyaller ve yöntemler detaylı olarak anlatılmış ve yapılan analizler doğrultusunda elde edilen veriler birbirleri ile karşılaştırılıp saptanan sonuçlar sunulmuştur.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Mikroalgler

Mikroalglerin üremesini ve gelişmesini düzenleyen en önemli parametrelerinden biri besin miktarı ve kalitesidir. Laboratuvar koşullarında mikroalglerin yetiştirilmeleri ve büyümeleri için söz konusu besleyici maddelerin tümünün uygun konsantrasyonda sağlanması gerekmektedir. Üreme ortamlarında azot, fosfor, sülfür ve iz element kaynaklarının varlığı mikroalglerin üremeleri için önem taşımaktadır (Deng 2012; Blair 2013). Sülfür ağırlıklı olarak proteinlerde, süfolipidlerde ve çeşitli koenzimlerde bulunan önemli bir elementtir.

Algler, sucul ekosistemlerde güneş ışığı ve karbondioksiti kullanarak organik moleküller sentezleyen birincil üreticiler olarak önemli ekolojik rol oynamaktadırlar (Lewis 1995; Fuentes-Grünwald vd. 2012). Algler ökaryotik organizmaların büyük ve çeşitlenmiş bir grubu olup klorofil içerirler ve oksijenik fotosentez yaparlar (Madigan ve Martinko 2012). Mikroalgler, hem tatlı su hem de deniz ortamlarına dağılmış, organizasyon ve yaşam alanlarında çeşitlilik gösteren, fototrofik ökaryotik mikroalgler ve prokaryotik siyanobakteriler olarak geniş bir organizma kategorisini oluşturur (Lee 2008). Mikroalglerin biyoçeşitliliği yaklaşık 200.000-800.000 tür olarak tahmin edilmektedir ve bu türlerden yaklaşık 50.000'i tanımlanmıştır (Starckx 2012).

Basit yapılı, tek hücreli mikroalgler hızlı büyümeleri, yüksek üreme hızları ile birçoğu gıda sektöründe değerlendirilir ve içerdikleri pigment maddeleri, antibiyotikler, vitaminler nedeniyle de tıp, eczacılık alanlarında ve kozmetik ürünlerinde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda algler biyoteknoloji alanında insan ve hayvan gıdası olarak değerlendirilmektedir. Özellikle de birçok ülkede besin kaynağı olarak tüketilmektedir, örneğin Japonya gibi Uzak Doğu ülkelerinde görülmektedir. Mikroalgler, diğer bir alternatif olarak tarım alanlarında da organik gübre olarak değerlendirilmektedir (Kargin 2006).

Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi genel olarak, mikroalglerin üremesi dört fazdan oluşur; gecikme fazı (lag), üssel faz (log veya exponential), durağan faz (stationary) ve ölüm fazı (lysis). Homojen bir alg kültürü genellikle birbirinden ayrı olmayan ve uzunluğu büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilen bir üreme modeli izlemektedir (Moazami vd. 2012).



Şekil 2. 1. Alg üreme fazları

Şekil 2.1.'de görüldüğü gibi ilk aşama, hücrelerin yeni ortama uyum sağlaması gereken gecikme fazı (lag)'dır. Gecikme fazının uzunluğu, yeni ortamın bir önceki ortamdan ne kadar farklı olduğuna ve inokülasyon zamanındaki hücrelerin fizyolojik yaşına bağlıdır. Hücreler yeni bir kültürü aşılama için kullanıldığında çok genç veya yaşlıysa, daha uzun bir gecikme fazına sahip olacaktır (Sevgi 2019). Üreme modelindeki bir sonraki aşama, hücrenin özgül üreme oranının yeni ortama daha çok adapte olduğu hızlanan üreme fazıdır. Bu fazda hücreler üstel büyümenin olduğu log fazına girerler. Bu faz boyunca, hücreler ortama tamamen adapte olurlar ancak alg kültürü yoğunluğu tüm hücrelere ışık geçirimini engelleyecek kadar yoğun değildir. Üremekte olan hücreler, üreme için gerekli besinleri kullanarak henüz limitli üreme haline geçmemiştir (Sevgi 2019). Bir sonraki aşama, spesifik üreme hızının daha doğrusal olduğu azalan log fazıdır. Bu faz hücrelerin oldukça yoğun olmaya başladığı ve ışık sınırlamaları olduğunda meydana gelir. Bu noktada, hücreler bir yandan besin maddelerinin çoğunu kullanırken bir yandan da üremeyi sınırlandırabilecek artan miktarda toksik atığı serbest bırakırlar. Hücreler ışığın sınırlı olduğu bir noktaya ulaştığında, bir üreme dengesinin elde edildiği durağan faza ulaşmışlardır. Ölmekte olan hücrelerin bozunması, biyokütlenin artmasını sağlar, bu da üreme eğrisinin, azami erişilebilir alg konsantrasyonunu temsil eden bir noktaya yükselmesine neden olur. Bir sonraki aşama, alg hücrelerinin daha fazla ölmeye başladığı hızlandırılmış ölüm fazıdır, bu fazda alg, üremesini inhibe eden materyalleri kültüre salmaktadır (Sevgi 2019). Son olarak, hücreler ölüm oranının üstel olduğu ölüm evresine ulaşır ve tamamen ölür (Becker 1994).

Üreme eğrisinin aşamalarındaki renk farklılıkları gözle algılanabilir, ancak bunların tümü net olarak ayırt edilememektedir. Algal kültürler çok soluk bir yeşil olarak başlar ve yoğunlaştıkça daha koyu yeşil olurlar. Bu noktada fazlarda bir fark tespit etmek zordur, kültür ölüm fazına girdiğinde sarımsı kahverengiye dönüşmeye başlar. Hücreler daha çok öldükçe, kültür giderek daha az yeşil ve daha fazla kahverengi hale gelmektedir (Sevgi 2019).

2.2. Model Organizma *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas cinsinin türleri geçmişte sadece morfolojik özelliklerine göre tanımlanmıştır. Cinsin temel özellikleri eşit uzunlukta iki ön flagella, bir veya daha fazla pirenoidi çevreleyen bir bazal kloroplast ve ayrı bir hücre duvarı ile tek hücreli bir klorofittir (Harris 2001; Harris vd. 2009) (Şekil 2.2.). *C. reinhardtii*'nin sınıflandırma bilimindeki yeri şu şekildedir:

Üst Alem: Eukaryota

Alem: Plantae

Bölüm: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Chlamydomonadales

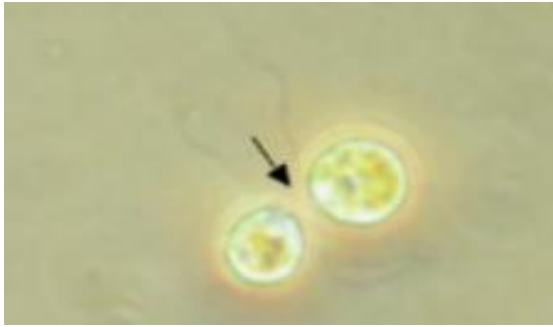
Familya: Chlamydomonadaceae

Cins: Chlamydomonas

Tür: *Chlamydomonas reinhardtii* (Dangeard 1888).

Chlamydomonas reinhardtii, yaklaşık bir milyar yıl önce kara bitkilerinden ayrılan bir mikro yeşil algdır. *C. reinhardtii*, tek bir kloroplasta sahip, ökaryotik bir alg olup, toprakta yaygın olarak bulunmaktadır (Yılmaz 2018). Bu tür fotosentez, hücre döngüsü ve flagellar süreç çalışmaları da dahil olmak üzere 1950'lerden beri hücre fizyolojisi ve biyokimyasının birçok alanında bitki model organizma olarak kullanılmıştır (Harris 2001). Kloroplast bazlı çalışma için bir model sistem olmasının yanı sıra ökaryotik kamçının yapısı, montajı ve fonksiyonu ve fotosentez gibi birçok biyolojik proseslerin araştırılmasında uzun zamandır model organizma olarak kullanılmaktadır (Merchant vd. 2007).

Chlamydomonas cinsi, tatlı ve tuzlu sularda yaşayan, yaklaşık 500 tür içeren, tek hücreli ve hareketli mikroalglerdir. Hücreler genellikle küresel, oval veya dikdörtgen biçimli olmakla birlikte, elipsoid, piriform gibi diğer formları da mevcuttur (Duygu-Yalçın ve Özer 2018). Hücre duvarı ince ve pürüzsüz olup, en büyük yapısal bileşeni glikoproteindir. *Chlamydomonas* türleri biyomaslarında lipitler, yağ asitleri, vitaminler, karotenoidler ve diğer hücresel bileşikler biriktirir ve algal biyohidrojen ile biyofuel üretiminde değerlendirilmektedir (Brown ve Robert 2002; Stephens vd. 2010). *C. reinhardtii*; genetik çalışmalar, hücre etkileşimi, çevresel koşulların değişimi ile tepki mekanizması çalışmaları, hücre ve moleküler biyoloji araştırmaları için güçlü bir model sistemi oluşturmaktadırlar (Gross vd. 1988). *C. reinhardtii* türü farklı ortamlarda yaşayabilir ve çevresel kısıtlamalara karşı adaptasyonu yüksek ve hızlıdır. Laboratuvar ortamlarında ucuz besi yerlerinde hızlı ve kolay ürediği için çalışma materyali olarak tercih edilmektedirler (Merchant vd. 2007; Bhamawat 2010; Meslet-Cladiere ve Vallon 2011). *C. reinhardtii*'nin bütün bu özellikleri göz önüne alındığında çalışmalarımız bu tür üzerinde yoğunlaşmıştır.



Şekil 2. 2. *C. reinhardtii* gamet çiftlerinin faz kontrast mikroskop görüntüsü (Aksoy vd. 2021)

C. reinhardtii Chlamydomonas'ın baskın laboratuvar türü olarak ortaya çıkmıştır. Bunun sebebi, esas olarak tek karbon kaynağı olarak asetat ile fotosentez yapmadan üreyebilme yeteneğinden dolayıdır (Sevgi 2019). Tek kloroplasta sahip olması ve fotosentez aparatının yüksek oranda korunmuş olması, *C. reinhardtii*'nin, özellikle fotosentez, kloroplast biyogenezi ve kloroplast gen ekspresyonunun nükleer kontrolü alanında çalışmayı kolaylaştırmıştır (Herrin ve Nickelsen 2004; Eberhard vd. 2008). Kazanılan teknikler birçok bitkiyle ilgili konuda araştırmaların bu model organizma kullanılarak yapılmasını sağlamıştır. *C. reinhardtii*'nin genom sekanslaması 2007 yılında tamamlanmış (Merchant vd. 2007), yayınlanmış ve şu anda kullanıma açıktır. Günümüzde yabancı tür, mutant suşlar ve transformasyon çalışmaları için

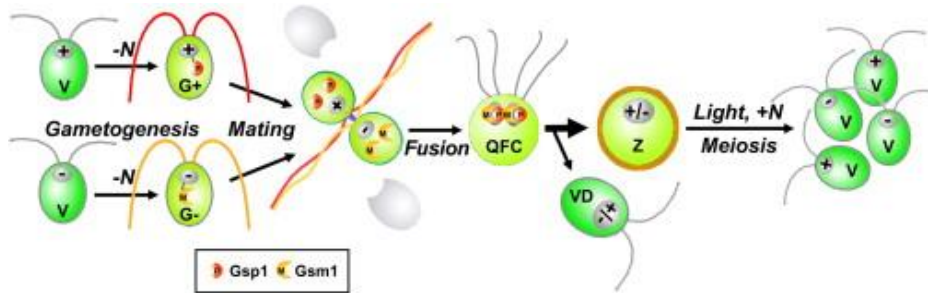
plazmid yapılarını içeren araştırmacıların kullanımına açık çevrim içi veri tabanları mevcuttur. Daha yüksek bitki model organizmaları yerine basit tek hücreli yeşil alglerle çalışmayı destekleyen ortak motivasyon, mikrobiyal bir sistemin (hızlı kültürlenme, kolay teknikler) ve gen ailesinin daha az karmaşık olmasının getirdiği bir avantajlar olmaktadır (Sevgi 2019). Son yıllarda geliştirilen genetik teknikler *C. reinhardtii*'nin bütün genomlarını (nükleer, kloroplastik ve mitokondrial) manipülasyona uygun hale getirmiştir (Fuhrmann vd. 1999). Ayrıca, kimyasal ve insersiyonel mutagenез için var olan metodlar, RNA interferans, amiRNAs ile gen susturulması metodları *C. reinhardtii*'ye önemli bir pozisyon sağlamıştır (Merchant vd. 2007, Neupert vd. 2012).

Birçok alg gibi *C. reinhardtii* de çeşitli beslenme streslerine uyum sağlama kapasitesine sahiptir. Periplazmik karbonik anhidraz üreterek ve inorganik karbon taşınım seviyesini yükselterek düşük CO₂'e cevap verir. Sülfat yoksunluğu koşulları altında da bölünmeyi durdurur, büyür, nişasta biriktirir, arilsülfataz üretir ve sülfatın daha hızlı taşınması için kapasitesini artırır (de Hostos vd. 1988). *C. reinhardtii* besin eksikliğine aklımasyon mekanizmalarının araştırılmasında da model olarak kullanılmıştır. Bu mikroalg sülfat eksikliği altında ekstraselüler arilsülfataz salgılamaktadır (de Hostos vd. 1988). Arilsülfataz aktivitesi ile ilgili olarak iki ARS geninin (*ARS1* ve *ARS2*) transkripsiyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Aksoy vd. 2013; Aksoy vd. 2014). *C. reinhardtii* genomunda *ARS1* ve *ARS2* genlerine ilave olarak 17 ARS geni daha mevcuttur. ARS genlerinin aktivitesinin çözümünde bitki model organizması olarak basit, tek hücreli fotosentetik bir mikroorganizma olan *C. reinhardtii* kullanılmıştır.

2.3. *Chlamydomonas reinhardtii*'nin Yaşam Döngüsü

C. reinhardtii yabani tip, içeriği tanımlanmış sıvı veya agar ortamda, nötr pH'ta kolaylıkla üreyebilmektedir ve ek vitamin veya kofaktör gibi herhangi bir gereksinime ihtiyaç duymamaktadır (Harris 1989). Asetat, yabani tip suşlar tarafından bir karbon kaynağı olarak kullanılabilir, karanlıkta da üreyebilirler ve fotosentez yapabilme özelliği bloke edilen suşlar asetat sağlandığında canlı kalabilir. Ancak ışıktaki büyüme asetatlı veya asetsiz karanlıktaki üremeden daha hızlıdır (Sevgi 2019). Optimal üreme sıcaklığı 20-25°C arasındadır. Yeterli sıcaklık ve ışıktaki, ortalama 6-8 saatte bir hücre sayısı iki katına çıkmaktadır. Işık ve besin kültürden çıkarılsa bile bölünme devam eder. Belirli bir döngüde yer alan birbirini izleyen bölünmelerin sayısı, G1 fazında erişilen hücre boyutuna bağlıdır (Goto ve Johnson 1995). *C. reinhardtii*'de mitoz gelişimi 1968'de Johnson ve Porter tarafından tarif edilmiştir (Harris 1989). *C. reinhardtii* hücreleri haploittir ve iki adet genetik olarak sabitlenmiş eşleşme türleri vardır. Bunlar MT⁺ ve MT⁻ olarak tanımlanırlar (Şekil 2.3.). Eşleşme lokusu, hücre tanıma ve füzyonunda, zigospore olgunlaşmasında, organel genlerinin eşleşme kontrolünde ve kalıtımında etkili olup yaklaşık 1 megabaz gen içeren kompleks bir bölgede bulunmaktadır. (Campbell vd. 1995, Goodenough vd. 1995, Kurvari vd. 1998). MT⁺ ve MT⁻ gametler, başlangıçta seksüel aglutinin proteinlerinin aracılık ettiği bir reaksiyonla flagella uzunlukları boyunca eşleşir. Flagella eşleşmesi, yoğun olarak araştırılan bir cAMP aracılı sinyal transdüksiyonu (sinyal iletimi) başlatır (Quarmby 1994, Wilson vd. 1999). Eşleşmeyi flagellar uçlarda morfolojik bir değişim (aktivasyon) ve hücre çeperinin bir gamete spesifik litik enzim tarafından çözülmesi takip eder (Harris 1989). Eşleşme partnerlerinin füzyonu, hücrelerin ön uçlarında eşeye özgü yapılarda başlar ve önden arkaya doğru lateral olarak devam eder. Yeni oluşmuş diploid zigot, bir saat

sonra dört flagellalı bir hücre olarak hareket etmektedir (Wilson vd. 1997; Wilson ve Snell 1998).



Şekil 2. 3. *C. reinhardtii*'nin yaşam döngüsü (Lee vd. 2008)

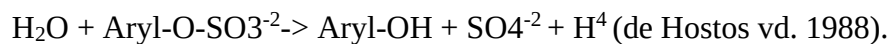
Zigot spesifik transkriptler ile gamet füzyonu dakikalar içinde oluşur (Kuriyama vd. 1999). Sert ve geçirimsiz bir zigospor çeperinin oluşumu başlar, kloroplastlar parçalanır gibi görünür, klorofil kaybı meydana gelir ve lipid cisimleri 4 ila 6 gün boyunca birikir. *Chlamydomonas*'ın eşeyssel türlerinde zigospor çeperinde olumsuz çevresel koşullara karşı koruma sağlanır. Vejetatif hücre çeperi gibi, *C. reinhardtii*'nin zigospor çeperi de hidroksiprolin açısından zengin glikoproteinler içerir. Zigosporlar uzun yıllar toprakta yaşayabilir (Harris 1989).

2.4. Arılsülfataz Enzimi ve Önemi

Enzimler, canlı hücreler tarafından sentezlenen, hemen hemen tamamı proteinlerden oluşan biyolojik katalizörlerdir. Katalizör işlevini, kimyasal reaksiyonların aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonu hızlandırmak yoluyla gösterirler. Reaksiyon sırasında herhangi bir değişikliğe uğramadan reaksiyondan aynı şekilde çıkarlar, bu sayede tekrar tekrar kullanılabilen biyomakromoleküllerdir. Hücre içinde (intraselüler) işlev gördükleri gibi, hücre dışında (ekstraselüler) da aktivite gösterebilirler (Arıcı 2007).

Sülfataz enzimi, organik sülfat esterlerinin hidrolizini katalizler ve ester tipine göre arılsülfatazlar, alkilsülfatazlar, steroid sülfatazlar, gluko sülfatazlar, kondrosülfatazlar ve mirosülfatazlar olarak sınıflandırılmıştır. Topraklardaki sülfürün %40'ından fazlası organik ester formundadır ve bunların yarısını arılsülfatlar oluşturmaktadır (Sevgi 2019). Arılsülfatazlar, sülfat esterlerini hidrolizleyerek sülfat mineralizasyonunu gerçekleştirdiğinden çok önemli enzimlerdir. Arılsülfataz enzimi ayrıca potasyumnitrofenil sülfat, potasyumfenil sülfat, potasyum nitrokatekol sülfat ve potasyum fenoltalein sülfatın da hidrolizlerini katalizler.

Arılsülfataz, toprakta S dönüşümünde görev alan ekstraselüler bir enzim olup, organik S formlarındaki O-S bağlarını kırarak bunların hidrolizini sağlayan ve sülfat (SO_4^{2-}) oluşumunu sağlayan enzim olması dolayısıyla diğer sülfatazlardan ayrılmaktadır. Topraktaki bu etkisinden ötürü toprak verimliliğine büyük katkıları bulunmaktadır (Tabatabai ve Dick 1982). Arılsülfataz (ENZYME entry: EC.3.1.6.1)'in katalizlediği dönüşümsüz hidroliz reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Açığa çıkan sülfat yüksek yapılı bitkiler ve toprak mikroorganizmalarının kullanımına hazır hale gelir. Arilsülfatazlar, mikroorganizmalar ve hayvanlarda tespit edilmiştir (Tabatabai ve Bremner 1970). Fakat literatürde bitkilerde arilsülfataz enzimi bulunmadığı ve bitkilerin sülfataz aktivitesinin olmadığı savunulmaktadır (Knauff vd. 2003). Arilsülfataz aktivitesi toprak derinliği ile düşmekte ve toprak organik karbonu, toplam azot ve kation değişimi kapasitesi ile belirgin bir korelasyon göstermektedir (Tabatabai ve Bremner 1970b; King vd. 1980; Appiah ve Ahenkorah 1989). Yapılan çalışmalara göre sülfat topraktaki arilsülfataz aktivitesini sınırlamaktadır (Dodgson ve Rose 1976; Fitzgerald 1976; Jarvis vd. 1987). Topraktaki sülfür mineralizasyonunda arilsülfataz aktivitesinin önemi yüzeysel topraklarda bulunan toplam sülfür çoğunluğunun organik sülfat formunda bulunmasından kaynaklanmaktadır (Tabatabai ve Dick 1982).

Arilsülfataz ilk kez Hostos vd. (1989) tarafından ekstraksiyonu yapılmış, sülfatı aromatik bileşiklerden ayıran periplazmik bir enzimdir. Arilsülfataz 67,6 kDa büyüklüğünde olup plazma membranı veya hücre duvarı ile ilişkidir ve hücre duvarından yoksun hücrelerde çevre ortamına neredeyse tamamen salgılanmaktadır (de Hostos vd. 1988). Aktivitesi tüm hücrelerde kromojenik substrat 5-bromo-4-kloro-3-indolil sülfat (XSO_4^{2-}) ile kolayca test edilebilir, ürün mavi bir bileşiktir. α -naftilsülfat ve ajan olarak bir diazonyum tuzu kullanılmasına dayanan 250 kat daha hassas bir kantitatif aktivite tayin yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntemle göre 540 nm absorbansta kolaylıkla aktivite ölçmek mümkündür (Ohresser vd. 1997).

Arilsülfataz üzerine temel bilimler ve tıp alanında birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır. Knauff vd., (2003) yaptığı çalışmada; bitkilerde arilsülfataz aktivitesinin olmadığını savunmaktadır ve bu durumda bitkiler toprak mikroorganizmalarına bağımlı yaşamaktadır. Buna rağmen insan genomunda 17 tane ARS geni olduğu bilinmektedir (Knauff vd. 2003; Sardiello vd. 2005; Holmes 2017). Bu genlerde oluşan mutasyonlar önemli hastalıklara sebep olmaktadır. Örneğin Metakromatik lökodistrofi (MLD) lizozomal enzim arilsülfataz A (ARSA/ASA) veya aktivatör proteininin eksikliği sonucu oluşan, otozomal resesif geçişli bir sfingolipit depo hastalığıdır. ARSA enziminin fonksiyonundaki bozukluk sonucu 3-O-sülfogalaktozil birimi içeren glikolipitlerin desülfasyonu hatalı olmaktadır. Sülfatlı glikolipitler çoğunlukla myelin kılıflarında ve periferik sinir sisteminde bulunurken, karaciğer, böbrek, safra kesesi gibi iç organlarda daha az bulunurlar. MLD hastalığında parçalanamayan sülfatlı glikolipitler dokularda birikir ve ilerleyici demiyelinizasyona neden olur (Özkan 2013; Hettiarachchi ve Dissanayake 2019). ARSA, sülfataz ailesine ait bir enzimdir. Bu ailenin üyeleri mukopolisakkaridlerin, serebrozitlerin ve steroidlerin dahil olduğu çeşitli sülfat ester bağları içeren bileşiklerin hidrolizini gerçekleştirir. Bilinen diğer sekiz sülfataz ile insandaki ARSA, %47-59 gibi yüksek bir dizi benzerliğine sahiptir (Franco vd. 1995). ARSA enziminin kristal yapısı 1998 yılında açığa kavuşturulmuştur (Lukatela vd. 1998).

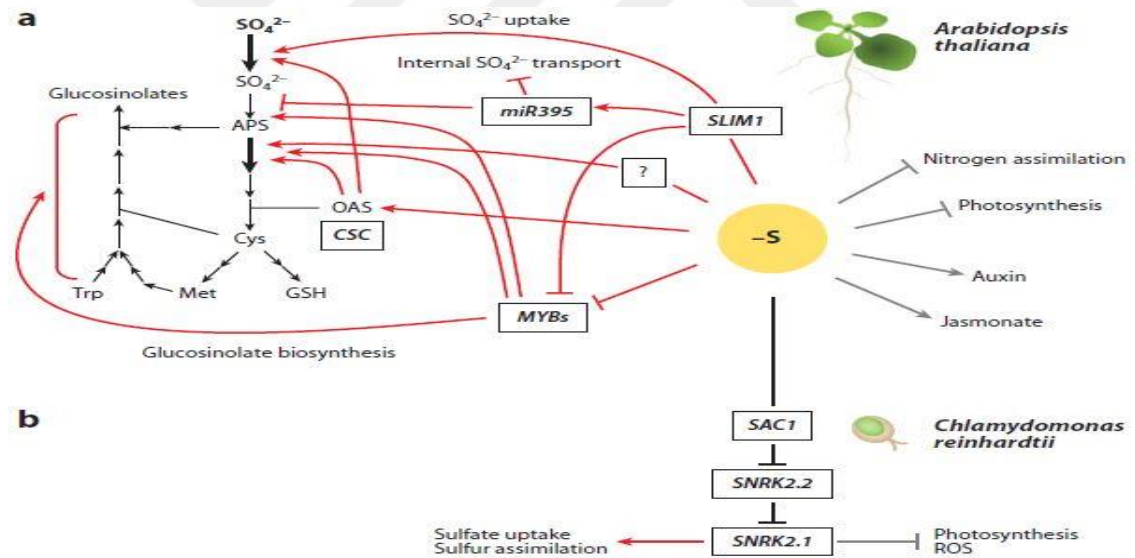
Bir diğer hastalık olan mukopolisakkaridoz (MPS) tip VI veya Maroteaux Lamy sendromu, nadir görülen genetik bir hastalık olup ilk olarak 1963 yılında Fransız doktorlar Maroteaux ve ark. (Maroteaux vd. 1963) tarafından tanımlanmıştır. Maroteaux Lamy sendromu (MPS tip VI), dermatan sülfat birikimi ile sonuçlanan, arilsülfataz B eksikliği nedeni ile olan bir lizozomal depo hastalığıdır. Hastalık otozomal resesif kalıtılmaktadır ve N-asetilgalaktozamin-4-sülfataz (arilsülfataz B veya ARSB)

lizozomal enzimini kodlayan 5. kromozomda (5q13-5q13) yer alan ve 8 ekzondan oluşan arilsülfataz B (ARSB) genindeki mutasyon sonucu oluşur (Neufeld ve Muenzer 2001). Enzim eksikliği, glikozaminoglikan (GAG) derman sülfatın (DS) lizozomlarda birikmesine neden olmaktadır ve bunun sonucunda çoklu organ ve sistemlerde çeşitli belirti ve bulgular ortaya çıkmaktadır (Giugliani vd. 2007). Mukopolisakkaridoz tip VI (MPS tip VI), klinik olarak heterojendir ve tedaviye ne kadar erken başlanılırsa, klinik sonuçlara o derece anlamlı etki sağlayarak, hastalığın ilerlemesini yavaşlattığı gösterilen galsülfaz (rekombinant insan ASB, rhASB) varlığı nedeni ile MPS tip VI'nın erken tanısı önem taşımaktadır (Mcgill vd. 2010).

Yapılan çalışmalar arilsülfatazların biyoteknoloji, tıp ve ziraat alanlarında önemli enzimler olduğunu göstermektedir ve arilsülfataz genlerin araştırılmasının önem taşıdığını ortaya koymaktadır.

2.5. *Chlamydomonas reinhardtii*'nin Sülfür Aklımasyon Mekanizması

Yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*, sülfür sınırlama tepkisinin moleküler mekanizmalarının ilginç bir modelini sunmaktadır (Şekil 2.4.). Daha yüksek bitkilerden farklı olarak, *C. reinhardtii*, sülfat yoksunluğunda sülfür elde etmek için arilsülfataz kullanarak sülfat esterlerini hidroliz edebilmektedir. *C. reinhardtii*, sülfür yoksunluğuna yanıt olarak bir periplazmik arilsülfataz üretmektedir (de Hostos vd. 1988).



Şekil 2.4. Sülfür açlığına (-S) aklımasyondaki düzenleyici yollar ve bileşenler **a)** *Arabidopsis thaliana* ve **b)** *Chlamydomonas reinhardtii*. Kırmızı çizgiler özellikle sülfat taşınmasını kontrol eden yolları ve metabolizmayı gösterir. Gri çizgiler, sülfür eksikliğinden etkilenen diğer genel yolları gösterir (Takahashi 2011)

Sülfür sınırlama tepkisini kontrol eden düzenleyici bileşenler, arilsülfataz ekspresyonunda anormallikler gösteren sac (sülfür aklımasyonu) mutantları için genetik bir taramadan tanımlanmıştır (Davies vd. 1996, 1999). Membrana bağlı varsayılan sülfür sensörü proteini SAC1, başlangıçta genetik taramadan tanımlanmış nedensel bir gendir (Davies vd. 1996). SAC1, sülfür açlığına alışma yanıtı ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu indükler ve sülfürü asimile etme kapasitesi ile eş zamanlı olarak aşağı

regüle edilmesi gereken fotosentezi azaltır (Davies vd. 1996). SAC1 altında düzenleme, *Chlamydomonas* hücrelerinin düşük sülfür ortamda alışması açısından önemlidir, ancak yüksek afiniteli sülfat taşıyıcıları *sac1* mutantlarında aktif kalmıştır (Takahashi 2011). SAC1 benzeri taşıyıcıların, SLT1 ve SLT2'nin daha yeni analizleri, bu SAC1 homologlarının, sülfür algılama makinelerinin bileşenleri altında düzenlenmiş sodyum / sülfat kuluçka taşıyıcıları olarak yüksek afiniteli sülfat taşıma aktiviteleri için gerekli olduğunu göstermektedir (Pootakam vd. 2010).

2.6. Biyoinformatik ve Biyoinformatiğin Amaçları

Biyoinformatik, bilgisayar bilimlerini kullanarak biyoloji, kimya ve tıp gibi saf bilim alanıyla ilişkilendiren bir çalışma alanıdır. Biyolojik bilgilerden veriyi organize etmede, yönetmede ve yorumlamada önemli bir rol oynamaktadır. Genomik ve proteomik gibi terimler biyoinformatik alanının temelidir (Xia 2017).

Biyoloji günümüzde sadece laboratuvarında çalışılan bir bilim alanı olmaktan çıkmış ve bilgi teknolojisiyle iç içe çalışan bir bilim dalı haline gelmiştir. Bilgisayarların ve bilgisayar ile yapılan yöntemlerin, biyolojinin her alanında kullanılmaya başlanmasıyla biyoinformatik bilim dalı yaygınlaşmıştır (Kaya vd. 2010). Biyolojik alanda yapılan çalışmalar sonucu; dünya çapında yapılan araştırmalar ve uygulamaların verileri artmış ve çok sayıda genomik veriler elde edilmiştir (Polat ve Karahan 2009). Biyoinformatik de bu biyolojik olaylara cevap verebilmek için bilgisayarlar ve yazılımlarının kullanılarak biyolojik verilerin depolanması ve işlenmesi süreçlerini kapsamaktadır.

Biyoinformatik analizlerinde genel olarak büyük veri yapıları üretilen alanlarda kullanılır (Baldi ve Brunak 2001). Biyoinformatikte kullanılan yüksek verimli datalar genom mimarisi, epigenetik, genomik, ekzom sıralama, transkriptomik, ribozom profili, proteomik, protein (RNA) yapıları ve cistrom olarak sıralanabilmektedir (Searls 2000; Xia 2017).

Biyoinformatikten genel olarak faydalanan kapsamı geniş en büyük iki dal genomik ve proteomik veri analizleridir. Genomik esasında genomların analizi anlamına gelmektedir (Callow vd. 2000; Dibyajyoti vd. 2013). Genom, nesilden nesile aktarılan kalıtım yapılarını kodlayan DNA dizilerinin tamamı olarak da tanımlanabilmektedir. DNA dizilerinde genom içinde bulunan tüm genlerin ve bunların transkriptlerini içermektedir (Attwood 2000). Proteomik ise proteom da bulunan tüm proteinlerin analizine dayanmaktadır. Proteomik dataya baktığımızda, proteinler, canlı hücrelerindeki iş güçleridir ve anormal yapıları genellikle hastalıklarla ilişkilidir (Blundell vd. 2006; Xia 2017).

Biyoinformatik analizler birbirinden ayrı olarak düşünülemez. Örneğin, protein yapısı tahmini dizi hizalama verilerine bağlı iken; gen ekspresyon profilinin küme (cluster) analizi ise dizi analizinden elde edilen filogenetik ağaç oluşturma yöntemlerini gerektirmektedir. Dizi esaslı promotor tahmini birlikte ifade edilen genlerin fonksiyonel analizi ile ilişkilidir. Genin açıklanması, kodlayan ve kodlanmayan dizilerin ayrılması, proteine çevrilmiş dizilerin tanımlanması ve genin, bilinen diğer genlerle evrimsel ilişkisinin belirlenmesi gibi pek çok işlemi içermektedir (Kaya vd. 2010).

2.6.1. Çalışmada kullanılan veri tabanları, programlar ve algoritmalar

NCBI: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Moleküler biyoloji için ulusal bir kaynak olarak 1988 yılında kurulan NCBI, yerel veri tabanları, biyoloji araştırmaları, genom veri analizinde yazılım araçları gelişimi ve insan sağlığını ve hastalıklarını etkileyen moleküler süreçlerini daha iyi anlayabilmek için biyomedikal bilgilerin yayılması amacıyla çalışmalarına devam etmektedir. En tanınmış protein veri tabanlarından bir diğeri NCBI'da kurulmuştur. Ancak bu veri tabanı, tek veri tabanı değildir; diğer protein veri tabanlarında bulunan girdilerin derlenmesiyle oluşturulmuştur (Selzer vd. 2018).

Phytozome: Bitki genomlarıyla ilgili çeşitli bilgilerin depolandığı ve karşılaştırmalı analizlerin yapılabildiği bir web platformudur (Goodstein vd. 2012).

SMART (Simple Modular Architecture Research Tool): Protein domainlerinin tanımlanması ve ek açıklaması ile protein domain mimarilerinin analizi için kullanılan bir veri tabanıdır (Letunic vd. 2012). Domain; bir proteinin bağımsız olarak katlanabildiği ve çalışabildiği sınırlı işlevsel birimdir.

TMHMM: Transmembran proteinlerinin domainlerini tahmin edebilmektedir (Krogh vd. 2001). Transmembran proteinlerin tahmin edilmesi, proteinlerin sınıflandırılması ve işlevlerinin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Biyolojik zarlar, hücre-yüzey reseptörleri gibi, hücrede çeşitli işlevlere sahip integral proteinleri içermektedir. İntegral zar proteinleri daima hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgelere sahip olan amfifilik moleküllerdir. Bu proteinler, zar da asimetrik olarak yerleşim gösterirler; yani bazı zar proteinleri zarın sadece bir yüzünden çevreye maruz kalırken, diğerleri ise zarı tamamen nüfuz etmekte ve hem hücre-dışı hem de hücre-içi bölgelere maruz kalmaktadır. Zarı boydan boya geçen proteinler transmembran proteinler olarak adlandırılmaktadır.

Pfam: Protein dizisi ailelerinin bir veri tabanıdır. Her Pfam ailesi, Hidden Markov (Saklı Markov Modeli) modeli olarak bilinen istatistiksel bir modelle temsil edilmektedir (Punta vd. 2012). Pfam veri tabanı (Finn vd. 2016), protein ailelerini profillerine göre sınıflandırmaktadır ve dizi hizalamalarını temel almaktadır.

Prosite: İsveç Biyoinformatik Enstitüsü bünyesinde yerleşim gösteren önemli bir ikincil veri tabanıdır (Sigrist vd. 2013). Proteinlerin sınıflandırılması, ilgili proteinlerde korunmuş ve genellikle proteinin işlevinde önemli bir role sahip olan 10-20 amino asitlik kısa dizi bölgeleri gibi tek olarak korunmuş motifler kullanılarak tanımlanmaktadır. Motif(desen); birbiriyle alakalı nükleotid veya protein dizilerindeki kısa bölgelerdir. Motifler genellikle domainlerin yüksek derecede korunmuş bölgelerini içermektedir. Bilinmeyen proteinlerdeki bu tür dizi motiflerinin aranması ise bilinmeyen proteinin, bir protein ailesi veya işlevi ile ilişkilendirilmesi için ilk ipucunu sağlayabilmektedir (Selzer vd. 2018).

Phobius ve SignalP: Proteinlerin birincil yapısında sinyal peptidlerin varlığını tahmin etmek için kullanılan programlardır (Käll vd. 2007; Petersen vd. 2011). Sinyal peptidinin varlığı, proteinlerin aktivite bölgesi hakkında önemli bir ipucu vermektedir.

Bu bilgi daha sonra proteinin işlevinin netleştirilmesine ve böylece, bu proteinin uygun bir hedef molekül olup olmadığının belirlenmesine yardım etmektedir (Selzer vd. 2018). SignalP programı sinirsel ağların kullanımına dayanarak tasarlanmıştır.

PredAlgo: Tüm genom ölçeğinde proteinlerin hücre altı lokalizasyon bölgelerinin tahmin edilmesi için kullanılan bir yazılım programıdır. Bu amaçlı diğer programlar, kara bitkilerine yöneliktir ve nükleer kodlu alg proteinlerinin lokalizasyonunu yanlış tahmin edebilmektedir ve birçok kloroplast proteinini mitokondri hedefli olarak öngörmektedir. PredAlgo programı, bu proteinlerin yeşil alglerdeki üç hücre içi bölmeden -mitokondri, kloroplast ve salgı yolu- birine hücre içi lokalizasyonunu öngörmektedir (Tardif 2012). Bu aracı kullanan araştırmacılar, bir hücredeki proteinin büyük olasılıkla nerede lokalize olacağını bir dereceye kadar sebeple tahmin edebilmektedirler. Bunun nedeni, proteinlerin, sinyal peptid dizilerini tanıyan ve proteini uygun konuma hareket ettiren hücre mekanizması tarafından lokalize edilmesidir. Sinyal peptidi genellikle hedefe ulaşıldıktan sonra bölünür. Protein lokalizasyonu önemlidir çünkü bir proteinin sahip olabileceği önerilen bir rolü destekler (Horton vd. 2007). Nükleer kodlu *C. reinhardtii* proteomunun yaklaşık %18'inin kloroplasta ve %15'inin mitokondriye hedeflendiği tahmin edilmiştir. (Tardif 2012).

ClustalW/ Clustal Omega: İki'den fazla nükleotid veya protein dizisini karşılaştırmak için, tüm diziler çiftler halinde karşılaştırılabilir ve daha sonra bu hizalamalar incelenebilir. Bu amaçla bilinen en iyi programlardan biri ClustalW'dır (Thompson vd. 1994). ClustalW, günümüzde yerini Clustal Omega'ya (Sievers vd. 2011) bırakmıştır. Bu programlar, benzer dizilerin çoğunlukla homolog olduğu gerçeğinden hareket etmektedir. Çoklu hizalamanın temelini, bütün dizilerin ikili hizalamaları oluşturmaktadır. Daha sonra diziler arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren bir filogenetik ağaç oluşturulmaktadır.

Clustal Omega programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuş ve organizmalar arasındaki filogenetik ilişkinin ve bunların atalarının analizi gerçekleştirilmiştir.

RNA-Sekans Yaklaşımı (RNA-Seq): Yakın zamanda geliştirilen derin dizileme teknolojileri kullanarak genom çapında transkriptom profillemesi sağlayan bir yaklaşımdır (Wang vd. 2009). RNA-Seq, transkript seviyelerinin ve bunların izoformlarının diğer yöntemlerden çok daha hassas bir ölçümünü sağlamaktadır. RNA-Seq yaklaşımı, birkaç ökaryot transkriptomunu karakterize etmede şimdiye kadar yapılan ilerlemeleri açıklamaktadır (Wang vd. 2009). González-Ballester vd. (2010)'nin çalışmasında, *C. reinhardtii*'nin besin açısından zengin ve sülfattan yoksun yabani tip ve *snrk2.1* mutantı hücrelerinin transkriptom analizlerinde mikrodizi hibridizasyonu ve RNA-seq teknolojisi kullanılmıştır. *snrk2.1* mutantı, sülfür yoksunluğuna aklimasyon için gerekli olan düzenleyici Ser-Thr kinaz SNRK2.1 için anlamsızdır(null). Kantitatif RT-PCR teknikleriyle elde edilen sonuçlar, ekspresyon seviyelerini mikroarray hibridizasyonlarından çok, RNA-sekansının daha geniş bir dinamik aralığı rapor ettiğini göstermiştir (González-Ballester vd. 2010).

Protein Veri Bankası (PDB): Biyolojik makromoleküllerin deneysel olarak tanımlanmış kristal yapılarının toplandığı bir veri tabanı olup ABD, Avrupa ve Japonya'da bulunan bir konsorsiyum ile koordine edilmektedir (Berman vd. 2000).

PDB dosyaları, modelleri, görüntüleyicileri olarak yapıların atomik koordinatları, molekül yapı analizi ve sınıflandırmayla ilgili bilgileri içermektedir (Kaya vd. 2010).

FASTA Dizi Format: Dizi verileri için en genel format FAST (hızlı) ve Alignment (karşılaştırma)'ın birleşimiyle oluşmuş FASTA formatıdır (Pearson ve Lipman 1988). Birçok program dizileri okumak veya sonuçları rapor etmek için FASTA formatını kullanmaktadır. FASTA formatının temel özelliği hızlı benzerlik araştırmaları için kullanılan ve sadece diziyi içeren bir format olmasıdır. FASTA formatı (>) işareti ile başlar ve daha sonrasında hiç boşluk bırakılmadan bir belirleyici ve sonrasında ise tanımlama dizisinden oluşmaktadır (Kaya vd. 2010).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Temel Bölgesel Hizalama Arama Aracı): Aynı ya da farklı organizmalar arasında nükleotid ya da protein dizisi karşılaştırılması ve benzer bölgelerin araştırılması için kullanılan yüksek hızda bir bilgisayar programıdır (Kaya vd. 2010). Sezgisel bir yöntem kullanıldığı için sabit uzunluktaki dizi çiftlerini tanımlayabilen bir bölgesel hizalama metodudur (Altschul vd. 1990). Dizi kısımları daha sonra ayarlanan eşik parametrelerine ulaşıncaya kadar uzatılmaktadır.

BLAST, dizi benzerliğinin hesaplanmasında sıklıkla kullanılan bir araçtır ve genel erişime açık veri tabanlarında gen ve protein dizilerinin kıyaslanmasını yapan bir yazılımdır. BLAST farklı veri tabanlarına karşı farklı bilinmeyen diziler ile birlikte kullanım için varyasyon geçirmektedir. Hangi BLAST programının kullanılacağı ve diğer yardımcı dokümanların bilgilerine ek olarak, bütün BLAST uygulamaları BLAST ana sayfasında bulunmaktadır (Kaya vd. 2010).

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması için kullanılan cihazlar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün araştırma laboratuvarı imkanlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan cihazlar, markaları ve kullanım amaçları

Cihaz	Marka / Model	Kullanım Amaçları
Çalkalayıcı	Ruiwell / MPS-10	Sıvı kültürün büyütülmesinde
Santrifüj	Isolab / FY2405000	Örneklerin çöktürülmesinde
Soğutmalı santrifüj	Sigma / 1-16K	RNA izolasyonu aşamalarında örneklerin çöktürülmesinde
Büyük ölçekli santrifüj	Hettich / UNIVERSAL 320	Hücre kültüründen pellet elde etmek için hücrelerin çöktürülmesinde
Biyogüvenlik kabini	Tezsan / Class II tip	Besi yeri dökülmesi ve kültür ortamının hazırlanmasında
Işık mikroskobu	Primovert Zeiss	Hücre sayımı
Vorteks	Velp / ZX3	Homojen dağılımı istenen maddelerin karışmasında
Manyetik karıştırıcı	Daihan / MSH-20A	Besi yeri ve çözeltilerin hazırlanmasında
Otoklav	Autoclave / 23X-500E	Besi yeri ve kullanılan malzemelerin sterilizasyonunda
Buz makinası	Genbiotek, H-IMS-50	Deneyler sırasında örneklerin muhafazasında
pH metre	Ohaus / ST3100-F	Çözeltilerin pH ayarlamasında
PCR cihazı	Bio-Rad / T100TM	Gen bölgelerinin çoğaltılması
BioDrop	PT. INDOLAB UTAMA/ BİODROP DUO	RNA örneklerinin kalitatif tayininde
Hassas terazi	KERNPLJ / 700-3CM	Kimyasalların tartımında
Mikrodalga fırın	Vestel / MD 20 DB	Agaroz jel hazırlanmasında
Yatay jel elektroforez cihazı ve elektroforez güç kaynağı	Fisher Scientific / Midi300V/4	RNA'nın boyutunun belirlenmesinde, PCR ve RT-PCR ürünlerinin tespit edilmesi
Jel görüntüleme analiz sistemi	DNR Bio-Imaging Systems / MiniLumi	Ultraviyole altında RNA ve PCR bantlarının gözlenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Mikropipet seti	AXYGEN	Çalışma boyunca tüm sıvıların (kültür, kimyasal vb.) aktarılmasında
Saf su cihazı	Mes / Mp Minipure Mes13	Çalışma boyunca ihtiyaç duyulan saf suyun temin edilmesinde
Buzdolabı (4 °C / -20 °C)	Beko / 945271 MB	Örneklerin saklanması
Derin Dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific	Örneklerin saklanması

3.2. Çalışmada Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar

Tez çalışmasında kültür ortamı olarak sıvı TAP (Tris Asetat Fostat) ve TAP -S (Sülfatsız Tris Asetat Fosfat) besi yerleri kullanılmıştır.

TAP ve TAP -S besi yeri hazırlanışı: Formüle ve istenen hacme göre hesaplanan besi yeri bileşenleri ayrı ayrı hassas terazide tartılmıştır. 1 L besi yeri hazırlamak için, yaklaşık 500 ml distile suya manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılırken kimyasallar sırasıyla eklenmiştir. Bir sonraki eklemeden önce her birinin tamamen çözündüğünden emin olunmuştur. Distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlanmıştır. Besi yerleri 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C'de 30 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Hazır olan besi yerleri oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. TAP -S besi yeri için, sülfat içermeyen solüsyon A ve sülfat içermeyen Hutner iz element solüsyonu kullanılmıştır (Hutner vd. 1950).

Çalışma boyunca kullanılan besi yerleri ve solüsyonların içeriği Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besi yerleri ve solüsyonların içeriği

TAP (pH:7)	1 L	Solüsyon A (500 ml için)	
1M Tris bazı (Trizma)	2.42 g	NH ₄ Cl	20 g
Fosfat tamponu II	1 ml	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
Solüsyon A	10 ml	CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5 g
Hutner iz element solüsyonu	1 ml	Fosfat tamponu II (100 ml için)	
Glasiyal asetik asit	1 ml	K ₂ HPO ₄	10.8g
dH ₂ O	~1 L	KH ₂ PO ₄	5.6g
TAP -S (pH:7)	1 L	Sülfatsız solüsyon A (1L)	
1M Tris bazı (Trizma)	2.42 g	NH ₄ Cl	8 g
Fosfat tamponu II	1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O	1.6 g
Sülfatsız solüsyon A	50 ml	CaCl ₂ .2H ₂ O	1 g
Sülfatsız Hutner iz element solüsyonu	1 ml		
Glasiyal asetik asit	1 ml		
dH ₂ O	~1 L		

İz element solüsyonu: Belirtilen malzemeler ayrı ayrı tartılmıştır ve erlene aktarılmıştır. Tartılan besi yeri bileşenleri distile su içerisinde çözdürülmüştür. EDTA sodyum tuzu ayrı olarak sıcak suda çözdürülmüştür. 85 ml %20'lik KOH ile pH yaklaşık 6.7 -7'ye ayarlanmıştır. Oda sıcaklığına geldikten sonra toplam hacim 1 L'ye getirilmiştir ve solüsyon yaklaşık bir hafta manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırılmıştır. TAP -S besi yeri için Hutner iz element solüsyonunda sülfat tuzu içeren kimyasallar yerine klorür tuzu içerenler kullanılmıştır ve Çizelge 3.2. ve Çizelge 3.3.'de solüsyon içerikleri gösterilmiştir. Çalışma boyunca kullanılan tüm kimyasalların markası Sigmadır.

Çizelge 3.3. Hutner iz element solüsyonu ve sülfatsız iz element solüsyonu içeriği

Hutner iz element solüsyonu	1 L
EDTA sodyum tuzu	50 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	22 g
H ₃ BO ₃	11.4 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	5.06 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1.61 g
CuSO ₄ .5 H ₂ O	1.57 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	1.1 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	4.99 g
KOH (%20)	85 mL
Sülfatsız Hutner iz element solüsyonu	1 L
EDTA sodyum tuzu	50 g
ZnCl ₂	10 g
H ₃ BO ₃	11.4 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	5.06 g
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1.61 g
CuCl ₂ . 2 H ₂ O	1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	1.1 g
FeCl ₂ .4 H ₂ O	3.6 g

0.5 M EDTA: Bileşenler hassas terazide tartılmıştır. EDTA ilk olarak ~150 ml distile sıcak suda karıştırılıp çözündürülmüştür. Karışıma NaOH taneleri eklenmeye başlanmıştır ve pH 8’de stabil oluncaya kadar NaOH eklenmiştir. Son olarak toplam hacim 250 ml’ye tamamlanmıştır ve 1.1 atmosfer basınç altında 121 °C’de 30 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

0.5M EDTA (pH:8)	250mL
-EDTA 2Na ₂ H ₂ O	46.5g
-NaOH	~5g
-dH ₂ O	~250ml

Tris asetat EDTA tamponu (TAE Buffer 50X): Tartılan kimyasallar distile suda çözündürülmüştür, pH 8’e ayarlanmış ve hacim 1 litreye tamamlanmıştır. Solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır ve hazır olan tampon oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Çalışmada 50X stok çözeltisinden 1X hazırlanıp kullanılmıştır. Tampon içeriği aşağıda belirtilmiştir.

TAE tamponu (50X)	1 L
-Tris bazı	242 g
-Glasiyel asetik asit	57.1 ml
-EDTA (0.5 M pH:8)	100 ml

Tris asetat EDTA tamponu (TAE Buffer 1X): 50X TAE stok çözeltisinden 20 ml alınarak 980 ml distile suyla 1L'ye tamamlanmıştır. Tampon oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.3. Kullanılan Primerler

C. reinhardtii'ye ait tanımlanan 19 adet ARS geni için primerler tasarlanmıştır (Çizelge 3.4.). Genlerin Phytozome veri tabanındaki gen modellerine göre primerler tasarlanmıştır. Primer3 programı kullanılarak her bir gen için ekzon bölgesine bağlanacak şekilde ikiye çift primer dizayn edilmiştir (Köressaar vd. 2018; <https://github.com/primer3-org>). Primerler 100-200 bp büyüklükte ürün oluşturacak şekilde tasarlanmıştır. Bazı genlerde ilk denenen primerlerden ürün oluşmadığı veya spesifik ürün oluşmadığı için ikinci primer çifti tasarlanıp kullanılmıştır. Gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan RealTime PCR'da house keeping gen olarak (iç kontrol) *CBLP* geni kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan primerler ve dizilimleri

Gen	Primer Adı	Sekans Bilgisi (5'-3')	Beklenen Ürün Büyüklüğü (bp)	Beklenen gDNA Büyüklüğü (bp)
ARS1	qARS1-F	GTACTGCCGCGTGC GTGATTCC	226	226
	qARS1-R	CCTAAACATTTGGCTCCGCAGTCC		
ARS2	qARS2-E15F	CGCGCCGTCAC TTGTTTGTG	195	195
	qARS2-3UTRR	GCCCACTTCTTTACCCAGCACCTC		
ARS3	qARS3-E2F	GTGCGGTCTGTGCTATT CAG	138	512
	qARS3-E3R	GGATAGTATCTCGGCAGGCA		
ARS4	qARS4-E11F	GAGTGCCGTTC TTTATCCG	162	542
	qARS4-E13R	GCATGAGGGGCTCTGACA		
ARS5	qARS5-E2F	CCTGGGCTACAACACCTACT	109	278
	qARS5-E3R	GGTTAGCGGGTCAAACATGT		
ARS6	qARS6-E10F	CCTGCGTGATATCGTGGTTG	195	581
	qARS6-E12R	GGCCTACCGATGTGAAGGAA		
ARS7	qARS7- E14F	TAGAGTTGATAGCGCGAGGG	118	319
	qARS7- E15R	GGAGATGGCACGGAAAAGAC		
ARS8	qARS8-E15F	TTCACCGTCACAGCCGAG	185	303
	qARS8-E16R	TTCTGCTGCTCAACTGATGC		
ARS8*	qARS8-E20F*	CCAGAGAACGAGAAGGCTGA	175	175
	qARS8-3UTRR*	GCCCACTTAAACTGCCCA		
ARS9	qARS9-E15F	TCGTACTGCTCGTCCATGG	123	410
	qARS9-E16R	GCTGGATGCGTTGCTTGC		

" (Devamı Arkada) "

Çizelge 3.4.'ün devamı

Gen	Primer Adı	Sekans Bilgisi (5'-3')	Beklenen Ürün Büyükliği (bp)	Beklenen gDNA Büyükliği (bp)
ARS9*	qARS9-3UTRR*	CATTTGCGCCAGATGTCCAC	199	199
	qARS9-E16R*	TTGGATATCTACGGGCTGCG		
ARS10	qARS10-E7F	CAATGGGCTTGCCGTAGTTG	160	373
	qARS10-E8R	GAGGACTCCGTGGACTCTG		
ARS11	qARS11-E10F	GGACTGACAAGCATTACCGC	149	380
	qARS11-E11R	CTGGCCCAATTTGAATCCGT		
ARS12	qARS12-E4F	TCTGGTACTGCTTGGGGAAG	168	377
	qARS12-E5R	TGAACGCCTACATGACCACT		
ARS13	qARS13-E6F	CAAAGTACGTCTGCACCTCG	101	252
	qARS13-E7R	TCAGGACTTCACCACGGATT		
ARS14	qARS14-E13F	GACGTCCGAGTGCCCATG	153	372
	qARS14-E14R	TGCTGCGCCGTCAATCTC		
ARS15	qARS15-E12F	CGGACATTAACGAGCGCTAC	179	347
	qARS15-E13R	AGTGAACCTCTCTCGCGGAA		
ARS16	qARS16-E12F	GACATCCCAGCCACCATCTT	104	302
	qARS16-E13R	TGGTCATACAGGTCAGTGGT		
ARS17	qARS17-E9F	CCTGCCAGGTTTATGAGGGT	141	432
	qARS17-E10R	CAACGCGGGCAAGTACATG		
ARS18	qARS18-E15F	GTCCACCTTGTCGAGATGA	162	1103
	qARS18-E17R	ACCGACTCCAGATTCAGGTG		
ARS19	qARS19-E11F	CTTGAGGGCTGGGAAGGG	115	256
	qARS19-E12R	GGAGCAGTTTGGTGTCACTG		
CBLP	qCBLP-F1	CTTCTCGCCCATGACCAC	105	254
	qCBLP-R1	CCCACCAGGTTGTTCTTCAG		

*: İkinci çift tasarlanan primerler.

3.3.1. Primerlerin sulandırılması

Şirket (Letgen Biyoteknoloji) tarafından sentezlenen primerler, liyofilize olarak teslim edilmiştir. Şirket primerleri liyofilize halde gönderdiği için ilk açıldığında kapak kısmında olabilecek partiküllerin dökülmesini engellemek amacıyla primerler açılmadan önce kısa bir santrifüj yapılmıştır. Liyofilize ürünler şirket tarafından gönderilen talimatlara uygun olarak distile su ile 100 µM konsantrasyonda olacak şekilde sulandırılmıştır. Sulandırma işleminin ardından primer hidrasyonunun sağlanması için birkaç saat bekletildikten sonra primerler kullanılmıştır.

3.4. Hücre Kültürü

Kullanılan *C. reinhardtii* yabanıl tip CC-124 mt(-) suşu stok kültürü Chlamydomonas Resource Center, USA (www.chlamy.org) ticari kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. *C. reinhardtii* CC-124 suşu hücre duvarı olan bir suştur. Çalışmada kullanılan *C. reinhardtii* hücreleri, sıvı TAP (Tris asetat fosfat) besi yerinde (Gorman ve Levine, 1965) $2-4 \times 10^6$ hücre/mL yoğunluğa ulaşacak şekilde oda

sıcaklığında 120 rpm hızda çalkalayıcı üzerinde üretilmiştir. Starter kültürden hücre sayımı yapıp sülfat açlığı için kullanılacak deneysel kültür hazırlanmıştır. Bu kültür yine $2-4 \times 10^6$ hücre/mL yoğunluğa ulaşınca 20 mL alınarak santrifüj edilmiş, besi yeri uzaklaştırılmış ve pelletteki hücrelere RNA degradasyonunu önleyen lizis solüsyonu (TRIzol-Trizol®Reagent, Invitrogen/Life Technologies, Cat. No. 155961) eklenerek -80 C°'de RNA izolasyonu için saklanmıştır. Kültürün geri kalan kısmı da santrifüj edilerek, içeriğindeki besi yeri atılmış ve aynı hacimde sülfat içermeyen besi yeri (TAP-S) eklenmiştir. Sülfat içermeyen besi yeri hücrelere eklendiği zaman not edilmiş ve bu zamandan sonra değişik aralıklarla (5h ve 24h) kültürden örnek alınmıştır. Elde edilen pelletlere TRIzol/ lizis solüsyonu eklenmiş ve RNA izolasyonu yapılacağı güne kadar hücreler -80 C°'de muhafaza edilmiştir.

3.4.1. Hemositometre ile hücre sayımı

Hücre sayımının kantitatif analizi için hemositometre kullanılmıştır. Hazırlanan hücre kültüründen hemositometre lamı üzerine 10 mikrolitre alınmış ve ışık mikroskobu altında, birim hacimde ne kadar hücre olduğu sayılmıştır. Kullanılan protokole göre hemositometre lamının üst ve alt çukurundaki 1 mm² alandaki ortadaki büyük kareler (25 kare) sayılmıştır. Üst ve alt çukurda yapılan sayımların ortalaması alınmıştır. Ortalama hücre sayısı sabit sayı (10^4) ile çarpılmış, eğer dilüsyon yapıldıysa en son çıkan sonuç dilüsyon faktörü ile çarpılmıştır. Böylece mililitrede kültür başına düşen hücre sayısı belirlenmiştir.

3.5. RNA İzolasyonu ve Kantifikasyonu

RNA, iki farklı yöntem kullanılarak izole edilmiştir. RNA kalitesi agaroz jel ile kontrol edilmiştir. Bu jelde iki keskin bandın varlığı RNA'nın kalitesinin yüksek olduğunun (degrade olmadığının) göstergesi olmuştur. RNA miktarı Biodrop ile belirlenmiştir.

RNA, ilk aşamada TRIzol protokolüne göre izole edilmiştir. İkinci aşamada elde edilen RNA'dan, genomik DNA kalıntılarını gidermek için örnekler RNaz içermeyen NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, REF: 50 Preps 740949.50) ile muamele edilmiştir.

Kültürden Trizol ile RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki uygulamalar yapılmıştır;

1. -80°C'den alınan pelletler çözdürülüp vortekslenmiş ve homojenize edilmiştir.
2. Hücre kültürü 5 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir
3. Eppendorf tüplerine 100 µl kloroform eklenmiş ve vorteks yapılmıştır.
4. 2-3 dk inkübasyona bırakılmıştır.
5. 12.000 g'de 15 dk (+4°C) santrifüj yapılmıştır.
6. Santrifüj sonrası faz ayrımı olmuştur. Elde edilen sıvı sırası ile DNA, protein, RNA olmak üzere 3 fazdan oluşmaktadır. En üst fazdaki RNA kısmı (beyaz-şeffaf) başka bir eppendorf tüpe aktarılmıştır.
7. Üzerine 200 µl izopropanol eklenmiştir. Hemen ters-düz yapılmıştır.

8. 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
9. 12.000 g'de 10 dk (+4°C) santrifüj yapılmıştır.
10. Santrifüj sonrası süpernatantın tamamı pelletten uzaklaştırılmıştır.
11. Pellete 500 µl %75'lik etanol eklenmiştir ve ters-düz yapılmıştır.
12. 7.500 g'de 5 dk (+4°C) santrifüj yapılmıştır. Ardından sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
13. 5-10 dk tüplerin kapakları açık olarak bekletilmiştir.
14. Pellet kuruyunca tüplere 40 µl nükleaz (RNAZ) içermeyen su eklenmiştir.
15. Buz üzerinde pelletin suda çözünebilmesi için 1 saat kadar bekletilmiştir.
16. Süre sonunda RNA'dan 1:20 dilüsyon yapılmıştır ve dilüsyonlu RNA ile jel yürütülmüş ve ölçüm yapılmıştır. Stok RNA pipetaj yapılarak -80°C'ye kaldırılmıştır.

RNA izolasyonu protokolü

RNA'dan, genomik DNA kalıntılarını gidermek için örnekler RNaz içermeyen NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel, REF: 50 Preps 740949.50) ile üreticinin protokolü takip edilerek saflaştırılmıştır. RNA'lar -80°C'den çıkarıldıktan sonra buz üzerinde çözünmesi beklenmiştir ardından vortekslenmiştir.

1. Tüplere 350 µL RA1 Buffer ve 3.5 µL β-merkaptotanol eklenmiştir ve kuvvetli bir şekilde vortekslenmiştir.
2. Yeni filtreli toplama tüpleri numaralandırılmıştır. Eppendorf tüplerindeki örneklerinin tamamı mikropipetle çekilip filtreli toplama tüplerine aktarılmıştır.
3. Filtreli toplama tüpleri santrifüj cihazına yerleştirilmiştir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
4. Süpernatant kısmı alınmış ve yeni numaralandırılmış eppendorflara aktarılmıştır, pellet kısmı ise atık olarak ayrılmıştır.
5. Eppendorftaki örneklere 350 µL %70'lik ethanol eklenmiştir ve pipetleme yapılarak karışması sağlanmıştır.
6. Yeni kolonlu tüpler numaralandırılmıştır. Eppendorf tüplerindeki örneklerin tamamı alınmaya çalışılarak yeni kolonlu tüplere eklenmiştir.
7. Santrifüj cihazı 11.000 g'de 30 saniyeye ayarlanmış ve çalıştırılmıştır.
8. Yeni toplama tüpleri numaralandırılmıştır. Santrifüjden çıkan tüplerin kolon kısmı alınıp yeni toplama tüplerine aktarılmıştır, süpernatant kısmı ise atık kutusuna dökülmüştür.
9. Yeni tüplere koyulan kolonların üzerine 350 µL MDB buffer eklenmiştir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüje bırakılmıştır.
10. Santrifüj bitince her bir tüpe 95 µL rDNase reaksiyon karışımı (10 µL reconstituted rDNase ve 90 µL reaction buffer for rDNase) eklenmiştir, tüplere hafifçe vurulmuştur ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
11. Ardından ilk yıkama işlemi için 200 µL Buffer RAW2 eklenmiştir ve 11.000 g'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
12. Santrifüj sonrası kolonlar yeni numaralandırılmış temiz toplama tüplerine koyulmuştur.

13. İkinci yıkama için tüplere 600 µL Buffer RA3 eklenmiştir ve 11.000 g'de 30 saniye santrifüje bırakılmıştır. Santrifüj sonrası tüpün içindeki sıvı atık kutusuna dökülmüştür.
14. Üçüncü yıkama için tüplere 250 µL Buffer RA3 eklenmiştir ve 11.000 g'de 2 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası tüpteki kolon kısmı yeni numaralandırılmış tüplere koyulmuştur.
15. Son aşama olarak kolonların tam ortasındaki filtreye denk gelecek şekilde 60 µL nükleaz içermeyen su eklenmiştir ve 11.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
16. Santrifüj sonrası kolonlar atık olarak ayrılmıştır, RNA -80°C'de muhafaza edilmiştir.
17. RNA'dan 1:20 dilüsyon yapıp jel yürütülmüş ve Biodropta ölçüm yapılmıştır.

Total RNA miktarının belirlenmesi

RNA izolasyonu sonrası kantitatif analiz için Biodrop (OD 260 ve OD 280 nm'de) ölçümü yapılmıştır. RNA'nın miktarını ve saflığını belirlemek için izole edilen her bir RNA örneğinden 1 µl, nükleazsız sudan 19 µl alınarak 1: 20 oranında sulandırma yapılmıştır. Bu dilüsyonun 260 ve 280 nm'de optik dansite ölçümü yapılmıştır.

3.6. Agaroz Jel Elektforezi ve Örneklerin Yürütülmesi

RNA ürünlerinin Ultraviyole (UV) ışığı altında görüntülenebilmesi için %1'lik agaroz jel ve 1 kb DNA Ladder (Cat. No: SM0311) kullanılmıştır. PCR ürünlerinin görüntülenmesinde ise %3'lük agaroz jel ve 50bp DNA Ladder (Cat. No: MG-LDR-50) kullanılmıştır.

%1'lik agaroz jel hazırlama: Hassas terazide 2 g agaroz tartılıp bir erlene aktarılmıştır. Üzerine 200 ml 1X TAE tamponu eklenerek hafifçe çalkalanıp mikrodalga fırına koyulmuştur. Mikrodalga fırında yüksek ısıda, aralıklarla erlen mikrodalgadan çıkarılıp karıştırılarak tamamen çözülene kadar ısıtılmıştır ve homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Trayin çatlamaması için jel birkaç dakika soğumaya bırakıldıktan sonra, 2 µL etidiyum bromür eklenmiştir ve çalkalayarak tüm çözeltiye dağılması sağlanmıştır. Son olarak jel tarakların yerleştirildiği traye yavaşça dökülüp polimerize olması için en az 30 dakika beklenmiştir. Tarak, polimerize olan jelin üzerinden yavaşça çekilmiştir. Elektforez işlemi için hazır hâle gelen jel, elektforez tankına alınmıştır ve jelin üstünü kapatacak kadar 1X TAE tamponu ile doldurulmuştur.

%3'lük agaroz jel hazırlama: Hassas terazide 6 g agaroz tartılıp, 200 ml 1X TAE ile bir erlende birleştirilmiştir. Mikrodalga fırında ısıtılarak homojen bir çözelti elde edilmiştir. Biraz soğuduktan sonra 2 µL etidiyum bromür eklenmiştir ve çalkalanmıştır. Ardından çözelti tarakların yerleştirildiği traye dökülüp polimerize olması için beklenmiştir.

Örneklerin jele yüklenmesi ve yürütülmesi

Küçük bir parça parafilm alınmıştır ve 2 µl yükleme boyası (6X Loading Dye) parafilme koyulmuştur. RNA ve RT-PCR ürünlerinin 6 µL'si yükleme boyası ile

parafilm üzerinde karıştırılıp jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Bir kuyucuğa da marker (Thermo Scientific/GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Cat. No: SM0311; Hibrigen/50bp DNA Ladder, Cat. No:MG-LDR-50) yüklenmiştir. Örnekler 100-150 Volt elektrik akımı ile 30-50 dakika boyunca 1X TAE tampon çözeltisinin içerisinde yürütülmüştür. Daha sonra jel görüntüleme cihazına (DNR Bio-Imaging Systems/ MiniLumi) yerleştirilmiş ve UV ışığı altında görüntülenip fotoğrafı çekilmiştir. Sonuçta konsantrasyon, degradasyon ve kontaminasyon (RNA) ile ilgili fikir edinilmiştir.

3.7. Revers (Ters) Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

RNA'ların komplementer DNA'ya (cDNA) çevrilmesinde ticari kit (OneScript® Plus Reverse Transcriptase- OneScript® Plus cDNA Synthesis Cat. No: E018) kullanılmıştır. Ters transkripsiyon için 1ng- 2µg arasında total RNA kullanılmış ve total reaksiyon hacmi 20 µL olmuştur. Elde edilen cDNA 1:10 ya da 1:20 oranda seyreltilmiş ve 2-5 µL PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Toplam RNA'dan cDNA sentezi

cDNA'lar kit kullanılarak ve üreticinin protokolü izlenerek yapılmıştır;

1. -80°C'den alınan RNA ve diğer tüm bileşenler buz üzerine alınarak çözündürülmüştür ve her çözelti hafifçe vortekslenerek karıştırılmıştır.

2. Her bir tüp için buz üzerinde karışım hazırlanmıştır.

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Konsantrasyon</u>
RNA	Değişken	1ng- 2 µg/rxn
Random primer	1µl	0.5 µM
dNTP Mix (10mM)	1µl	500 µM
Nükleazsız su	14.5 µl'ye kadar	-

3. RNA ve primer, RNA'nın sekonder yapısını denatüre etmek için 5 dk 65°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hızlıca tüpler buz üzerine alınarak primerin DNA'ya bağlanması için 1 dk inkübe edilmiştir. Tüm bileşenleri bir araya toplamak için kısa bir santrifüj yapılmıştır.

4. Reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışım içinde her bir tüp için aşağıdaki bileşenler eklenmiştir;

<u>Bileşenler</u>	<u>Hacim</u>	<u>Konsantrasyon</u>
5X RT Buffer	4 µl	1X
RNaseOFF Ribonuclease inhibitörü	0.5 µl	20U/rxn
OneScript ® Plus RTase	1 µl	200 U/rxn

Her bir tüp üzerine 5,5 µl mix eklenerek son hacim 20 µl tamamlanmıştır.

5. Reaksiyon karışımının homojen olması için pipetaj yapılmıştır ve kısa santrifüj yapılarak reaksiyon tüpün dibinde toplanmıştır. Random (hekzamer) primer kullanıldığı için 25°C'de 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.
6. Daha sonra tüpler 50°C'de 50 dk inkübe edilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.
7. Son olarak 5 dk 85°C'de ısı şoku uygulanarak enzim inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.
8. Elde edilen cDNA ya hemen kullanılmış ya da daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'ye kaldırılmıştır.
9. Elde edilen cDNA'lar PCR reaksiyonlarında seyreltilerek kullanılmıştır.

3.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction- PCR)

RT-PCR çalışmalarının son aşamasında elde edilen cDNA'ların amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonlarında her örnek için master mix (AMPLIQON GC TEMPase 2X Master Mix I, Cat. No: A331703; RealQ Plus 2X Master Mix Green, Cat. No: A323402) kullanılarak reaksiyon bileşenleri hazırlanmıştır. PCR reaksiyon bileşenleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir. Örnek sayısı kadar hazırlanan PCR tüplerine karışım 18'er µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Her bir örneğin cDNA'sı PCR tüplerine 2 µl olarak ilave edilmiştir. Sonuçta PCR amplifikasyonu için her genden 2 µl cDNA kullanılmıştır. PCR döngüsü Çizelge 3.6.'da belirtilen adımlarla gerçekleştirilmiştir. Daha sonra elde edilen PCR ürünlerinin kalitesi ve büyüklüğünü kontrol etmek amacıyla ürünler %3'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Kullanılan DNA büyüklük belirteçleri ampikon boyutuna uygun olarak seçilmiştir. Son olarak jel UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.5. PCR bileşenleri

Bileşenler	Hacim (µL)
2x Master mix(PCR karışımı)	10 µl
Left primer (10 µM)	2 µl
Right primer (10 µM)	2 µl
cDNA	2 µl
Nükleazsız su	4 µl
Toplam hacim	20 µl

Çizelge 3.6. PCR döngüsünde bir döngüye karşılık gelen basamakların (sıcaklık-zaman) sıralı gösterimi

Reaksiyon basamakları	Sıcaklık (°C)	Zaman	
Ön denatürasyon	95 °C	15 dk	
Denatürasyon (1.basamak)	95 °C	30 s	} 35 döngü
Primer bağlanması (2.basamak)	55-58°C*	30 s	
Zincir uzama (3.basamak)	72 °C	20-25s**	
Son Uzama	72 °C	5 dk	
Soğutma	4 °C	∞	

*Kullanılan primerlerin T_m (erime sıcaklığı) değerinin 3-5 derece altında belirlenmiştir.

**Uzatma süresi ürünün büyüklüğüne göre belirlenmiştir.

3.9. Arilsülfataz Genlerinin Filogeni Analizi

C. reinhardtii'nin ARS proteinleri arasındaki evrimsel yakınlığı belirlemek amacıyla filogenetik ağaç çizilmiştir. Phytozome veri tabanında bulunan 19 adet ARS geninin alignment işlemi Clustal Omega kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Sievers ve Higgins 2014). Filogenetik analizlerde, filogenetik ilişkileri yeniden yapılandırarak hizalama (MUSCLE), iyileştirme (Gblocks), filogeni (PhyML) ve ağaç oluşturmaya (TreeDyn) sağlamak için <http://www.phylogeny.fr/bioinformatic> portalı kullanılarak koordine edilen birkaç biyoinformatik programı kullanılmıştır (Dereeper vd. 2008). Çalışmanın güvenilirliği için bakteri ve hayvan genomlarına ait ilgili sekans verileri de çalışmaya dahil edilerek karşılaştırmalı analizler yapılmıştır.

3.10. Arilsülfataz Genlerinin Biyoinformatik Analizi

Çalışmada kullanılan genlerin ismi ve modelleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir. *C. reinhardtii* ve *Volvox carteri* türleri için gen modelleri ve protein sekansları Phytozome 12.1 Bitki Genomik Kaynakları (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) veri tabanından alınarak kullanılmıştır. *Homo sapiens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Rhodospirillum rubrum* türlerinin erişim numaraları (accession number) ve protein sekansları NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veri tabanından alınmıştır.

ARS proteinlerinin olası fonksiyonları hakkında ön bilgi sahibi olmak için Phytozome veri tabanında bulunan 19 adet ARS geninin protein sekansları kullanılarak biyoinformatik analizler yapılmıştır. ARS genlerinin hücre içi olası yerlerinin belirlenmesi için PredAlgo programı kullanılmıştır. ARS proteinlerinin öngörülen hücre içi lokalizasyon bölgeleri Çizelge 4.1.'de belirtilmiştir.

ARS proteinlerinin domain yapılarının analizinde SMART veri tabanı kullanılmıştır (<http://smart.embl.de/>). TMHMM programı da kullanılarak ARS proteinlerinin transmembran domain bölgeleri tahmin edilmiştir. SMART veri tabanından çıkan sonuçlarla, TMHMM programından çıkan sonuçlar karşılaştırılmıştır. ARS proteinlerinin transmembran domaini taşıyıp taşımadığı Çizelge 4.1.'de belirtilmiştir.

ARS gen modellerinin protein domain bölgelerini belirlemek amacı ile Pfam (Protein families) veri tabanı kullanılmıştır (<http://pfam.xfam.org/>). Sekans arama seçeneğine protein sekansı yapılandırılmış ve sonuçlar daha sonra tablo haline getirilmiştir (Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.4.).

ARS protein sekanslarının fonksiyonel motiflerini belirlemek için Protise veri tabanı kullanılarak motif analizi yapılmıştır (<http://prosite.expasy.org/>). Prosite veri tabanında bazı gen modellerinin sonucuna ulaşamamıştır ancak hizalama (alignment) işlemi yapıldığında tüm gen modellerinin ortak bir motif içerdiği görülmüştür. Prosite veri tabanından elde edilen motif sonuçları Çizelge 4.1. ve Şekil 4.3.'de verilmiştir.

ARS proteinlerinin sinyal peptid analizi için Phobius ve SignalP programları kullanılmıştır. (<http://phobius.cgb.ki.se>, <http://phobius.binf.ku.dk> ve <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Sinyal peptid analizi sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

ARS gen modellerinin hizalama işlemleri ClustalO ve ClustalW programları kullanılarak yapılmıştır (www.clustal.org). ARS proteinleri arasında evrimsel ilişkileri göstermek için <http://www.phylogeny.fr/bioinformatic> portalı kullanılarak bir filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

ARS gen modellerinin izoelektrik noktaları ve molekül ağırlıklarını bulmak için ExPASy/Compute pI-Mw veri tabanı kullanılmıştır. Tüm genlere ait elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

Çizelge 3.7. Phytozome ve NCBI'da bulunan bazı ARS gen modelleri

Gen Modeli -Erişim Numarası	Gen İsmi	Gen Uzunluğu (bp)	Protein Uzunluğu(aa)	İzoelektrik Noktası ve Molekül Ağırlıkları (pI/Mw)
Cre16.g671400	ARS1	6.399	649	7.97 / 72472.63
Cre16.g671350	ARS2	5.365	649	6.95 / 72511.57
Cre10.g430200	ARS3	6.308	705	7.54 / 75640.37
Cre01.g012100	ARS4	6.992	750	9.08 / 81317.60
Cre10.g431800	ARS5	3.762	635	8.08 / 70123.64
Cre02.g085850	ARS6	8.326	1.040	8.64 / 110962.54
Cre01.g011901	ARS7	9.350	1.491	9.43 / 152157.42
Cre02.g086000	ARS8	7.382	1.036	8.56 / 109452.24
Cre02.g090550	ARS9	9.041	1.215	5.23 / 121693.17
Cre04.g226050	ARS10	6.734	734	6.46 / 80732.41
Cre04.g226550	ARS11	7.602	736	5.12 / 80496.66
Cre04.g226600	ARS12	5.448	718	8.15 / 77280.80
Cre05.g239750	ARS13	6.436	688	7.16 / 75302.43
Cre05.g239800	ARS14	8.327	904	6.67 / 98084.01
Cre05.g239900	ARS15	8.662	724	8.63 / 78700.04
Cre06.g293800	ARS16	7.532	732	9.00 / 76840.57
Cre07.g328500	ARS17	7.766	722	7.61 / 78143.19
Cre10.g432600	ARS18	12.501	1.933	5.91 / 201538.54
Cre01.g012126	ARS*	5.752	570	7.93 / 61602.95
Vocar0001s1077	-	7.705	962	6.25 / 95219.46
Vocar0019s0117	-	8.310	660	7.86 / 73131.59
Vocar0019s0115	-	13.045	1.517	7.21 / 164314.36
Vocar0004s0409	-	16.538	1.292	9.33 / 138640.41
Vocar0025s0060	-	7.764	649	6.68 / 72287.18
Vocar0001s1375	-	8.485	1.238	9.27 / 131123.43
CAG30269	ARSA	12.426	509	5.65 / 53806.43
NP_000037	ARSB	216.326	533	8.43 / 59687.24

" (Devamı Arkada) "

Çizelge 3.7.'nin devamı

Gen Modeli -Erişim Numarası	Gen İsmi	Gen Uzunluğu (bp)	Protein Uzunluğu(aa)	İzoelektrik Noktası ve Molekül Ağırlıkları (pI/Mw)
Q5FYA8	ARSH	-	562	8.48 / 63525.25
AAH22389	ARSF	79.496	590	6.76 / 65965.70
NP_001660	ARSD	32.382	593	6.78 / 64859.76
CAA58556 NP_000038	ARSL ARSE	36.460	589	6.48 / 65668.89
NP_001307680 XP_011543818	ARSC STS	217.390	590	7.30 / 66282.21
XP_011522838	ARSG	199.912	552	5.84 / 59816.61
NP_001012301 XP_291139	ARSI	13.624	569	8.82 / 64030.27
NP_078866	ARSJ	-	599	9.15 / 67235.45
NP_937793 XP_087728	ARSK	-	536	9.02 / 61450.44
NP_001121677	Sulf-1	201.289	871	9.23 / 101026.76
NP_001373977 XP_005260515	Sulf-2	-	870	9.30 / 100454.62
NP_000503	GALNS	50.233	522	6.25 / 58026.03
NP_002067	GNS	53.005	552	8.60 / 62082.09
NP_000193	IDS	33.569	550	5.21 / 61873.01
NP_000190	SGSH	18.121	502	6.46 / 56695.37
NP_864910	-	4.833	1.610	5.91 / 178354.95
ARU34095	-	1.611	562	7.63 / 62187.27

*: Phytozome veri tabanında bu gen modeline henüz numara verilmemiştir.

Transkripsiyon düzeyleri RT-PCR ile belirlendikten sonra değişim görülen genlerin mRNA düzeylerinin daha hassas bir yöntem olan RT-qPCR ile belirlenmesi planlanmıştır. Ancak Tarımsal Biyoteknoloji Bölümünden qPCR cihazının alınıp Sağlık Bakanlığı'nın envanter kaydına geçmesi ve cihazın henüz bölüme geri dönmemesi nedeniyle qPCR reaksiyonları gerçekleştirilememiştir. Fakat semi-kantitatif yöntemle de mRNA miktarlarındaki değişim güvenilir bir şekilde belirlenebilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik Analiz Bulguları

C. reinhardtii'nin ARS genlerinden sentezlenen olası protein sekanslarının biyoinformatik programlar kullanılarak elde edilen sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Yapılan çalışmalar 19 adet ARS gen modelinin arılsülfataz proteinleri olduğunu öngörmektedir.

Çizelge 4.1. Phytozome veri tabanında bulunan *C. reinhardtii*'nin ARS gen modelleri ve analizleri

Gen İsmi ve Modeli	Transmembran Domaini	Lokalizasyon Tahmini	Domain Analizi	Sülfataz1 Motifi	Sülfataz2 Motifi	Sinyal Peptidi
ARS1 Cre16.g671400.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	PVCCPSR TNLWRG	GYNTYY VGKFL	MGALAVLAVACLA AVASVAHA (1-21)
ARS2 Cre16.g671350.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	PVCCPSR TNLWRG	GYNTYY VGKFL	MGALAVFAVACLA AVASVAHA (1-21)
ARS3 Cre10.g430200.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	STCCPSR TSLLTG	GYNVYSI GKFL	MTFSRLAPLLLLA LCIDHSFVGA (1-24)
ARS4 Cre01.g012100.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	AVCCPAR TSILTG	GYQTILV GKFL	MFITLACSINATLC (1-14)
ARS5 Cre10.g431800.t1.2	1 tane (7-24)	Sekretuar yolak	Sülfataz	SLCCPSR VSLLTG	GYNTYFT GKFI	MQRREARVGALWI LAVVLLLAAGAEA (1-26)
ARS6 Cre02.g085850.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	ASCCPSR TSLLTG	GYDTYY VGKFL	MGKLPGRVALLRA AWFAFSLMGLFSCG A (1-28)
ARS7 Cre01.g011901.t1.1	Yok	Diğer*	Sülfataz	GVCCPSR TSILTG	GYFTGLS GKFL	-
ARS8 Cre02.g086000.t1.1	Yok	Diğer*	Sülfataz	VAGCPSR ASLLTG	GYNTYLV GQFL	-
ARS9 Cre02.g090550.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	PICCCPSRV NLLRG	GYSTLYT GKFI	MTPIAITLVIALQV SVGHS (1-20)
ARS10 Cre04.g226050.t1.1	Yok	Diğer*	Sülfataz	GNCCPSR TVVLTG	GYQTYW VGKAL	-
ARS11 Cre04.g226550.t1.2	Yok	Diğer*	Sülfataz	GNCCPSR TSLLTG	GYRTYQL GKVL	-
ARS12 Cre04.g226600.t1.1	Yok	Kloroplast	Sülfataz	GVCCPAR VSALSG	GYDTYLV GKFL	-
ARS13 Cre05.g239750.t1.2	Yok	Diğer*	Sülfataz	ASCCPSR TSFFTG	GYSTYM VGKFL	MLATVTLFQPGHA (1-13)
ARS14 Cre05.g239800.t2.1	1 tane (13-35)	Sekretuar yolak	Sülfataz	ASCCPAR TAFLTG	GYNTYLV GKLL	MRSSKLGWQMVAR WHLALCATILLAAC GCAQA (1-32)
ARS15 Cre05.g239900.t1.1	1 tane (13-35)	Kloroplast	Sülfataz	ASCCPSR TSLLTG	GYSTYM VGKFL	MCTTNCSTARRRA RSLIALSAVLVSTFC TAVA (1-33)
ARS16 Cre06.g293800.t1.1	1 tane (13-35)	Kloroplast	Sülfataz	SVCCPAR VSLLTG	GYHTVLV GKFL	MWAPGLQKRGSR RWMTSFLLVFVLM VASPACAH (1-35)
ARS17 Cre07.g328500.t1.1	Yok	Diğer*	Sülfataz	PTCCPSR LSLLTS	GYNTYLV GKFL	-
ARS18 Cre10.g432600.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	AACCPSR SILMTG	GYRTMH VGKFL	MALQGMRSNMTRG AIALGLLMIALGAA KG (1-29)
ARS** Cre01.g012126.t1.2	Yok	Kloroplast	Sülfataz	GLCCPAR TSLLTG	GYNTGLV GKFL	-

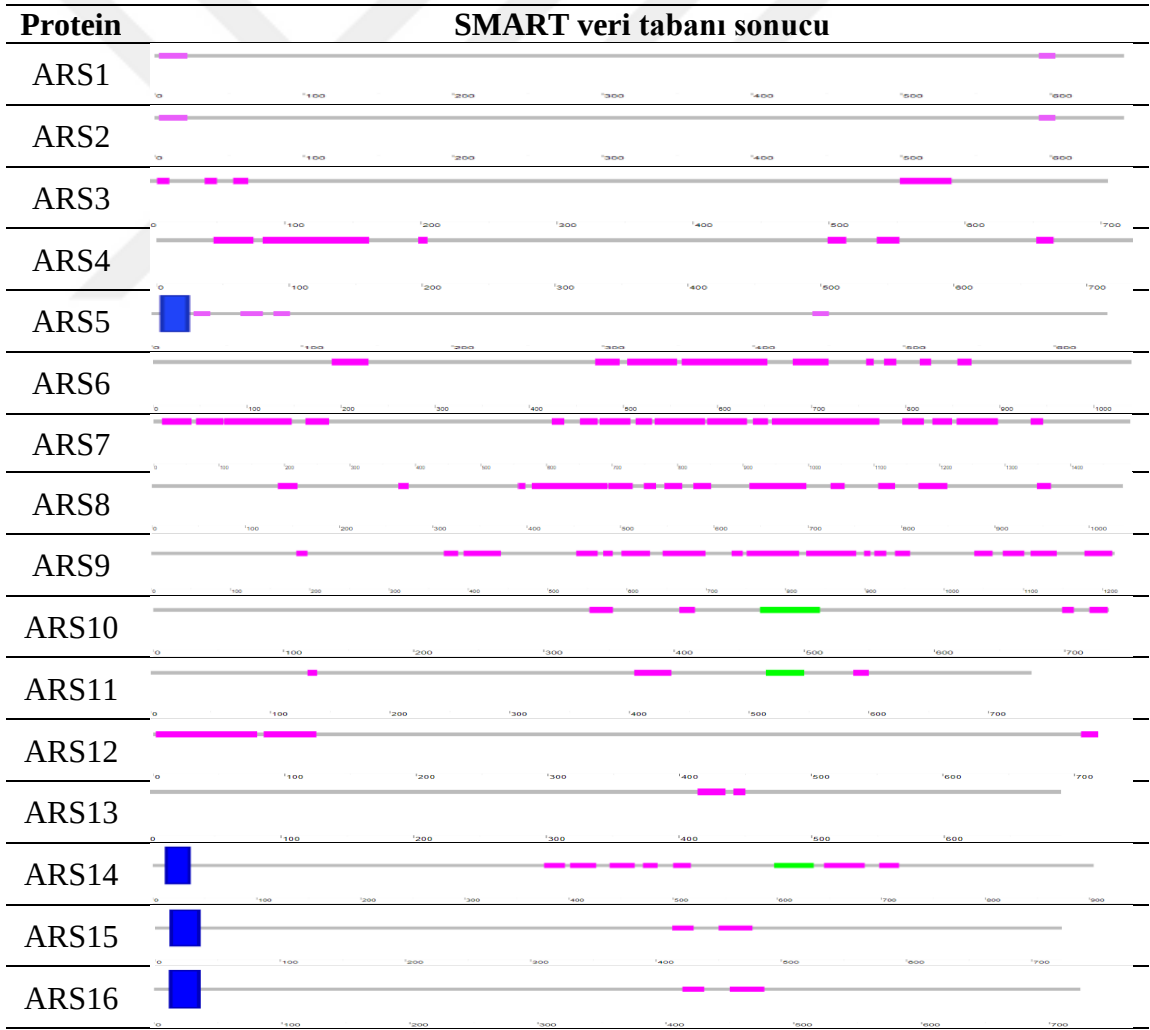
*Diğer: Mitokondri, kloroplast ve sekretuar yolak dışı

** : Phytozome veri tabanında bu gen modeline henüz numara verilmemiştir.

4.1.1. Transmembran domain analizi

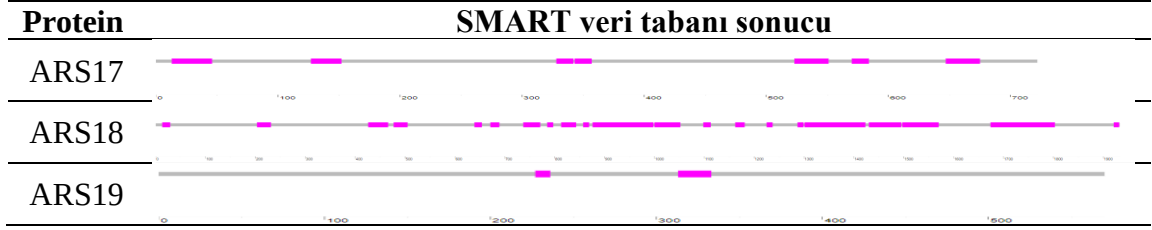
Transmembran domaini içeren proteinlerin, eğer sekretuar yolaktaysa hücre membranına ya da lizozom membranına lokalize olduğu düşünülmektedir. SMART veri tabanı analizleri, *C. reinhardtii*'deki 19 tane ARS proteininin 4'ünde (ARS5, ARS14, ARS15, ARS16) transmembran domaini olduğunu göstermiştir (Çizelge 4.2.). Çizelge 4.2.'de dikey mavi dikdörtgen ile gösterilen bölgeler transmembran domaini taşıyan bölgeleri göstermektedir. Diğer proteinlerinde transmembran domaini olmadığı öngörülmüştür. SMART veri tabanından sonra TMHMM programıyla da transmembran domeni olan proteinler kontrol edilmiştir (Şekil 4.1.). Her iki programda da 4 ARS proteininde (ARS5, ARS14, ARS15, ARS16) transmembran domaini olduğu öngörülmüştür. Transmembran domaini olarak tahmin edilen bölgeler proteinlerin sinyal peptidi bölgesi ile örtüştüğü için bunların gerçek transmembran domaini olduğu kesin olarak söylenememektedir.

Çizelge 4.2. *C. reinhardtii*' de bulunan ARS proteinlerinin SMART veri tabanındaki transmembran analizi sonuçları

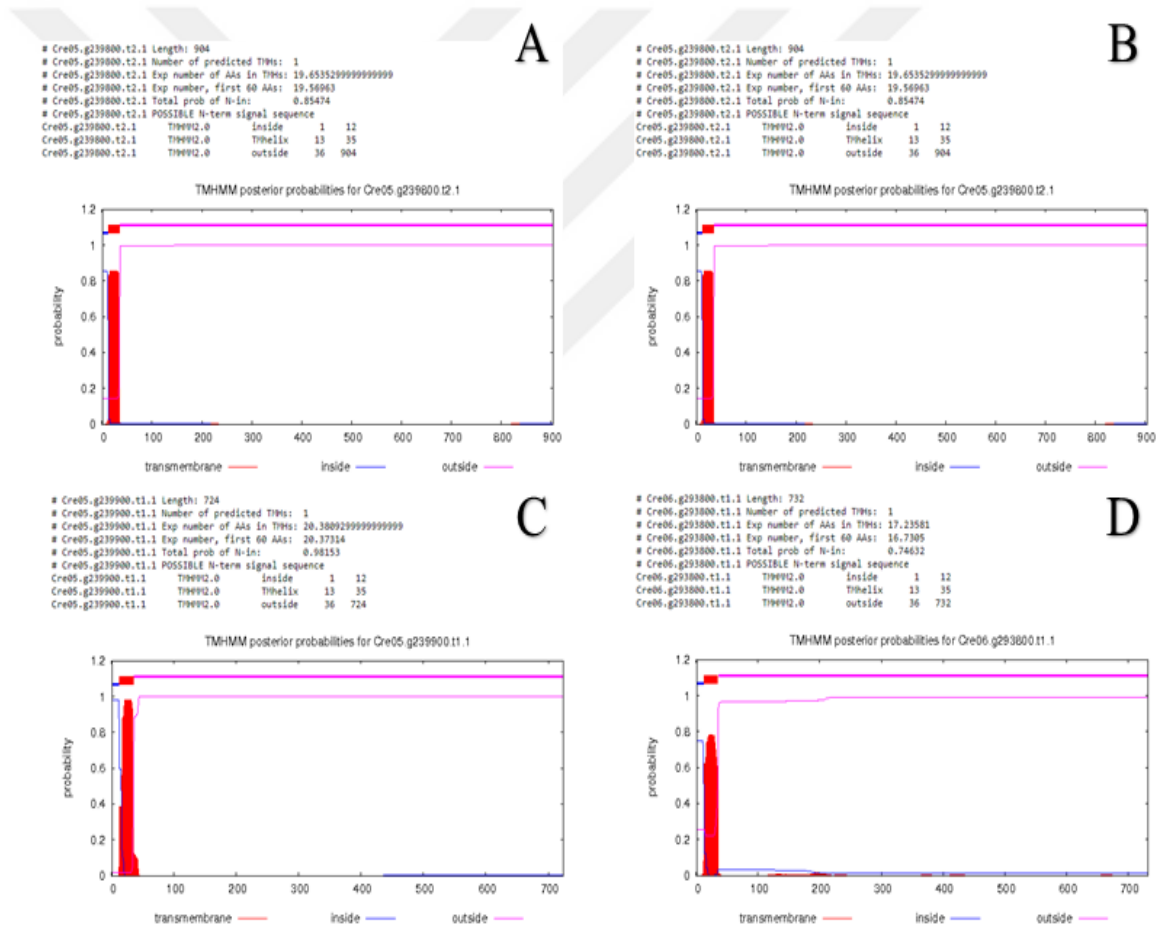


" (Devamı Arkada) "

Çizelge 4.2.'nin devamı



TMHMM programı, zardaki her bir hücre içi veya hücre dışı domainin yerleşimini ve buna bağlı olarak bütün proteinin zardaki yerleşimini de öngörmektedir. Transmembran domainleri için TMHMM programında yapılan bu tür bir tahminin grafiksel çıktısı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Şekil 4.1.'deki kırmızı pikler transmembran domaini içeren bölgeleri göstermektedir.



Şekil 4.1. TMHMM sunucusundan elde edilen grafiksel çıktılar A)ARS5 proteini B)ARS 14 proteini C)ARS15 proteini D)ARS16 proteini

4.1.2. Protein lokalizasyon analizi

Protein lokalizasyonunu tahmin etmek için kullanılan PredAlgo programının analiz sonuçları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. PredAlgo programı, proteinlerin yeşil alglerdeki üç hücre içi bölmeden mitokondri, kloroplast ve salgı yolundan birine lokalizasyonunu öngörmektedir. Çizelge 4.3.'de verilen sonuçlara göre ARS proteinlerinin hücre içinde çeşitli bölgelerde lokalize olduğunu tahmin etmiştir. PredAlgo programı (O) yani 'diğer' sınıfındadır, kloroplast (C) ve salgı yolu (SP) (sırasıyla Cscore, Mscore ve SPscore) olmak üzere üç grupta analiz yapmaktadır. Üç skor belirli bir sınırın altında olduğunda protein "diğer" (O) kategorisine, aksi takdirde en yüksek puana (hedef sütun) sahip bölmeye atanmaktadır. Bu sınırlar kloroplast için 0.41 ve sekretuar yolak için 0.14 olarak verilmektedir. Her bölme için, taşıma peptid (TP) dizisinin uzunluğu da tahmin edilmektedir (kloroplast ve sekretuar yolak için uzunluk sırasıyla mTPlength, cTPlength, and spTPlength olarak verilmiştir).

Çizelge 4.3. *C. reinhardtii*'de bulunan ARS proteinlerinin lokalizasyon analizi PredAlgo programı analiz sonucu

Protein	Lokalizasyon Analizi							
ARS1	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre16.g671400.t1.2	0.0001052	0.0357372	1.7084819	SP	368.40126	80.424699	7.0323878
ARS2	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre16.g671390.t1.2	0.0000601	0.0834085	1.573157	SP	365.83747	16.428162	10.191806
ARS3	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre10.g430200.t1.2	0.0015064	0.0589316	2.3480065	SP	1313.6678	138.50033	15.072795
ARS4	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre01.g012100.t1.1	0.0919424	0.1017903	0.2405780	SP	29.735899	208.01618	2.9040835
ARS5	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre10.g431800.t1.2	0.0059615	0.0705008	2.4234814	SP	49.772346	61.26876	13.528767
ARS6	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre02.g085850.t1.1	0.6954153	0.0176050	1.199274	SP	26.879769	280.9914	9.7829017
ARS7	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre01.g011901.t1.1	0.0053884	0.2024294	0.0003236	O	2739.3834	661.54246	1229.2366
ARS8	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre02.g086000.t1.1	0.1081223	0.0040348	0.0028846	O	65.832085	1	101.1901
ARS9	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre02.g090550.t1.1	0.0002047	0.0022142	0.3457485	SP	99.996392	86.471457	3.1627208
ARS10	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre04.g226050.t1.1	0.0002780	0.0035793	0.0006352	O	99.996393	96.879695	99.996391
ARS11	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre04.g226550.t1.2	0.0085461	0.0010118	0.0006471	O	1	99.996389	99.99639
ARS12	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre04.g226600.t1.1	0.0000291	0.7582419	0	C	99.996393	153.44671	99.996391
ARS13	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre05.g239750.t1.2	0.0062610	0.1345227	0.1061700	O	79.693713	11.223847	1
ARS14	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre05.g239800.t2.1	0.2226108	0.0402594	2.2551453	SP	92.724019	131.02802	20.779274
ARS15	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre05.g239900.t1.1	0.5866092	1.7756036	0.6499691	C	17.636855	9.9537886	20.461767
ARS16	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre06.g293800.t1.1	0.1661325	1.0043034	0.5061364	C	984.60896	61.066509	1
ARS17	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre07.g328500.t1.1	0.0000756	0.0819729	0.0005652	O	2738.0674	139.52181	50.851335
ARS18	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre10.g432600.t1.1	0.4204659	0.0139568	0.1454852	SP	98.421914	350.11384	8.3388092
ARS19	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	Cre01.g012126.t1.2	0.2171005	0.5049240	0.0290859	C	2.1667852	4.4868743	26.43643

4.1.3. Domain analizi

Pfam veri tabanı protein ailelerini profillerine göre sınıflandırmaktadır ve dizi hizalamalarını temel almaktadır. Çizelge 4.4.'de *C. reinhardtii*'de bulunan ARS proteinlerinin Pfam veri tabanındaki analizi sonucunda her bir proteinde 'Sülfataz' domaini olduğu görülmüştür. Bu nedenle 19 ARS proteininin hepsinin arılsülfataz olduğu düşünülmektedir. Çalışmanın güvenilirliği için Pfam analizine kristal yapısı açığa kavuşturulmuş insanda bulunan ARSA enzimi de eklenmiştir. ARSA proteininde de sülfataz domaini ve sülfataz C (E-value: 1.8e-26) domaini olduğunu veri tabanı aracılığıyla tahmin edilmiştir.

E value (expectation value): Beklenti değeridir. Veri tabanı taramasında şans eseri çıkması beklenen, S değerine denk ya da daha büyük skorlara sahip benzer dizilerin sayısını göstermektedir. Düşük E value değeri büyük skora işaret eder.

Çizelge 4.4. *C. reinhardtii*' de bulunan ARS proteinlerinin Pfam veri tabanındaki domain analizi sonucu

Protein	Domain Yapısı	Sülfataz	E-value
ARS1		27-387	2.7e-68
ARS2		27-387	4.4e-69
ARS3		59-422	7.3e-54
ARS4		167-515	4.4e-48
ARS5		78-419	4.8e-50
ARS6		35-429	2.5e-46
ARS7		273-617	3.8e-52
ARS8		6-361	2.8e-38
ARS9		24-380	6.3e-53
ARS10		1-340	6.9e-43
ARS11		1-350	1.6e-42
ARS12		132-480	1.2e-54
ARS13		24-375	2.9e-54
ARS14		39-391	1.7e-51
ARS15		37-385	4.9e-51
ARS16		92-434	2.5e-49
ARS17		49-429	5.5e-55
ARS18		33-399	6.2e-48
ARS19		1-323	6.4e-53
ARSA		23-348	9.7e-81

4.1.4. Motif analizi (Sülfataz 1 ve Sülfataz 2)

C. reinhardtii ARS protein sekanslarının motif analizi Prosite veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. Şekil 4.2.'de örnek olarak ARS1 proteinin Prosite veri tabanındaki kaydı gösterilmiştir. Prosite veri tabanından elde edilen sonuçlarla Clustal Omega programında hizalama yapılmıştır.

CRE16-G671400-T1-2 (649 aa)

PS00523 SULFATASE_1 Sulfatases signature 1 :

71 - 83: [confidence level: (0)] PVCCPSRtnLWRG

PS00149 SULFATASE_2 Sulfatases signature 2 :

122 - 132: [confidence level: (0)] GYnTyyVGK.FL

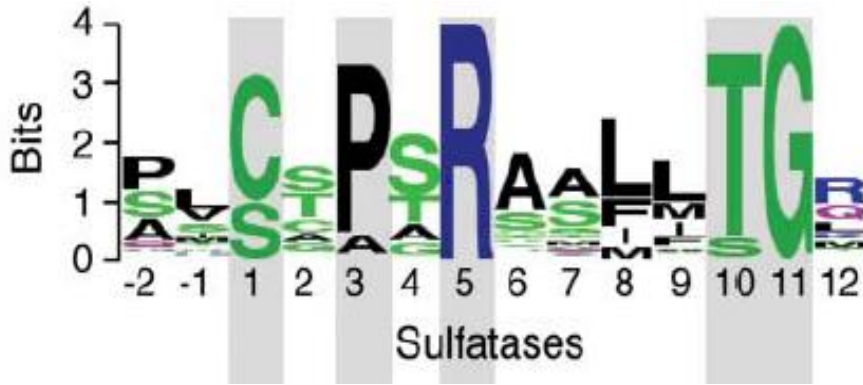
Şekil 4.2. ARS1 proteininin Prosite veri tabanındaki motif analiz sonucu görünümü

C. reinhardtii'de bulunan diğer ARS proteinlerinin Sülfataz 1 ve Sülfataz 2 motifleri Şekil 4.3.'de gösterilmiştir. Motiflerin hizalaması Clustal W programı kullanılarak yapılmıştır.

A			B		
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment			CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment		
CrARS1	PVCCPSRtnLWRG	71	CrARS1	GYNTYYVGKFL	122
CrARS2	PVCCPSRtnLWRG	71	CrARS2	GYNTYYVGKFL	122
CrARS3	STCCPSRTSLLTG	103	CrARS3	GYNVYSIGKFL	157
CrARS4	AVCCPARTSILTG	215	CrARS4	GYQTILVGKFL	266
CrARS5	SLCCPSRVSLLTG	122	CrARS5	GYNTYFTGKFI	173
CrARS6	ASCCPSRTSLLTG	79	CrARS6	GYDTYYVGKFL	130
CrARS7	GVCCPSRTSILTG	317	CrARS7	GYFTGLSGKFL	368
CrARS8	VAGCPSRASLLTG	47	CrARS8	GYNTYLVGQFL	98
CrARS9	PICCPSRVNLLRG	67	CrARS9	GYSTLYTGKFI	118
CrARS10	GNCCPSRTVVLTG	31	CrARS10	GYQTYWVGKAL	82
CrARS11	GNCCPSRTSLLTG	41	CrARS11	GYRTYQLGKVL	92
CrARS12	GVCCPARVSALSG	227	CrARS12	GYDTYLVGKFL	227
CrARS13	ASCCPSRTSFFTG	68	CrARS13	GYSTYMGKFL	119
CrARS14	ASCCPARTAFLTG	83	CrARS14	GYNTYLVGKLL	134
CrARS15	ASCCPSRTSLLTG	81	CrARS15	GYSTYMGKFL	132
CrARS16	SVCCPARVSLLTG	136	CrARS16	GYHTYLVGKFL	187
CrARS17	PTCCPSRLSLLTS	165	CrARS17	GYNTYLVGKFL	165
CrARS18	AACCPSRSILMTG	128	CrARS18	GYRTMHVGKFL	128
CrARS19	GLCCPARTSLLTG	23	CrARS19	GYNTGLVGKFL	74
	*** *		** . * :		

Şekil 4.3. *C. reinhardtii* 'de bulunan ARS proteinlerinin A) Sülfataz1 B) Sülfataz 2 motiflerinin hizalama sonuçları. Yeşil renk ile vurgulanan kısımlar korunmuş bölgeleri göstermektedir

Korunmuş dizi (Conserved sequence): Bir proteindeki aminoasit dizisinde (veya bir DNA molekülünde) evrim sürecinde değişmeden kalmış olan baz dizisini içermektedir. Şekil 4.3., Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.'daki hizalama sonuçları ARS proteinlerinin sülfataz motiflerindeki ortak bulunan korunmuş dizileri göstermektedir.



Şekil 4.4. Sülfataz motifi (Sardiello vd. 2005)

Sardiello vd. (2005), memelilerde yapılan analizlerde CxP[S/A]Rxxxx[T/S]G sekansına sahip değişmez dizi olan sülfataz motifinin, sülfatazlar dışında başka proteinlerde bulunmadığını savunmuştur. Bu tez çalışmasında detaylı olarak *Chlamydomonas reinhardtii*'deki ARS proteinlerinde bu motifin bulunup bulunmadığına bakılmıştır. Diğer organizmalardaki ARS genlerinin protein sekansları bulunmuş (Çizelge 3.7.) ve çoklu hizalama yapılarak (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.) benzerliklerine bakılmıştır. Şekil 4.5.'deki hizalamada görüldüğü üzere *C. reinhardtii*, *Homo sapiens*, *Volvox carteri*, *Rhodospirillum rubrum* ve *Pseudomonas aeruginosa* organizmalarındaki amino asit analizinde Sardiello vd. (2005) çalışmasında belirtilen katalitik bölgenin korunduğu görülmüştür. Sülfataz motifini kapsayan sekansta yüksek derecede amino asit benzerlikleri görülmüştür ve renklendirme ile vurgulanmıştır.

Amino asit analizi: *C. reinhardtii*'nin ARS protein sekansları ile bazı diğer organizmalarda (Çizelge 3.7.) bulunan sülfataz motiflerinin hizalaması Şekil 4.5.'de ve Şekil 4.6.'da yapılmıştır. Sonuçlara göre analiz edilen organizmalarda, Şekil 4.4.'deki sülfataz motifindeki benzerlikler görülmüştür. Sardiello vd. (2005) çalışmasında belirttikleri sülfataz motifinin incelenen diğer organizmalarda da bulunduğu analizler sonucu görülmüştür. Şekil 4.5.'deki ve Şekil 4.6.'daki hizalamalar Clustal Omega programı kullanılarak yapılmıştır.

GNS	VLGG---MT--PLKKTALIG----	EMGMTFSSAYVPSAL	CCPSRASILT	KYPHNHHV	110
Sulf1	ELGS---LQ--VMNKTRKIME----	HGGATFINAFVITPM	CCPSRSSMLT	GKYVHNHNV	106
Sulf2	ELGS---MQ--VMNKTRRIME----	QGGAHFINAFVITPM	CCPSRSSILT	GKYVHNHNTY	107
Vocar.0025s0060.1	IQNS---THPRYQPKLHEHIR----	YPGIELKNYFVITPV	CCPSRTNLWR	QFSHNTNFT	91
ARS1	IQNS---THPHYMPSLHKYIR----	YPGVLSQYFVITPV	CCPSRTNLWR	QFAHNTNFT	92
ARS2	IQNS---THPHYMPSLHKYIR----	YPGVLSQYFVITPV	CCPSRTNLWR	QFAHNTNFT	92
ARS9	TQRS---VDIAMPATKRLK----	EGGVTFNHFVSTPI	CCPSRVNLLR	QYSHNTNFT	88
Vocar.0001s1077.1	TQDS---SGELAMPATKRLR----	DRGVTFNHFVSTPI	CCPSRVNLLR	QYSHNTNFT	99
Vocar.0004s0409.1	LLNS---THPRYMPQLHRLIR----	LRGLEVQHFIITSVAS	CCPSRTSFLT	GRYCHNTNIT	116
ARS6	MLNS---THPRYMPQLHRLIR----	RRGLEVQHFIITSVAS	CCPSRTSFLT	GRYCHNTNIT	100
ARS14	MLNS---THPYMPQLHRLIR----	RRGLEVQHFIITPVAS	CCPSRTAFLT	GRYCHNTNIT	104
ARS10	-MNS---THPYMPMLHKHLR----	LQGTLPHFITSVGN	CCPSRTVVL	GRYCHNTNIT	52
ARS11	MLNA---SHPYLPMLHKHMR----	LQGTLPHFITSVGN	CCPSRTSFLT	GRYCHNTNIT	62
ARS8	LLGS---ADAKYMPDLKYLK----	KQGLELPQFI---	VAGCCPSRASLT	GRYCHNTNIT	68
ARS13	VLGS---TDAKWPMSLDKYLK----	KQGMVFNPFVTSIAS	CCPSRTSFLT	GRYCHNTNIT	89
ARS15	VLGG---ADALWMPALDKYVR----	RQGMELPHFVTSIAS	CCPSRTSFLT	GRYCHNTNIT	102
ARS18	MLNS---TNREFMPQLNRHLA----	DSGLQLRNFLISTA	CCPSRSILMT	GRYTHNNVT	98
Vocar.0019s0115.1	MENS---THPYMPMLNQHIV----	EQGLQLRNFLISTA	CCPSRSILMT	GRYTHNNVT	91
ARS3	LLNS---TDRTYLPLLHSLG----	DQGLRLRNMAISSST	CCPSRTSFLT	GRYTHNNVT	124
ARS17	LLNS---SHPAHMPLHQAHA----	GPGLALRNYSVSTPT	CCPSRLSFLT	GRYTHNNVT	114
ARS5	LLNS---TDRKYPMLHKYIG----	DQGLHLNFIIVTSSL	CCPSRVSLT	GRYTHNNVT	143
Vocar.0019s0117.1	LLNA---THPAYMPALHKYIG----	DQGLHLNFIIVTSSL	CCPSRVSLT	GRYTHNNVT	168
ARS16	VLGS---ADPAYMPALHRLIG----	ASGSRFANTLVSTSV	CCPARVSLT	GRYTHNNVT	157
Vocar.0001s1375.1	VLNS---THPAYMPALSSLLG----	SEGTRFANTLVSTSV	CCPARVSLT	GRYTHNNVT	154
ARS12	ILNS---THPYMPALNRHLA----	AGGTRLSNFIIVTSGV	CCPARVSLT	GRYTHNNVT	197
ARS4	MYGS---AAPRFMPAVNKWLG	GGGGTQLSNFLITAV	CCPARTSILT	GRYTHNNVT	236
ARS7	VYNS---SSARFMPVNLRLIG----	DVGTRLSNFIIVTSGV	CCPSRTSILT	GRYTHNNVT	338
ARS19	-----MPALNRLLG----	AGGTRMSNFVPTGL	CCPARTSILT	GRYTHNNVT	44
ARSK	RLTFHPSQVVKLPFNFMTK----	RGTSFLNAYTNSPI	CCPSRAAMWS	GLTHLTSW	99
IDS	PSLGCGYDKLVRSNPDQLAS----	HSLLFQNAFAQQAV	CCPSRVSLT	GRYTHNNVT	103
ARSB	NDVGFGHS-RIRTPHLDALAA----	GGVLLDNYIT-QPL	CCPSRSQFLT	GRYTHNNVT	110
ARSI	HDVGFGHS-DIETPTLDRLAA----	KGVKLENYII-QPI	CCPSRSQFLT	GRYTHNNVT	112
ARSJ	RDVGFGHS-EIKTPTLDKLAA----	EGVKLENYII-QPI	CCPSRSQFLT	GRYTHNNVT	141
ARSG	GDLGANWAETKDTANLDMAS----	EGMRFDVFAAAST	CCPSRASLT	GRYTHNNVT	103
ARSA	GDLGCGHPSSTTPNLDQLAA----	GGLRFTDFYVPVSL	CCPSRAALLT	GRYTHNNVT	90
GALNS	GDLGVYGEPSRETPNLDRMAA----	EGLLPNFYSANPL	CCPSRAALLT	GRYTHNNVT	98
STS	GDPGCGYGNKTIRTPNLDRLAS----	GGVKLTQHLLAASPL	CCPSRAAFMT	GRYTHNNVT	101
ARSF	GDLGCGYGNMTMRTPHIDRLAR----	EGVRLTQHLLAASPL	CCPSRAAFMT	GRYTHNNVT	97
ARSE	GDIGCYGNNTMRTPNIDRLAE----	DGVKLTQHLLAASPL	CCPSRAAFMT	GRYTHNNVT	105
ARSH	GDLCCYGNNSVSTPNIDRLAS----	EGVRLTQHLLAASPL	CCPSRAAFMT	GRYTHNNVT	74
ARSD	GDLGCGYGNNTLRTPNIDRLAE----	EGVRLTQHLLAASPL	CCPSRAAFMT	GRYTHNNVT	108
SGSH	ESGAYNNS-AIATPHLDALAR----	RSLLFRNFTSVSS	CCPSRASLT	GRYTHNNVT	89
Rbaltica	SDLGCGYGG-EISTPNIDALAA----	DGVKLTQV-YNSAR	CCPSRASLT	GRYTHNNVT	118
Paeruginosa	SDIGAFGG-EIATPNIDALAI----	AGLRLTDF-HTAST	CCPSRASLT	GRYTHNNVT	70

Şekil 4.5. Bazı organizmalarda bulunan Sülfataz 1 motifinin hizalaması. Renklendirme yapılan dizilerin tamamı Sülfataz 1 motifini göstermektedir. Yeşil ile renklendirilen amino asitler tüm genlerdeki korunmuş dizileri göstermektedir. Mavi, pembe ve kırmızı ile renklendirilen kısımlar Sülfataz 1 motifindeki değişken amino asit dizilerini göstermektedir. Sarı ile renklendirilen kısımlar ise herhangi bir amino asit bulunabileceğini göstermektedir

Şekil 4.6.'da bu çalışmada incelenen bazı diğer organizmalarda bulunan Sülfataz 2 motifinin hizalaması yapılmıştır. Bu motifler Şekil 4.2.'de gösterildiği gibi Prosite veri tabanındaki motif analiz sonucu bulunmuştur. Bulunan motifler Clustal Omega programı ile hizalanmıştır. Hizalama sonucu bazı organizmalardaki Sülfataz 2 motifinin korunmuş bölgeler içerdiği görülmüştür. Hizalamada olan proteinlerin isimleri ve bilgileri Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

GNS	KSWQKIQEP-----NTFPAILRSMC	GYQTFFAGKYLNEYGAPDAG	160	
Sulf1	WQAMHEPRT-----FAVYLNNT	GYRTAFFGKYLNEYNGSYIP	153	
Sulf2	WQAQHSRT-----FAVYLNST	GYRTAFFGKYLNEYNGSYVP	154	
Vocar.0025s0060.1	KWKSGLGIDK-----SYLPVWLQNL	GYNTYYVGKFLVDYSVSNYQ	140	
ARS1	KWKGLGIDQ-----SYLPWLKQDQ	GYNTYYVGKFLVDYSVSNYQ	141	
ARS2	KWKGLGIDQ-----SYLPWLKQDQ	GYNTYYVGKFLVDYSVSNYQ	141	
ARS9	KFKALGLDR-----DWLPGWLQAA	GYSTLYTGKFIVDYTIIRNHR	137	
Vocar.0001s1077.1	KFRALGLDR-----EWLPTWLQRA	GYNTLYTGKFLVDYTIIRNYD	148	
Vocar.0004s0409.1	KFMTEGLDE-----QYLPVWLQAA	GYDTYYVGKFLNGLTHDSLL	165	
ARS6	KFKLDQLDD-----QYLPVWLQAA	GYDTYYVGKFLNGFTTDSAA	149	
ARS14	KFMRDQLDT-----NYLPVWLQAA	GYNTYLVGKLLNGFTQDAAA	153	
ARS10	GFKTKKLDK-----SYLPWLQAA	GYQTYVVGKALNGFSTFMAD	101	
ARS11	GFKTKKLDK-----SYLPWLQDA	GYRTYQLGKVLNGFKGSVTT	111	
ARS8	QFLERGLDS-----DYLPLVWLQAA	GYNTYLVGQFLNGFNRSVLQ	117	
ARS13	KMMGQDLDH-----DYLPLWLQDA	GYSTMVGKFLNGFTYKAVK	138	
ARS15	KFLENQLDD-----DYLPLVWLQDA	GYSTMVGKFLNSFKEPLAR	151	
ARS18	KFMSQDLDA-----DYLPLVWLQRA	GYRTMHVGKFLNAMDPTDSR	147	
Vocar.0019s0115.1	KFMSQRLDD-----DYLPLVWLQKA	GYRTMHVGKFLNAMDPTDPR	140	
ARS3	KFLTTRPD-----DQSDTWMPSQL	KAGYNVYSIGKFLNGFAVGP	175	
ARS17	RFGQMMAGAAQQQSGQGPQGP	QGLDSSWLPTQLQSA	GYNTYLVGKFLNEFTPAGA-	183
ARS5	KFQSLNLD-----KNWLPLKLP	GYNTYFTGKFINLFDVPPGD	192	
Vocar.0019s0117.1	RFQAQKLD-----AEWLPLWLKLP	GYNTYFTGKFINLFDVPPGD	217	
ARS16	KFARSGLDG-----DWLPGWLQAA	GYHTVLVGKFLNSFGVPLPA	206	
Vocar.0001s1375.1	KFIRQGLDS-----DWLPGWLQDA	GYRTALVGKLLNGFSIPLNQ	203	
ARS12	KFYERKVED-----NWLPGWLQAA	GYDTYLVGKFLNAYMTTAAF	246	
ARS4	KFLELDVEK-----TWLPTRLQEA	GYQTYLVGKFLNGYITSEAP	285	
ARS7	KFYDENLED-----NWLPGWLQSA	GYFTGLSGKFLNQYFETSAR	387	
ARS19	RFYQQQLDR-----NWLPLVWLRAA	GYNTGLVGKFLNQYLETYAP	93	
ARSK	TTWMDVMER-----HGVRTQKFG	KLDYTSGHHSIS	139	
IDS	GNFS-----TIPQYFKENG	GYVTMSVGKVFHGPISNHT	146	
ARSB	WPCQPSQVP-----LDEKLLPQLL	KEAGYTHMVVGKWHLGMYR---	152	
ARSI	RPQQPNCLP-----LDQVILPQKL	QEA	GYSTHMVVGKWHLGFYR---	154
ARSJ	RPTQPNCLP-----LDNATLPQKL	KEVGYSTHMVVGKWHLGFYR---	183	
ARSG	LPLNETTLA-----EVLQQA	GYVTGIIGKWHLGHHSYHP	148	
ARSA	GLPLEEVTV-----AEVLAAR	GYLTGMAGKWHLGVGPEGAF	136	
GALNS	TPQEIVGGIP-----DSEQLPELLK	AGYVSKIVGKWHLGHRQFHP	151	
STS	FTASSGGLP-----TDEITFAKLL	KDQGYSTALIGKWHLGMSCHSKT	152	
ARSF	NLAVPAGLP-----LNETTLA	ALLKKQGYSTGLIGKWHQGLNCDSRS	148	
ARSE	WTGASGGLP-----TNETTFAKIL	KEKGYATGLIGKWHLGLNCESAS	156	
ARSH	WLGGSGGLP-----TNETTFAKLL	QHRGYRTGLIGKWHLGLSCASRN	126	
ARSD	WNAGSGGLP-----ENETTFA	RILQQHGYATGLIGKWHQGVNCASRG	159	
SGSH	SFDKVRSLP-----LLSQAG	SVRTGIIGKWHVGPETVYPF	134	
Rbaltica	RGQGYLGLRL-----DDCVTMA	EVLPKEGYGCYVVGKWHMHPKTGP--	169	
Paeruginosa	EGKPGYEGHLN-----ERVVALPELL	REAGYOTLMAGKWHLGLKPEQTP	124	

** *;

Şekil 4.6. Bazı organizmalarda bulunan Sülfataz 2 motifinin hizalaması. Renklendirme yapılan dizilerin tamamı Sülfataz 2 motifini göstermektedir. Yeşil ile renklendirilen amino asitler tüm genlerdeki korunmuş dizileri göstermektedir. Sarı ile renklendirilen kısımlar ise herhangi bir amino asit bulunabileceğini göstermektedir

4.1.5. Sinyal peptid analizi

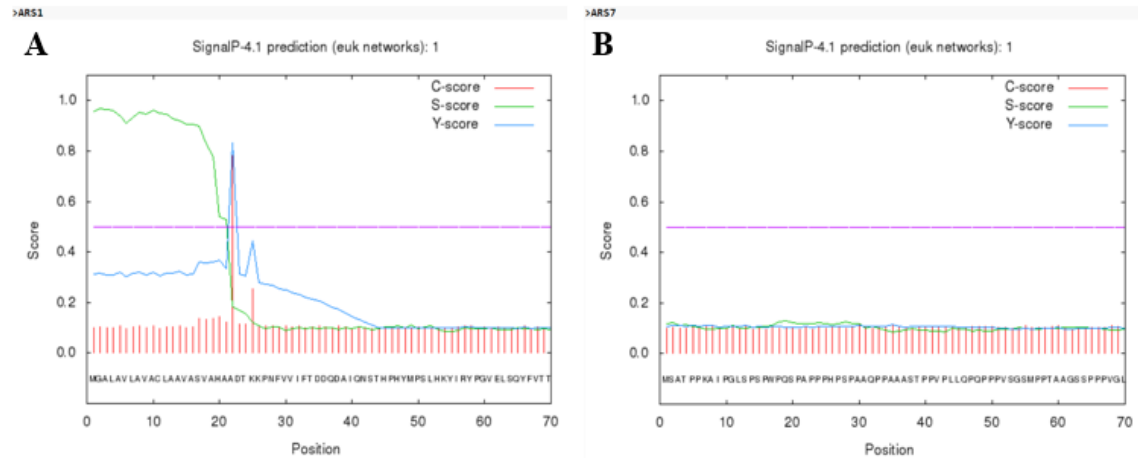
ARS proteinlerinde sinyal peptidinin varlığını saptayabilmek için SignalP ve Phobius programları kullanılarak analizler yapılmıştır. Her ARS proteini sinyal peptidi bulundurmamaktadır; sinyal peptidi sekretuar yolağa giren proteinlerde bulunmaktadır. Sinyal peptidi bulunan ARS proteinlerinin hizalama işlemi Clustal Omega programı kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 4.6.). Fakat bir sinyal peptidi çoğunlukla üç kısımdan oluşmaktadır. İlk kısım (n-bölgesi) genellikle pozitif yüklü olan 1-5 amino asitten, ikinci kısım (h-bölgesi) 5-15 hidrofobik amino asitten ve üçüncü kısım (c-bölgesi) ise 3-7 adet genellikle yüksüz fakat polar amino asitten meydana gelmektedir (Selzer vd. 2018). Bu nedenle, klasik bir dizi hizalama yöntemi sinyal peptidlerinin tahmini için uygun değildir.

Çizelge 4.6. *C. reinhardtii* 'nin ARS proteinlerinin sinyal peptidlerinin hizalaması

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

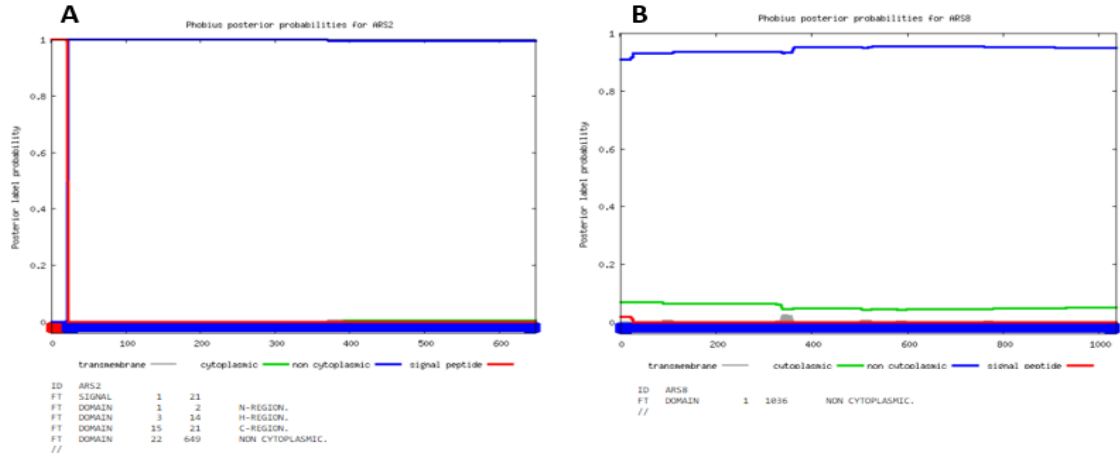
ARS6	-----MGKLPGRVALLRAAWFAF-----SLMGLFSCGA-----	28
ARS15	---MC---TTNCS-LTARRRAR-----SLIALSAVLVSTFCTAVA	33
ARS3	-----MT-FSRLAPLL-----LLLAL--CIDHSFVGA--	24
ARS9	-----MTPIAITL-----VLIALQVSVGHS-----	20
ARS18	---MALQGMRSNMT-RGAIALGL-----LMIALGAAG-----	29
ARS16	MWAPGLQKRGSR-----SRWMTSFLLVFVLMVASPACAH-----	35
ARS4	-----MFITL-----ACSINATLC----	14
ARS14	---MRSSKLGWQ---MVARWHLALC--ATILLAACGCAQA-----	32
ARS13	-----MLA-----TVTLFQPGHA-----	13
ARS5	-----MQRREAR---VGALWILA---VVL LLAAGAEA-----	26
ARS1	-----MGALAVLA---VACLAASVAHA-----	21
ARS2	-----MGALAVFA---VACLAASVAHA-----	21

Sinyal peptidi analizi için iki farklı program kullanılmıştır ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.'de ve Şekil 4.8.'de gösterilmektedir. Şekil 4.7.'de örnek iki farklı protein (ARS1 ve ARS7) için SignalP sunucusundan alınan sonuçlar gösterilmektedir. Diğer tüm protein sekansları için de aynı analizler yapılmıştır.



Şekil 4.7. SignalP sunucusundan elde edilen örnek grafiksel çıktılar **A)** ARS1 proteininin sinyal peptidi olduğu öngörülmektedir. S-score'un yeşil pik yaptığı bölge sinyal peptidi bölgesi olarak tahmin edilmektedir **B)** ARS7 proteinin sinyal peptidi taşımadığı öngörülmektedir

Şekil 4.8.'de Phobius programından alınan sinyal peptidi analiz sonuçları görülmektedir. Örnek olarak iki farklı proteinin (ARS2 ve ARS8) analiz sonuçları gösterilmektedir. Diğer tüm protein sekansları için de aynı analizler yapılmıştır.

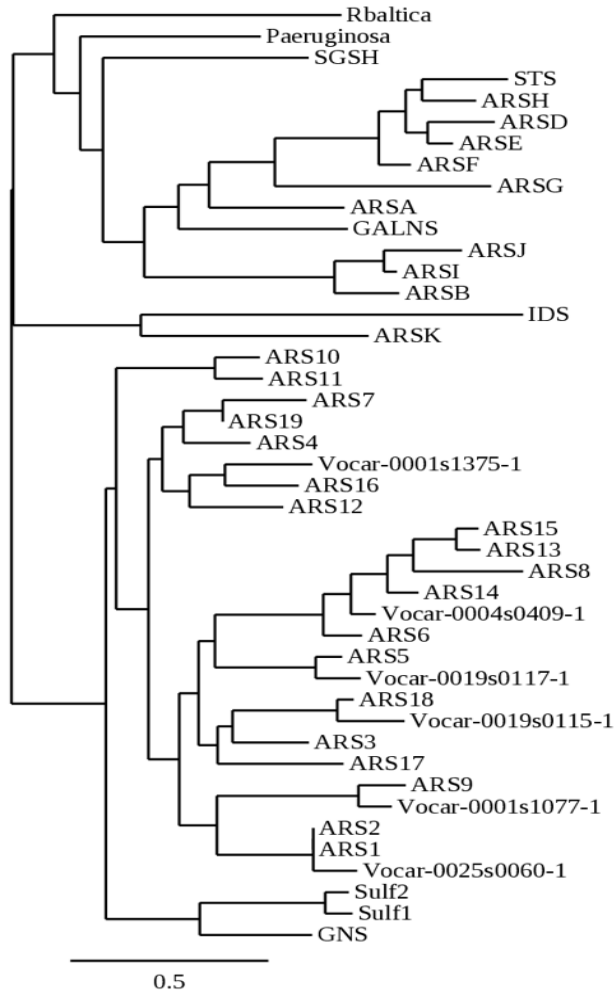


Şekil 4.8. Phobius sunucusundan elde edilen örnek grafiksel çıktılar **A)** ARS2 proteinin sinyal peptidi olduğu öngörülmektedir. Kırmızı pik noktası sinyal peptidi taşıyan bölgeyi öngörmektedir **B)** ARS8 proteinin sinyal peptidi taşımadığı öngörülmektedir

4.1.6. Filogenetik analizler

C. reinhardtii ve karşılaştırmalı analizler için kullanılan bazı diğer organizmalardaki (Çizelge 3.7.) ARS proteinlerinin arasındaki evrimsel ilişkileri gösteren bir filogenetik ağaç TreeDyn programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 4.9.). Evrimsel uzaklıklar yatay dalların uzunluğuna karşılık gelmektedir. Nihai çoklu dizi hizalaması, birbirine en çok benzeyen iki dizi ile başlar. Daha sonra adım adım bir sonraki en benzer dizi eklenir ve kesin çoklu-hizalama elde edilene kadar hizalanır. Filogenetik analizde zamana bağlı değişken sayısı dal uzunluğu olarak temsil edilebilir. Yani dal uzunluğu ne kadar yüksekse zamana bağlı değişkenler o kadar fazladır. Zamana bağlı değişkenler az ise dal uzunluğu kısa olur hatta dal uzunluğu yok denebilir (Şekil 4.9.'da *ARS1* ve *ARS2*'de görüldüğü gibi).

Şekil 4.9.'daki diziler arasındaki evrimsel ilişki, dalların uzunluğu ile orantılıdır. Yeşil alg *C. reinhardtii*'nin ARS proteini; *Volvox carteri*, *Homo sapiens*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Rhodospirellula baltica* ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma yapılan organizmaların isimleri Çizelge 3.7.'de verilmiştir. Bariz olarak ayrılan iki küme görülmektedir. Üst grupta *C. reinhardtii*'ye ait hiçbir dizi bulunmayıp *C. reinhardtii*'ye ait tüm diziler alt grupta kümelenmiştir.



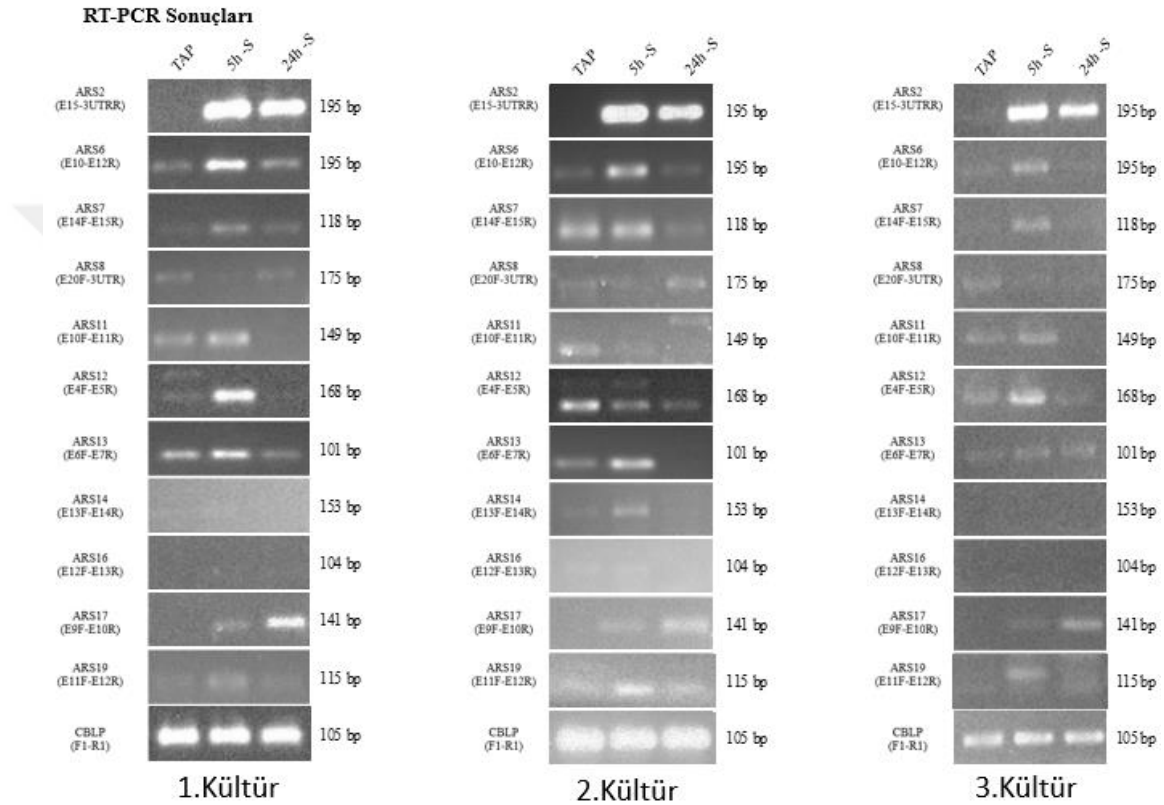
Şekil 4.9. *C. reinhardtii* ve bazı diğer organizmalardaki ARS protein dizilerinin filogenetik ağacı

4.2. RT-PCR Bulguları

Çalışmada model organizma *C. reinhardtii* genomunda 19 adet ARS geni belirlenmiştir. Bu genlerden ARS1 ve ARS2 genleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Aksoy vd. 2013), fakat diğer 17 adet gen modelleri üzerine yapılmış fonksiyonel çalışma literatürde mevcut değildir. Çalışmanın amacı diğer gen modellerinden mRNA üretilip üretilmediğini saptamak ve transkript düzeylerinin sülfat eksikliği altında değişip değişmediğini RT-PCR çalışmasıyla moleküler düzeyde belirlemek olmuştur.

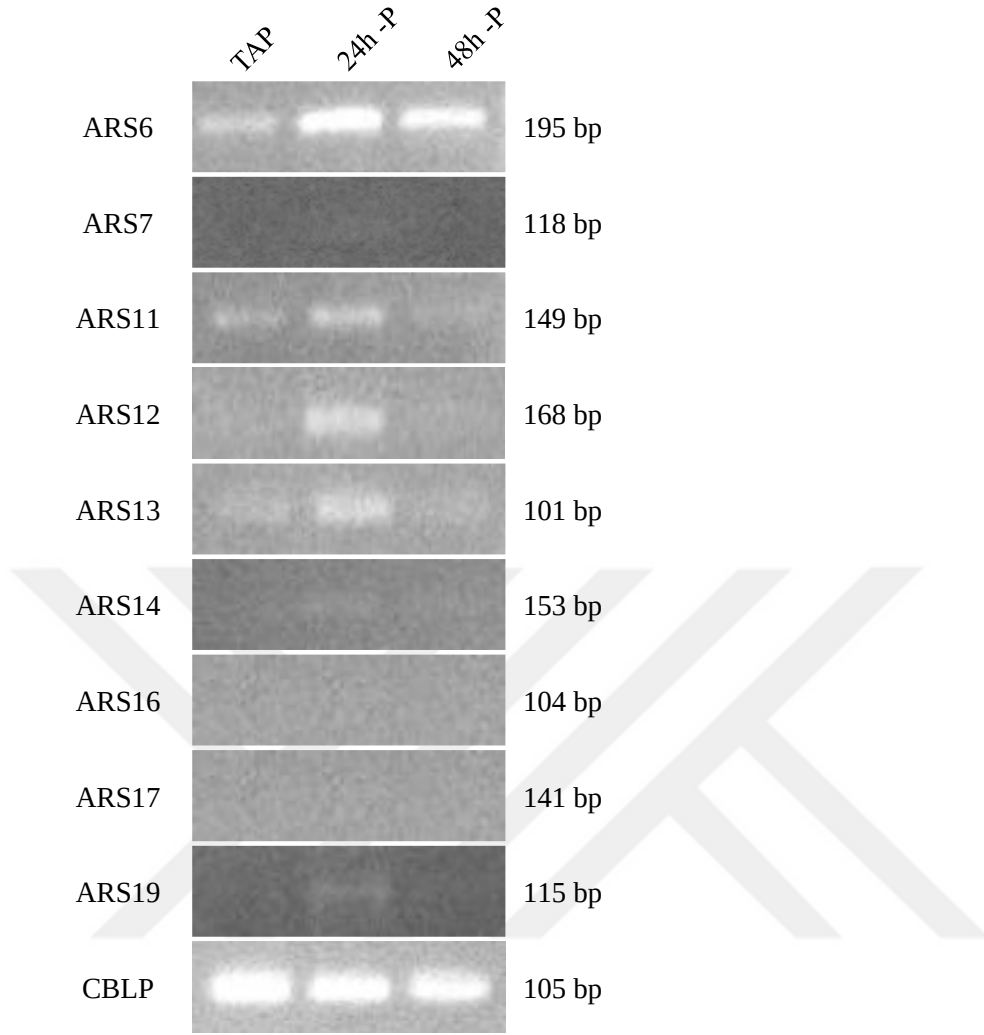
Çalışma için beş farklı hücre kültürü hazırlanmıştır fakat üç hücre kültürünün sonuçları üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Diğer iki hücre kültürü sonuçlara eklenmemiştir. Üç farklı hücre kültüründen izole edilen RNA'lerden cDNA elde edilmiştir. Bu cDNA'larla PCR reaksiyonları kurulmuş ve jel görüntülemesi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.

CBLP; kontrol genidir (house keeping gene), yani her koşulda ekspresyon düzeyinin eşit olması gerekmektedir. Eşit olmadığı durumlarda cDNA'da degradasyon olduğundan şüphe edilebilir. *ARS2* geni pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. *ARS2*'nin TAP besi yerinde ekspresyonu olmayıp, sülfatsız koşullarda gen ekspresyonunun olması beklenmektedir. Farklı bir sonuç çıktığında hücrenin sülfat açlığı çekmemiş olduğu düşünülebilir. Bu iki pozitif kontrol geninden beklenen sonuçlar elde edilmiştir, diğer gen modelleri için ise ilk defa RT-PCR çalışması yapılmıştır. Elde edilen RT-PCR sonuçları literatür çalışmaları ile karşılaştırılarak gen ekspresyon seviyeleri hakkındaki bilgiler 4.3. bölümünde verilmiştir.



Şekil 4.10. 1.kültür, 2.kültür ve 3.kültürle yapılan RT-PCR sonuçları (TAP; TAP besi yerinden alınan hücre kültürünün örneği, 5h -S; sülfat içermeyen besi yeri hücrelere eklendiği zamandan 5 saat sonra alınan örnek, 24 -S; sülfat içermeyen besi yeri hücrelere eklendiği zamandan 24 saat sonra alınan örneklerdir)

Şekil 4.11.'de fosfat eksikliğine duyarlı genlerin RT-PCR sonucu verilmiştir. Fosfat açlığı laboratuvarında çalışılan bir başka proje olup o çalışmadan alınan cDNA'lar ile deney yapılmıştır (Havutcu 2021). Şekil 4.11.'de *C. reinhardtii*'nin fosfat açlığı altında gen ekspresyon seviyesine bakılmıştır. Bu çalışmada *ARS* genleri için tasarlanan primerler kullanılmıştır. Bu deneyde genlerden mRNA üretilip üretilmediğini saptamak ve transkript düzeylerinin fosfat açlığında değişip değişmediğini belirlemek olmuştur.



Şekil 4.11. Fosfat açlığı çeken hücrelerin RT-PCR sonucu

4.3. RT-PCR ve Biyoinformatik Analiz Bulgularının Yorumları

Elde edilen RT-PCR sonuçları, literatürde görülen çalışmalarla ve bu tez çalışmasında yapılan biyoinformatik analizlerin ışığı altında aşağıdaki gibi yorumlanarak bu genlerin sülfat açlığında rolü olup olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır.

C. reinhardtii'deki 19 adet ARS geninden 15 tanesinin ekspresyon düzeyi RT-PCR ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular literatürde bulunan iki adet RNA-sekans çalışmasında görülen veriler ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalardan birisi González-Ballester vd. (2010) çalışmasıdır. Bu çalışmada *C. reinhardtii*'nin farklı ortamlardaki transkriptom analizi yapılmıştır. Bu ortamlardan birisi de 6 saat sülfat açlığıdır ve bu tez çalışması ile en çok ilgisi olan ortam budur. Diğer çalışma ise Strenkert vd. (2019) tarafından yapılan RNA-sekans çalışmasıdır; bu çalışmada Strenkert vd. 12 saat ışık/12 saat karanlık ve ototrofik büyüme koşulları altında transkriptom analizi yapmıştır. Elde ettiğimiz RT-PCR verileri bu çalışmalardaki veriler ile uyushmaktadır ve aşağıda her bir gen için ayrı ayrı açıklanmıştır.

- **ARS1 ve ARS2 genleri**

Literatürde *ARS1* ve *ARS2* genleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Aksoy vd. 2013), bu tez çalışmasında bu genlerin biyoinformatik analizlerine detaylı olarak bakılmıştır (Çizelge 4.1.). Biyoinformatik analizler sonucunda edinilen bilgilere göre; *ARS1* ve *ARS2* proteinlerinin sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiği görülmüştür. Aynı zamanda *ARS1* ve *ARS2* proteinlerinin, sinyal peptidinin varlığı, protein lokalizasyon bölgesinin sekretuar yolak olduğu ve transmembran domaini içermedikleri bilinmektedir. Lokalizasyon bölgesinin sekretuar yolak olması; proteinin lizozomda, hücre membranında ya da hücre dışına atılıyor olabileceğini göstermektedir. *ARS1* ve *ARS2* genlerinin gen duplikasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir. EMBOSS Needle programında *ARS1* ve *ARS2* genlerinin ikili dizi hizalaması sonucu Identity (amino asitlerin birebir benzerliği): %98.5, Similarity (benzerliği): %99.4 çıkmıştır. Çıkan sonuçlardan da anlaşılabileceği gibi *ARS1* ve *ARS2*'nin gen ve protein özellikleri neredeyse aynıdır. *ARS1* ve *ARS2* genleri literatürde çalışılan genler olduğu için bu çalışmada *ARS1* geni için RT-PCR çalışması yapılmamıştır. Literatür çalışmalardan edinilen bilgiler, *ARS1* geninin, sülfat yoksunluğunda transkript seviyesinde artış olduğunu göstermiştir. *ARS1* geni için deneysel çalışma yapmış olsaydık, *ARS2* geni gibi, TAP besi yerinde gen ekspresyonunun olmamasını, sülfat yoksunluğunda ise (5. ve 24. saat) transkript seviyesinde artış olmasını beklerdik. *ARS1* geninin González-Ballester vd.'nin (2010) verilerinde; yabancı suşunun sülfat içeren ortamda çok az ekspres olduğunu, sülfat açlığında ise ekspresyon seviyesinin çok fazla arttığını göstermektedir. *snrk 2.1* mutanı ise sülfatsız ortamda ekspres olmamaktadır. Tüm bu sonuçlar; *ARS1*'nin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğunu desteklemektedir.

Bu projeden elde edilen RT-PCR bulguları, *ARS2* geninin sülfat içeren ortamda ekspresyonunun olmadığını ya da çok az ekspresyonu olduğunu, sülfat açlığında (5 saat ve 24 saat) ise gen ekspresyonunun belirgin bir şekilde arttığını deneysel olarak göstermiştir. TAP besi yerinden alınan örnekteki jel görüntüsü ile besi yerinden sülfat çıkarılmasından 5 saat sonra alınan örnekteki bant kalınlığı genlerin transkript seviyelerindeki farkı göstermektedir. Sülfat açlığının 5. saatinde alınan örnekte ekspresyon artışı Şekil 4.10.'da net bir şekilde gösterilmiştir. Sülfatsız ortamdaki 24. saatte alınan örnekte ise transkript seviyesinin 5. saate oranla biraz azaldığını ama TAP besi yerine oranla ekspresyon düzeyinin hala yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.10.). Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında, günlük ışık periyodlarında *ARS2* geninin, belirli zamanlarda ekspresyon düzeyinin belirgin bir şekilde arttığı gösterilmiştir. González-Ballester vd.'nin (2010) verileri; *C. reinhardtii* yabancı suşunun sülfatlı ve sülfatsız ortamdaki ekspresyon düzeylerini ve *snrk 2.1* mutanın sülfat içeren ve sülfat içermeyen ortamdaki transkript seviyelerini göstermiştir. González-Ballester vd. çalışmasında *ARS1* ve *ARS2*'nin yabancı suşta sülfat içeren ortamda çok az ekspres olduğunu, sülfat yoksunluğunda ise ekspresyon seviyesinin çok fazla arttığını göstermektedir, *snrk 2.1* mutanı da sülfatsız ortamda ekspres olmamaktadır. Bu sonuçlar, bu tezde elde ettiğimiz RT-PCR sonuçlarını desteklemektedir. Sonuç olarak; *ARS2* geninin sülfat eksikliği altında ekspresyonunun arttığını göstermektedir, dolayısıyla *ARS2* geninin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğunu göstermektedir.

- **ARS3, ARS4 ve ARS9 genleri**

Biyoinformatik analizlerden elde edilen sonuçlar ARS3, ARS4 ve ARS9 proteinlerinin; sülfataz domaini, sülfataz motifi ve sinyal peptidi taşıdığını göstermektedir. ARS3, ARS4 ve ARS9 proteinlerinin lokalizasyon tahmini sekretuar yolaktır ve transmembran domaini bulunmamaktadır (Çizelge 4.1.). Biyoinformatik analizler ARS3, ARS4 ve ARS9 genlerinin arılsülfataz olduğu desteklemektedir. Fakat RT-PCR sonucunda bu genlerden ürün elde edilememiştir bu nedenle jel görüntüleri verilmemiştir.

Strenkert vd.'nin (2019) senkronize kültür çalışmasında, ARS3 geninin ışığa geçilmesiyle beraber ilk 5 zaman aralığı içinde ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğunu göstermiştir. 6 saatlik sülfat açlığı verilerini içeren González-Ballester vd.'nin (2010) verilerinde ise yabanıl suş ve mutantta, sülfatlı ve sülfatsız ortam koşullarında ekspresyonunda artış görülmemiştir. Ayrıca González-Ballester vd.'nin verisinde, farklı ortam şartlarında gerçekleşen deneylerde; oksijensiz ve karanlık, yüksek ve düşük CO₂, demir ve nitrojen deneylerinde de gen ekspresyonun olmadığı ya da çok az olduğu gösterilmektedir.

ARS4 geninin González-Ballester vd.'nin çalışmalarında, sülfatsız ortamda yabanıl tip ve mutantta gen ekspresyonunun yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. Ayrıca González-Ballester vd.'nin (2010) verisi, farklı ortam şartlarında gerçekleşen; oksijensiz ve karanlık, yüksek ve düşük CO₂, demir ve nitrojen deneylerinde gen ekspresyonunun olmadığını ya da çok az olduğunu göstermektedir. González-Ballester vd.'nin (2010) verilerine ek olarak Strenkert vd.'nin (2019) yaptığı çalışmada, ARS4 geninin, sadece iki farklı zaman aralığında (hücre bölünmesinden hemen önce) ekspresyonunda artış olduğunu göstermiştir. Bu nedenle ARS4 geninin hücre bölünmesinde rol aldığı düşünülmektedir.

ARS9 geni için Strenkert vd.'nin yapmış olduğu çalışmaya bakıldığında, zaman aralıklarının hiçbirinde ekspres olmadığı görülmüştür. ARS9'un González-Ballester vd.'nin (2010) verilerine bakıldığında; sülfatlı ortamda ekspresyonunun var olduğu ve sülfatsız koşullarda da ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Literatür sonuçlara karşılık, bu çalışmada ARS9 geninden RT-PCR ile ürün elde edilememiştir. Bunun sonucunda ikinci primer siparişinde bulunulmuştur. İkinci çift gelen primerlerle de PCR reaksiyonları kurulduğunda yine ürün elde edilememiştir. ARS9 geninin gen modeli anotasyonuna bakıldığında promotor ve ekzon bölgelerinin diğer gen modeli anotasyonlarıyla uyummadığı görülmektedir ve bu nedenle ARS9 geninin gen modelinde hata olduğu düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda yeni primerlerle RT-PCR yapılması planlanmaktadır.

ARS3, ARS4 ve ARS9 genlerinin literatür verilerine ilave olarak proje boyunca tekrarlanan üç deneysel çalışmada sülfatsız ortamdan alınan örneklerin (5. ve 24. saat) ekspresyon seviyelerine bakılmıştır ve ARS3, ARS4 ve ARS9 genlerinden RT-PCR çalışması ile ürün elde edilememiştir. Genlerden ürün oluşmadığı için Şekil 4.10.'da jel görüntülerinde yer verilmemiştir. Hem literatür çalışmalarından edinilen bilgiler hem de bu tez çalışmasında gerçekleştirilen deneyler sonucu ARS3, ARS4 ve ARS9 genlerinin transkript seviyesinin çok az olduğu belirlenmiştir. Bu genlerin gen ifadelerinin az olması ve deneysel imkanlarımızın yetersizliği sonucu sülfat eksikliği altında genlerdeki

transkript seviyeleri tam olarak saptanamamıştır. Bu genler ekspres oluyorsa bile bu projede kullanılan primerlerle ürün elde edilememiştir. Tez çalışmasındaki hücre kültürü senkronize kültür çalışması değildir. Karışık kültür olması nedeniyle belirli zaman aralıklarındaki küçük ekspresyon artışlarını görmememiz olasıdır. Sonuç olarak çalışmamızın imkanlarıyla yapılan RT-PCR'lar ile genlerin mRNA'ları yakalanamamıştır. Bu genler mRNA'ya sahip olup ekspresyon artışı gerçekleştiriyor olabilir ya da mRNA üretemeyen yalancı genler olabilir. Sonuçta; *ARS3*, *ARS4* ve *ARS9* genlerinden mRNA üretilip üretilmediğini belirleyemediğimiz için, sülfat eksikliği altında transkripsiyon faaliyetleri hakkında yorum yapılamamıştır.

- ***ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genleri**

ARS5, *ARS10* ve *ARS18* genlerinin literatür çalışmalarına bakıldığında bu genlerin ekspresyonunun her koşulda yüksek olduğu görülmektedir. Bu genlerin sülfat eksikliğine aklımasyonda rolü olmadığı düşünülmektedir bu nedenle bu tez çalışmasında *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerine RT-PCR çalışması yapılmamıştır.

ARS5 proteini için yapılan biyoinformatik çalışmalar; sülfataz domaini, sülfataz motifi ve sinyal peptidi içerdiğini göstermektedir (Çizelge 4.1.). *ARS5*'in hücre içi lokalizasyonunun sekretuar yolak olduğu ve bir tane transmembran domaini içerdiği tahmin edilmektedir. Transmembran domaini içermesi; bu proteinin hücre zarına lokalize olduğunu öngörmektedir. Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında, *ARS5* geninin karanlık ve aydınlık ortam fark etmeksizin her zaman aralığında ekspresyonunun çok yüksek olduğu görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) verilerinde ise sülfat içeren ve sülfat içermeyen ortamda gen ekspresyonunun çok yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *ARS5* geninin González-Ballester vd.'nin verilerinde farklı ortam koşullarında; karanlık ve oksijensiz deneylerde nitrojen ve demir deneylerinde de ekspresyonunun çok yüksek olduğu gösterilmektedir.

Biyoinformatik analizlerden edinilen bilgiler; *ARS10* proteinin, sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. Protein lokalizasyon bölgesinin 'diğer (other)' olarak adlandırılan sitozol olabileceği PredAlgo programı kullanılarak tahmin edilmiştir (Çizelge 4.3.). *ARS10* proteinin sinyal peptidi içermediği ve transmembran domaini bulunmadığı Çizelge 4.1.'de belirtilmiştir. *ARS10* geni için Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasına ve González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında; her iki veride de gen ekspresyonunun var olduğu görülmektedir. *ARS10*'un; karanlık ya da aydınlık, sülfatlı ya da sülfatsız ortamlara bağlı olmadan her koşulda gen ekspresyonun hep yüksek olduğu gösterilmiştir. González-Ballester vd.'nin verilerinde karanlık ve oksijensiz deneylerde, yüksek ve düşük CO₂ deneylerinde, demir, bakır ve nitrojen deneylerinde de ekspresyonlarının fazla olduğu gösterilmiştir (González-Ballester vd. 2010). Literatür çalışmalarından faydalananarak, bu genin mRNA'sının varlığı ve gen ifadesinin yüksek olduğu belirlenmiştir.

ARS18 proteini için yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucu, bu proteinin sülfataz domaini, sülfataz motifi ve sinyal peptidi içerdiği tahmin edilmiştir (Çizelge 4.1.). Aynı zamanda *ARS18* proteinin, tahmini protein lokalizasyon bölgesinin sekretuar yolak olduğu ve transmembran domaini içermediği bilinmektedir. *ARS18* geni için Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasına ve González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında; her iki veride de gen ekspresyonunun var olduğu

görülmektedir. González-Ballester vd.'nin sülfat içeren yabancı suş ve mutanta veya sülfat içermeyen ortamdaki yabancı suş ve mutanta bakıldığında transkript düzeyinin iki farklı koşulda da çok yüksek olduğu gösterilmiştir. González-Ballester vd.'nin deneyinde diğer ortam koşullarına bakıldığında; karanlık ve oksijensiz deneylerde, yüksek ve düşük CO₂ deneylerinde, demir ve nitrojen deneylerinde de ekspresyonlarının hep yüksek olduğu gösterilmiştir. Strenkert vd.'nin çalışmasına bakıldığında genin ekspresyon seviyesinin her zaman aralığında çok yüksek olmadığını ama aydınlık ve karanlık ortam ayırmaksızın hep ekspres olduğunu göstermektedir. Elde ettiğimiz verilerle *ARS18* geninin; *ARS5* ve *ARS10* genleri gibi her koşulda ekspresyonu çok yüksek bir gen olduğunu göstermiştir.

Literatür çalışmalarından faydalanarak, *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerinin mRNA'sının varlığı ve gen ifadesinin yüksek olduğu düşünülmektedir. Bu bulgularla *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerine sülfat eksikliğine aklimasyon sürecinde ihtiyaç duyulmadığı ama bu genlerin hücrede gerçekleşen yaşamsal fonksiyonlarda rol oynadığı düşünülmektedir. *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerinin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olmadığı düşünüldüğü için bu tez çalışmasında RT-PCR yapılmamıştır. Bu genler büyük olasılıkla hücrenin büyümesi ve bölünmesi için gerekli arilsülfatazlardır.

- **ARS6 geni**

Biyoinformatik analizlerden çıkan sonuçlar *ARS6* proteinin sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermiştir. Aynı zamanda *ARS6* proteininin, sinyal peptidinin varlığını, protein lokalizasyon bölgesinin sekretuar yolak olduğunu ve transmembran domaini içermediğini göstermektedir (Çizelge 4.1.). Sülfat duyarlı transkripti *ARS6* geni için, TAP besi yerinden alınan örnekle, ortamdaki sülfat çıkarılmasından 5 saat sonra alınan örneğin gen ekspresyonlarına bakıldığında sülfat eksikliğinde artış olduğu Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. *ARS6* geni için Strenkert vd.'nin (2019) ve González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmalarına bakıldığında; her iki veride de gen ekspresyonunun var olduğu görülmektedir. Strenkert vd.'nin çalışmasında belirli zaman aralıklarında ekspresyonunda biraz artış olmaktadır. González-Ballester vd.'nin verilerinde sülfat açlığında genin ekspresyonunun artıp artmadığı net olarak anlaşılamamıştır. *ARS6* geninin *snrk 2.1* mutantında ekspresyonu olmadığı için *ARS6*'nın sülfat eksikliğine aklimasyonunda görevi olduğu düşünülmektedir. González-Ballester vd.'nin verileri çok hassas olmadığı için ve sadece 6 saatlik verileri içerdiği için bu verilerle ekspresyon seviyesi tam olarak belirlenememiştir. Ama bu projede TAP besi yerinde ve sülfatsız besi yerinin 5. ve 24. saatinde genin ekspresyonlarına bakılmıştır. Elde edilen RT-PCR sonuçları, *ARS6* geninin ekspresyonunun TAP besi yerinde de biraz var olduğunu, sülfatsız 5. saatten alınan örnekte ekspresyonunun çok arttığını, 24. saatten alınan örnekte ise ekspresyon düzeyinin azaldığını göstermiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4.13.).

- **ARS7 geni**

Biyoinformatik analizlerden edinilen bilgiler; *ARS7* proteinin, sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. Protein lokalizasyon bölgesinin 'diğer (other)' olduğu tahmin edilmiştir. *ARS7* proteinin sinyal peptidi içermediği ve transmembran domaini bulunmadığı Çizelge 4.1.'de belirtilmiştir. *ARS7* geni için Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasına bakıldığında; sadece bir zaman aralığında gen

ekspresyonunda artış olduğu görülmüştür. *ARS7* geni için González-Ballester vd.'nin (2010) verilerine bakıldığında ise genin ekspresyonunun var olduğu ve sülfat yoksunluğunda ekspresyonunun biraz arttığı gözlemlenmiştir. RT-PCR sonuçları genin TAP besi yerinde biraz ekspresyonu olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını göstermiştir.

- ***ARS8* geni**

Biyoinformatik analizlerden edinilen bilgiler; *ARS8* proteinin, sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. Protein lokalizasyon bölgesinin 'diğer (other)' yani sitozol olduğu tahmin edilmiştir. *ARS8* proteinin sinyal peptidi içermediği ve transmembran domaini bulunmadığı tahmin edilmiştir (Çizelge 4.1.). Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında genin ekspresyonunun belirli zaman aralıklarında (bölünme anı ve sonrasında) biraz arttığı görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında; genin normal koşullarda ekspresyonu olduğu, *snrk 2.1* mutantında da ekspresyonu olmadığı görülmüştür. Bu nedenle sülfat eksikliğine aclimasyon rolünün olduğu düşünülmüştür. Genlerin sülfat yoksunluğu düzeylerini karakterize etmek için sipariş verilen primerlerle RT-PCR reaksiyonu sonucu ürün elde edilememiştir. Bu nedenle ikinci primer çifti tasarlanmıştır ve deneylerde ikinci alınan primer çifti kullanılmıştır. RT-PCR'lar *ARS8* geninin, TAP besi yerinde biraz ekspres olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun azaldığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun sülfatsız 5. saatte göre biraz arttığını göstermiştir (Şekil 4.13.). Genin ekspresyonunun 5. saate azalıp 24. saatte yükselmesi bölünmeye çalışan hücrelerin gen ekspresyonunu tekrar artırıyor olabileceğini düşündürmüştür. Bu sebeple *ARS8* geninin hücre bölünmesiyle alakalı bir gen olduğu düşünülmektedir. Bu ilginç bir bulgu olup ileride konuyla ilgili yapılacak çalışmalar planlanmaktadır.

- ***ARS11* geni**

Biyoinformatik analizlerden elde edilen sonuçlar *ARS11* proteinin; sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. *ARS11* proteinin lokalizasyon tahmini sonucu diğerdir. Proteinin transmembran domaini ve sinyal peptidi bulunmamaktadır (Çizelge 4.1.). Biyoinformatik analizler sonucu *ARS11* geninin arilsülfataz olduğu desteklemektedir. Strenkert vd.'nin (2019) çalışması, *ARS11* geninin bölünmeye yakın zaman aralıklarında gen ekspresyonunda biraz artış olduğunu göstermiştir. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasında normal koşullarda ve sülfatsız koşullarda gen ekspresyonunda artış görülmemektedir. González-Ballester vd.'nin çalışması hassas çalışma olmaması nedeniyle transkript seviyelerini net gösterememektedir. Fakat çalışmadaki RT-PCR sonuçları *ARS11* geninin TAP besi yerinde ekspres olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun biraz arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını ya da ekspresyonunun olmadığını RT-PCR sonuçları (Şekil 4.10.) göstermiştir. Sonuç olarak *ARS11* geninin sülfat eksikliğine aclimasyonda rolü olduğu düşünülmektedir.

- ***ARS12* geni**

Biyoinformatik analiz sonuçları *ARS12* proteinin; sülfataz domaini ve sülfataz motifi taşıdığını göstermektedir. *ARS12* proteinin lokalizasyon tahmini sonucu kloroplasttır. Proteinin transmembran domaini yoktur ve sinyal peptidi taşımamaktadır

(Çizelge 4.1.). *ARS12* geni için González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında genin ekspresyonunun genel olarak var olduğu ve yabanıl tipte de artış olabileceği görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) verisinde *snrk 2.1* mutantında hiç ekspresyon olmaması genin sülfata eksikliğine duyarlı bir gen olduğunu desteklemiştir. Strenkert vd.'nin (2019) çalışması, genin bölünme anında ve sonrasındaki zaman aralıklarında ekspresyonun biraz arttığını göstermiştir. RT-PCR sonuçları ise *ARS12* geninin, TAP besi yerinde biraz ekspres olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını Şekil 4.10.'da göstermiştir. Sonuç olarak tüm bu bulgular *ARS12* geninin sülfat eksikliğine aklımasyonda rol aldığını düşündürmektedir.

- ***ARS13* geni**

Biyoinformatik analizlerden edinilen bilgiler; *ARS13* proteinin, sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. Protein lokalizasyon bölgesinin diğer olduğu tahmin edilmiştir (Çizelge 4.1.). *ARS13* proteininin sinyal peptidi içerdiği ama transmembran domaini içermediği programlar kullanılarak öngörülmüştür. Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında *ARS13* geninin ekspresyonunun çoğu zaman aralığında yüksek olduğu gösterilmiştir. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasında *ARS13* geninin sülfatsız deneylerde ekspresyonunun arttığını ve sülfatsız *snrk 2.1* mutantında ekspresyonu olmadığını göstermiştir. González-Ballester vd.'nin deneylerinde farklı ortam koşullarında düşük düzeyde gen ifadesinin olduğu görülmüştür. RT-PCR sonuçlarından *ARS13* geninin; TAP besi yerinde biraz ekspres olduğunu, sülfatsız 5. saatte gen ifadesini artırdığını ve sülfatsız 24. saatte gen ifadesini azalttığını göstermiştir. Edinilen bu bulgularla *ARS13* geninin sülfat eksikliğine aklımasyonda rolünün olduğu düşünülmektedir.

- ***ARS14* geni**

Biyoinformatik analizler *ARS14* proteinin sülfataz motifi ve sülfataz domaini içerdiğini göstermektedir. Proteinin hücre içi lokalizasyon bölgesinin sekretuar yolak olduğu tahmin edilmektedir (Çizelge 4.1.). *ARS14* proteininin bir tane transmembran domaini taşıdığı ve sinyal peptidi içerdiği bilinmektedir. Strenkert vd.'nin çalışmasında *ARS14* geninin ekspresyonunun belirli zamanlarda biraz artışı görülmüştür. Hücrenin bölünmeye hazırlık aşamasında ekspresyonunu artışı ve bölünmeden sonra ekspresyonunun yok olduğu görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında; *ARS14* geninin ekspresyonunun sülfat deneylerinde ve farklı ortam koşullarında çok az olduğunu gösterilmiştir. González-Ballester vd.'nin verisinde sülfatsız *snrk 2.1* mutantında genin ekspres olmadığını görülmüştür. *snrk 2.1* mutantında ekspresyonunun olmaması bu genin sülfat eksikliğine aklımasyonda rolünün olduğunu düşündürmektedir. RT-PCR sonuçları da *ARS14* geninin ekspresyonunun çok olmadığını, en belirgin ekspresyonunun Şekil 4.10.'da bulunan 2. kültürün jel görüntüsü olduğunu göstermiştir. RT-PCR sonucu; *ARS14* geninin TAP besi yerinde gen ifadesinin biraz olduğunu, 5. saatte gen ifadesini artırdığını ve sülfatsız 24. saatte gen ifadesinin olmadığını göstermiştir.

- **ARS15 geni**

Biyoinformatik analizlerden elde edilen sonuçlar ARS15 proteinin; sülfataz domaini, sülfataz motifi ve sinyal peptidi taşıdığını göstermektedir. ARS15 proteinin lokalizasyon tahmini sonucu kloroplasttır ve bir tane transmembran domaini taşımaktadır (Çizelge 4.1.). Biyoinformatik analiz sonuçları ARS15 proteininin arilsülfataz olduğunu desteklemektedir. Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında ARS15 geninin çoğu zaman aralığında ekspresyonunun olduğu gösterilmiştir. Özellikle hücre bölünmesinden önceki zaman aralığında ekspresyon düzeyi çok artmıştır. Bölünmeden sonra ekspresyonu kademeli olarak azalmıştır. González-Ballester vd.'nin (2010) verilerinde de ekspresyonunun az olduğu gösterilmiştir. ARS15 geni için RT-PCR çalışması yapılmıştır ve jel görüntüsü Şekil 4.13.'de gösterilmiştir. ARS15, TAP besi yerinde ekspresyonu çok az olup; 5. ve 24. saatte ekspresyonu olmayan bir gendir. Dolayısıyla sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olmadığı düşünülmektedir.

- **ARS16 geni**

Biyoinformatik analiz sonuçları ARS16 proteinin; sülfataz domaini ve sülfataz motifi taşıdığını göstermektedir. ARS16 proteinin lokalizasyon tahmini kloroplasttır. Proteinin sinyal peptidi ve bir tane transmembran domaini bulunmaktadır (Çizelge 4.1.). Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında ARS16 geninin çoğu zaman aralığında ekspresyonunun az da olsa hep var olduğunu göstermiştir. Özellikle bölünme anında ve karanlık ortamlarda genin ekspresyonunda artış görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasında genin ekspresyonun az olduğu ve ekspresyon seviyesinde de fark olmadığı görülmüştür. ARS16 geni için primer tasarımı sırasında gen modelinde promotor ve ekzon bölgelerinde farklılıklar olduğu görülmüştür. RT-PCR'larla genin ekspresyonun saptanması zor olmuştur. ARS16 geni için yapılan deneylerde genin ekspresyonunun sadece ikinci kültürde az da olsa var olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.10.). TAP besi yerinde gen ifadesinin olduğu ve sülfatsız 5. saate de biraz ekspres olduğu ama TAP besi yerine oranla fark olmadığı görülmüştür. ARS16 geninin ekspresyonu 24. saatte hiç görülmemiştir. Dolayısıyla ARS16'nın gen ifadesi az olan bir gen olduğu sülfatsız ortam (Şekil 4.10.) ve fosfatsız ortam (Şekil 4.11.) deneyleriyle de gösterilmiştir.

- **ARS17 geni**

Biyoinformatik analizlerden edinilen bilgiler; ARS17 proteinin, sülfataz domaini ve sülfataz motifi içerdiğini göstermektedir. Protein lokalizasyon bölgesinin diğer, yani sitozol olduğu tahmin edilmiştir (Çizelge 4.1.). ARS17 proteinin sinyal peptidi içermediği ve transmembran domaini bulunmadığı tahmin edilmiştir. Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında genin ekspresyonunun belirli zaman aralıklarında (bölünme öncesi ve bölünme anı) biraz arttığı görülmüştür. González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmasına bakıldığında; ARS17 geninin normal koşullarda az ekspresyonu olduğu, yabanıl suşun sülfatsız ortamda ekspresyonunun arttığı ve *snrk 2.1* mutantında da ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu nedenle genin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğu düşünülmektedir. RT-PCR sonuçları bu gen için ilginç sonuçlar vermiştir. Şekil 4.10.'da ARS17 geninin; TAP besi yerinde ekspresyonu olmayıp, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunu biraz artırdığı ve sülfatsız 24. saatte en yüksek ekspresyonu olduğu görülmüştür.

- **ARS19/ARS* geni**

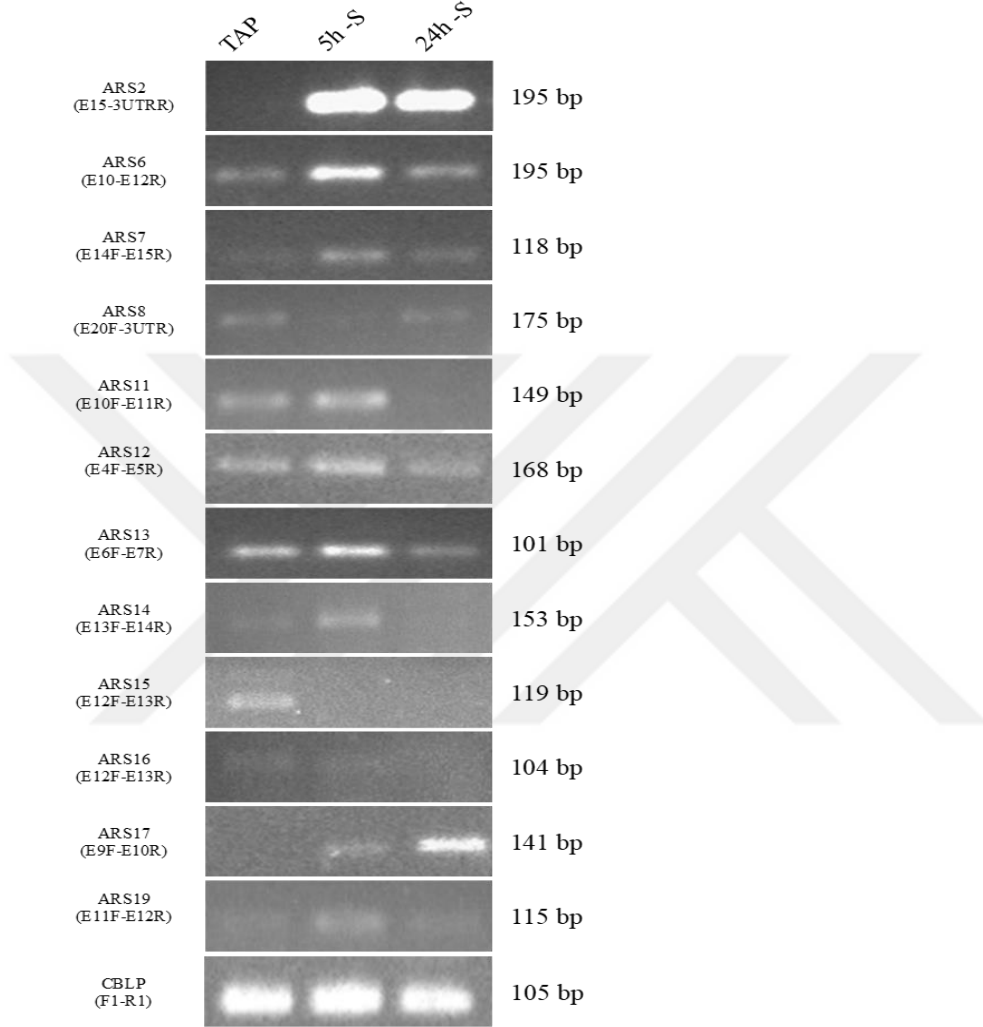
Biyoinformatik analiz sonuçları ARS19 proteinin; sülfataz domaini ve sülfataz motifi taşıdığını göstermektedir. ARS19 proteinin tahmini lokalizasyon sonucu kloroplasttır. Proteinin transmembran domaini yoktur ve sinyal peptidi taşımamaktadır (Çizelge 4.1.). Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında bölünme anında, karanlık zamanlarda ve 0. zamanda (ışığın açıldığı an) genin ekspresyonu artmıştır. ARS19'un González-Ballester vd.'nin (2010) verilerine bakıldığında; sülfat içeren ve sülfat içermeyen ortamda ekspresyonunun olmadığı görülmüştür. González-Ballester vd.'nin verisinde sülfat deneyleriyle ilgili tam bir bilgi edinilememiştir. ARS19'un González-Ballester vd.'nin (2010) diğer ortam deneylerine bakıldığında karanlık ve oksijensiz deneylerde ekspresyonunda biraz artış gözlenmiştir fakat yüksek ve düşük CO₂ deneyinde, bakır ve çinko deneyinde ekspresyonu olmadığı görülmüştür. RT-PCR sonuçları ARS19 geninin, TAP besisi yerinde çok az ekspresyonu olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunu artırdığını, sülfatsız 24. saatte ise ekspresyonu tekrar azalttığını göstermiştir.

RT-PCR yorumlarında yer alan Strenkert vd.'nin çalışma verisi Şekil 4.12.'de verilmiştir. Sadece çalışma ile ilgili olan ARS genleri alınmıştır ve genlere/gruplamalara göre farklı renklendirmeler yapılmıştır.

			Expression level (FPKM)															
LocusID	Name	locus	-11	-9	-7	-5	-3	-1	-0.5	0	0.5	1	3	5	7	9	11	13
Cre01.g011901	Cre01.ARS7	chromoso	0,781254	1,23382	0,781381	0,48887	0,295038	0,203882	0,257364	0,234275	0,177489	0,217093	0,069784	0,056548	0,01804	0,01157	0,059951	0,582521
Cre01.g012100	ARS4	chromoso	0,80873	0,103486	0,047029	0,071059	0,04009	0,189608	0,134351	0,098668	0,042146	0,069542	0,064837	0,186628	0,724132	4,27713	5,41265	0,745117
Cre01.g012126	Cre01.ARS19	chromoso	2,11765	2,47164	3,77914	3,28156	2,69868	2,40514	2,50449	2,009	0,404526	0,159893	0,300092	0,317583	0,290121	0,671043	0,780671	1,86742
Cre02.g085850	ARS6	chromoso	1,76967	0,193555	0,165601	0,147413	0,116701	0,210084	0,27494	0,361309	0,359004	0,327042	0,935861	1,49492	1,43981	2,33282	3,98643	1,10115
Cre02.g086000	Cre02.ARS8	chromoso	1,53635	3,12826	2,90605	2,11345	0,948295	0,299601	0,417115	0,386741	0,149432	0,266963	0,052686	0,044452	0,016675	0,029032	0,116891	1,41181
Cre02.g090550	Cre02.ARS9	chromoso	0,311207	0,40883	0,469912	0,467476	0,429008	0,495649	0,530847	0,487552	0,079955	0,04152	0,100941	0,161692	0,670892	0,656666	0,438106	0,413266
Cre04.g226050	Cre04.ARS10	chromoso	4,38765	5,44469	4,14156	4,06863	2,87812	2,64826	2,88073	3,05625	2,31157	2,13061	3,39687	3,74734	3,23379	1,90658	2,44435	5,64883
Cre04.g226550	Cre04.ARS11	chromoso	1,05304	0,961445	0,559593	0,377549	0,198853	0,533856	0,705768	0,644841	0,233522	0,218587	0,398973	1,43631	5,6921	6,91763	3,38509	1,4424
Cre04.g226600	Cre04.ARS12	chromoso	19,0765	11,054	1,3802	0,372595	0,322398	0,276038	0,489557	0,61298	0,422759	0,272153	0,077128	0,077304	0,043495	0,257347	5,06715	22,7164
Cre05.g239750	Cre05.ARS13	chromoso	3,93895	5,39968	3,15513	2,14968	1,31786	1,33166	1,26774	1,23877	0,281458	0,385124	1,84573	3,58007	6,29677	7,03687	5,38277	5,03243
Cre05.g239800	Cre05.ARS14	chromoso	1,02923	0,362038	0,057183	0,070159	0,075729	0,126297	0,097284	0,111674	0,027304	0,079174	0,357864	0,701333	2,05233	3,02141	4,79695	1,39961
Cre05.g239900	Cre05.ARS15	chromoso	8,81477	4,98311	1,86134	1,25552	0,943352	1,10399	1,33524	1,46939	0,530178	0,305232	0,379217	0,666491	0,824858	2,93677	7,77584	13,668
Cre06.g293800	Cre06.ARS16	chromoso	2,50516	1,44676	2,2247	2,6582	2,50205	2,02642	2,30996	2,32824	0,621385	0,553177	1,02746	1,28536	1,37599	1,31992	0,879694	1,83824
Cre07.g328500	Cre07.ARS17	chromoso	2,75273	0,338283	0,059102	0,011289	0,03316	0,179238	0,127013	0,089649	0,05363	0,050298	0,058802	0,030764	0,232122	2,48589	6,30069	1,27475
Cre10.g430200	ARS3	chromoso	0,443058	0,185916	0,291036	0,276546	0,397629	0,68185	0,891523	1,13635	1,82538	2,44521	3,04982	1,37973	0,716302	0,275776	0,075299	0,23074
Cre10.g431800	ARS5	chromoso	22,2997	24,2076	6,30979	3,47485	3,12989	3,98635	5,36851	7,07985	26,7565	27,4015	17,9207	15,0776	13,1654	4,83464	6,71098	27,3526
Cre10.g432600	Cre10.ARS18	chromoso	0,903276	1,28709	1,03547	0,952263	0,762727	0,688403	1,39954	1,35838	2,31729	1,72678	1,09194	0,824081	0,558486	0,270326	0,148413	0,686849
Cre16.g671350	ARS2	chromoso	28,7049	0,530703	0,833283	0,870992	0,594478	0,488117	0,439586	0,391017	2,61718	2,87014	0,791326	0,774655	1,15132	2,03488	14,0448	0,332846
Cre16.g671400	ARS1	chromoso	3,31889	0,711545	1,01543	0,977272	0,529654	0,348116	0,299811	0,312098	0,380734	0,448806	0,738748	1,02248	1,31084	1,76314	2,65076	0,425291

Şekil 4.12. Strenkert vd.'nin RNA-sekans çalışmasından alınmıştır (Strenkert vd. 2019)

Tez çalışması için hazırlanan hücre kültürlerinin RT-PCR sonuçları bir şekil üzerinde toplanarak özet haliyle Şekil 4.13.'de verilmiştir. Şekil 4.13.'de diğer RT-PCR jel sonuçlarında (Şekil 4.10.) görülmeyen *ARS15* geninin sonucu da eklenerek verilmiştir. 5.Sonuçlar kısmında bulunan Çizelge 5.1.'deki genlerin ekspresyon seviyelerindeki yorumlar Şekil 4.13.'e göre yapılmıştır.



Şekil 4.13. Sülfat açlığı çeken hücrelerin RT-PCR sonuçları

5. SONUÇLAR

Biyoinformatik analizlerden ve RT-PCR çalışmalarından elde edilen tüm sonuçlar Çizelge 5.1.'de verilmiştir. Genlerin ekspresyon seviyeleri hakkındaki yorumlar RT-PCR sonuçları (Şekil 4.13.) ve literatür çalışmaları göz önüne alınarak yapılmıştır.

Çizelge 5. 1. Biyoinformatik analizler ve RT-PCR sonuçlarının özeti

Gen İsmi ve Modeli	Transmembran Domaini	Lokalizasyon Tahmini	Domain Analizi	Sülfataz Motifi (1-2)	Sinyal Peptidi	Ekspresyon Düzeyleri		
						TAP	5h-S	24h-S
<i>ARS1*</i> Cre16.g671400.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-21)	Yok	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS2</i> Cre16.g671350.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-21)	Yok	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS3</i> Cre10.g430200.t1.2	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-24)	Yok	Yok	Yok
<i>ARS4</i> Cre01.g012100.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-14)	Yok	Yok	Yok
<i>ARS5*</i> Cre10.g431800.t1.2	1 tane	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-26)	Var	Var	Var
<i>ARS6</i> Cre02.g085850.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-28)	Az	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS7</i> Cre01.g011901.t1.1	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	-	Az	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS8</i> Cre02.g086000.t1.1	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	-	Var	Az	Var
<i>ARS9</i> Cre02.g090550.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-20)	Yok	Yok	Yok
<i>ARS10*</i> Cre04.g226050.t1.1	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	-	Var	Var	Var
<i>ARS11</i> Cre04.g226550.t1.2	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	-	Var	Artıyor	Yok
<i>ARS12</i> Cre04.g226600.t1.1	Yok	Kloroplast	Sülfataz	Var	-	Var	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS13</i> Cre05.g239750.t1.2	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	(1-13)	Var	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS14</i> Cre05.g239800.t2.1	1 tane	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-32)	Az	Artıyor	Azalıyor
<i>ARS15</i> Cre05.g239900.t1.1	1 tane	Kloroplast	Sülfataz	Var	(1-33)	Var	Yok	Yok
<i>ARS16</i> Cre06.g293800.t1.1	1 tane	Kloroplast	Sülfataz	Var	(1-35)	Az	Az	Yok
<i>ARS17</i> Cre07.g328500.t1.1	Yok	Diğer	Sülfataz	Var	-	Yok	Var	Artıyor
<i>ARS18*</i> Cre10.g432600.t1.1	Yok	Sekretuar yolak	Sülfataz	Var	(1-29)	Var	Var	Var
<i>ARS19</i> Cre01.g012126.t1.2	Yok	Kloroplast	Sülfataz	Var	-	Az	Artıyor	Azalıyor

*: Bu projede *ARS1*, *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genleri için RT-PCR çalışması yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında Phytozome veri tabanında “arylsulfatase” olarak anote edilmiş gen modelleri saptanmış, gen ve protein dizilimleri alınarak biyoinformatik analizleri yapılmıştır. Yapılan biyoinformatik çalışmalar bu gen modellerinin arilsülfataz proteinleri olduğunu desteklemektedir. Bu projedeki asıl amacımız bu gen modellerinin transkript düzeylerinin sülfat eksikliği altında değişip değişmediğini RT-PCR çalışmalarıyla belirlemek olmuştur.

ARS1 ve *ARS2* genlerinin literatür çalışmaları, bu tezdeki deneysel çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir. Sonuçlar *ARS1* ve *ARS2* geninin sülfat eksikliği altında ekspresyonunun arttığını göstermektedir, dolayısıyla *ARS1* ve *ARS2* geninin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğunu gösterilmiştir. *ARS1* geni ile bu projede deneysel olarak çalışılmamıştır. *ARS2* geni ise bu çalışma pozitif kontrol geni olarak kullanılmıştır.

Literatür çalışmaları *ARS3* ve *ARS4* genlerinin transkript seviyesinin az olduğunu göstermektedir. Proje boyunca yapılan RT-PCR çalışmalarında da bu genlerden ürün elde edilememiştir. Bu sonuçların ışığı altında bu genlerin çalışmada kullanılan büyüme koşulları altında mRNA düzeylerinin çok az olduğu veya hiç mRNA'sı olmadığı sonucuna varılmıştır. İleriki çalışmalarda bu genler için farklı primer çiftleri tasarlanıp deneylerin tekrarlanması planlanmaktadır.

ARS5, *ARS10* ve *ARS18* genleri için literatürdeki RNA-sekans çalışmalarına bakılarak bu genlerin mRNA'sının varlığı ve gen ifadesinin yüksek olduğu düşünülmüştür. Bu bulgularla *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerine sülfat eksikliğine aklimasyon sürecinde ihtiyaç duyulmadığını ama bu genlerin hücrede gerçekleşen yaşamsal fonksiyonlarda rol aldığı düşünülmektedir. *ARS5*, *ARS10* ve *ARS18* genlerinin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olmadığı düşünüldüğü için bu tezde deneysel olarak RT-PCR çalışması yapılmamıştır.

ARS8 ve *ARS9* genleri için tasarlanan primer çiftleri kullanıldığında ürün elde edilemediği görülmüştür. Bu nedenle bu genler için ikinci primer çiftleri tasarlanmıştır. İkinci gelen primerler PCR reaksiyonlarında kullanıldığında *ARS9* geninden yine ürün elde edilememiştir ve jel görüntüleri verilmemiştir. *ARS8* geninden RT-PCR sonucu ürün elde edilmiştir ve Şekil 4.13.'de gösterilmiştir. *ARS8* ve *ARS9* geninin ikinci çift sipariş edilen primerleri ekzon ve 3-UTR bölgesine bağlandığı, dolayısıyla elde edilen ürünün cDNA ürünü mü gDNA ürünü mü olduğundan emin olunmadığı için bu genlerin RT-PCR çalışmalarından net sonuç çıkartılamamıştır. Bu genlerin aydınlatılması için ilerideki çalışmalarda bu genlere farklı primer çiftleri tasarlanarak RT-PCR'ların tekrarlanması planlanmaktadır.

RT-PCR sonuçları, *ARS6* geninin ekspresyonunun sülfatsız 5. saatte epey arttığını, 24. saatte ise azaldığını göstermiştir. Bu sonuç *ARS6* geninin sülfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğunu göstermiştir. *ARS6* geninin mRNA düzeyinin fosfat açlığı altında da arttığı Şekil 4.11.'de görülmektedir. Dolayısıyla bu genin spesifik olarak sülfat açlığına değil de genel besin açlığına aklimasyonda rol aldığı düşünülmektedir. Genin diğer besin eksikliği (örnek olarak azot açlığı) altındaki transkript düzeyine bakılarak bu konu üzerinde daha kesin bir sonuca varılabilir.

ARS7 geninin RT-PCR sonucu, TAP besi yerinde biraz ekspresyonu olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını göstermiştir. Gen için primer tasarımı sırasında, gen modeli anotasyonlarının birbirinden farklı olduğu görülmüştür ve gen için primer tasarlamak zor olmuştur. Gen modellerine bakınca *ARS7* geninin iki farklı mRNA üretebileceği düşünülmüştür fakat kullanılan primer çiftleriyle ikinci bir ürün oluşmadığı görülmüştür. RT-PCR sonucu *ARS7* geninin sülfat eksikliğine aklimasyonda rol aldığını göstermiştir.

RT-PCR sonuçları, *ARS11* geninin TAP besi yerinde ekspres olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun biraz arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını ya da ekspresyonunun olmadığını göstermiştir. Şekil 4.10.'da 2.kültür sonucuna bakıldığında, *ARS11* geninin 24. saatte ekspresyonu hiç yoktur o yüzden primerler başka bir şeyi tanıyıp ondan ürün ürettiyor olabileceği düşünülmüştür.

RT-PCR sonuçları *ARS12* geninin, TAP besi yerinde biraz ekspresyonu olduğunu, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun arttığını ve sülfatsız 24. saatte ekspresyonunun azaldığını Şekil 4.10.'da göstermiştir. Bu sonuçlar *ARS12* geninin sülfat eksikliğine aklımasyonda rol aldığını göstermektedir. Fakat fosfat açlığında da (Şekil 4.11.) ekspresyonunda da artış görüldüğü için *ARS12*'nin genel besin eksikliğine aklımasyonda rol aldığını düşünülmektedir.

RT-PCR sonuçlarından *ARS13* geninin; TAP besi yerinde biraz ekspres olduğu, sülfatsız 5. saatte gen ifadesini artırdığı ve sülfatsız 24. saatte gen ifadesini azalttığı Şekil 4.10.'dan öğrenilmiştir. Bu artış fosfat açlığı altında da görülmektedir. Bu sonuçlar *ARS13* geninin genel besin eksikliğine aklımasyonda rol aldığını göstermektedir.

ARS14 geni ekspresyonu çok az olan bir gendir. RT-PCR sonuçları; *ARS14* geninin TAP besi yerinde gen ifadesinin biraz olduğunu, sülfatsız 5. saatte gen ifadesini belirgin bir şekilde artırdığını ve sülfatsız 24. saatte gen ifadesinin olmadığını Şekil 4.10. göstermiştir. Fakat aynı sonuçlar her tekerrürde görülememiştir. İleriki çalışmalarda elde edilen bu sonucun farklı deneysel kültürler veya farklı primer çiftleri kullanılarak tekrarlanması planlanmaktadır.

ARS15 geninin (ve diğer genlerin) primer tasarımı Phytozome veri tabanındaki gen modelleri kullanılarak primerler dizayn edilmiştir. *ARS15* geni için Phytozome veri tabanındaki gen modelinin yanlış olduğu düşünülmektedir. Bunun nedeni diğer gen modeli anotasyonlarındaki ekzon sayılarının Phytozome'daki gen modeli ile uyuşmamasıdır. *ARS15* geni için tasarlanan primer çifti, ekzon bölgesine denk gelmemiş olabilir ve primer bağlanamamış olabilir ya da yanlış ürün elde edilmiş olabilir. İleriki çalışmalarda, *ARS15* geninin ekspresyon düzeyinin belirlenebilmesi için farklı bir primer çifti ile RT-PCR çalışmasının tekrarlanması gerekmektedir. RT-PCR sonucu *ARS15*'in, TAP besi yerinde ekspresyonu çok az olup 5. ve 24. saatte ekspresyonu olmayan bir gen olduğunu göstermektedir. Bu nedenle sülfat eksikliğine aklımasyonda rolünün olmadığı düşünülmektedir.

ARS16 geninin transkript düzeyi tam olarak aydınlatılamamıştır ama tüm bulgular genin transkript seviyesinin az olduğunu göstermiştir. *ARS16* geni için González-Ballester vd.'nin (2010) çalışmalarına bakıldığında genin ekspresyonunun var olduğu ama sülfat açlığında ekspresyonunda fark olmadığı görülmüştür. Projede kullanılan primer çiftleriyle sadece ikinci kültürde çok az ekspresyonu olduğu görülmüştür. TAP besi yerinde gen ifadesinin olduğu ve sülfatsız 5. saate de biraz ekspres olduğu ama TAP besi yerine oranla fark olmadığı ve 24. saatte hiç ekspresyonu olmadığı görülmüştür. Strenkert vd.'nin (2019) çalışmasında bu genin karanlık ortam koşullarında ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Bu projede karanlık ortamda çalışma imkânı bulunmadığı için genin ekspresyonu saptanamamış olabilir.

RT-PCR çalışmaları, *ARS17* geninin TAP besisi yerinde ekspresyonu olmayıp, sülfatsız 5. saatte ekspresyonunu biraz artırdığını ve sülfatsız 24. saatte en yüksek ekspresyonu olduğunu göstermiştir. Bu sonuç çalışma boyunca tekrarlanan tüm kültürlerde görülmüştür. *ARS* genleriyle ilgili daha önce böyle bir sonuç görülmediği için *ARS17* geni bu proje için büyük önem taşımaktadır. Sonuç olarak *ARS17* geninin sülfat eksikliğine aklimasyonda kesin rolü olduğu düşünülmektedir.

ARS19 geninin RT-PCR sonuçlarına göre TAP besisi yerinde ekspresyonunun çok az olduğu görülmüştür. Sülfatsız 5. saatte ekspresyonunun artışı ve 24. saatte ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Edinilen bu bulgularla *ARS19* geninin hem sülfat hem de fosfat eksikliğine aklimasyonda rolünün olduğu düşünülmektedir.

Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında incelenen 17 *ARS* geninden hiçbirinde ekspresyonunun sülfat açlığında *ARS2* geninde görülen artış kadar olmadığını göstermiştir. Buna rağmen *ARS17*'de 24. saat sülfat açlığında büyük bir artış saptanmıştır. Yaptığımız biyoinformatik analizler bu genlerin hepsinin *ARS* geni olduğunu öne sürmektedir, fakat hepsinin transkript seviyeleri birbirinden farklı çıkmıştır. Bu sonuçların ışığında *ARS6*, *ARS7*, *ARS8*, *ARS11*, *ARS12*, *ARS13*, *ARS14*, *ARS16*, *ARS17* genlerinin sülfat eksikliğine aklimasyonda rollerinin olduğu düşünülmektedir.

Şekil 4.11.'de *C. reinhardtii*'nin fosfat açlığında gen ekspresyonuna bakılması sonucu, *ARS* primerlerinin fosfat açlığı çeken genlerde de ekspresyonu olduğunu göstermiştir. RT-PCR sonucunda bazı genlerin hem sülfatazları hem de fosfatazları kesebildiği görülmüştür. *ARS7*, *ARS16* ve *ARS17* genlerinin jel görüntüsünden ekspresyonu olmadığı görülmüştür. *ARS16* geninin sülfat açlığında da ekspresyonunun çok olmaması bu genin transkript düzeyinin az olduğunu göstermiştir. *ARS7* ve *ARS17* genlerinin fosfat açlığında (Şekil 4.11.) ekspresyonu olmadığı için bu genlerin sülfat açlığına spesifik genler olduğu düşündürmektedir. *ARS2* geninin fosfat açlığında ekspresyonunda artış görülmüştür fakat bu çalışmanın jel görüntüsü sonuçlarda verilmemiştir. Bu sonuç *ARS2*'nin de fosfat açlığında artışı (sülfat açlığında olduğu kadar değil) göstermektedir.

C. reinhardtii ve diğer organizmalardaki *ARS* protein sekansları ile filogenetik ağaç çizilmiştir. Filogeni analizi sonucu *C. reinhardtii* proteinlerinin kendi içinde bir küme, insandan alınan *ARS* proteinlerinin farklı bir küme yaptığı görülmüştür. Ağaçta *C. reinhardtii* proteinlerinin, *Volvox carteri* proteinleri ile çok yakın dallarda olduğu; *Homo sapiens* ve bakteri türleri ile ayrı grupta kümelendiği görülmüştür. Bakteri proteinlerinin *C. reinhardtii*'den farklı ve uzak bir dallara ayrıldığı görülmüştür. *Rhodospirillum rubrum* ve *Pseudomonas aeruginosa* proteinlerinin ağaçta birbirine çok yakın dallarda olduğu görülmüştür ve aynı zamanda bu bakterilere en yakın dallarda *Homo sapiens* *ARS* proteinleri olduğu görülmüştür. İlginç olarak *Homo sapiens*'in 3 *ARS* proteininin (*Sulf1*, *Sulf2*, *GNS*) filogenetik ağaçta *C. reinhardtii* ve *Volvox carteri* türlerine daha yakın dallarda olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar *C. reinhardtii* *ARS* proteinlerinin evrimsel süreçte çok değişmediğini/farklılaşmadığını göstermektedir.

Topraktaki sülfat konsantrasyonu her zaman yeterli olmayabilir. Böyle zamanlarda bitki büyümesi için yeterli sülfat sağlanamayabilir, bu durum bitkide büyüme geriliğine neden olmaktadır. Bitkiler sülfatsız ortamlarda mahsulün azalması,

verim ve kalitenin düşmesi şeklinde etkilenmektedir. Bu tür etkilerin üstesinden gelebilmek için bitkiler bazı mekanizmalar geliştirerek düşük sülfat içeren ortamlara uyum sağlamaktadır. *C. reinhardtii* toprakta yaşayan bir yeşil alg türü olduğu için sülfat açlığı çeken topraklarda biyogübre olarak kullanılabilme potansiyelinin olduğu düşünülmektedir. Çevre dostu tarım uygulamalarında kullanılan biyogübrelerin toprak mikrobiyal biyokütlesini, enzim aktivitesini, bitki gelişimini, verimini ve bazı meyve kalite parametrelerini artırabildiği görülmektedir. Mikrobiyal gübre konusunun *C. reinhardtii* üzerinde çalışılmasının tarımsal biyoteknoloji alanına büyük fayda sağlayacağı ve doğa dostu bir gübre olarak *C. reinhardtii*'nin tarımda kullanılabileceği düşünülmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Aksoy, M., La, T., Lam, N. & Forest, C. 2021. A forward genetic screen for isolation of fusion defective mating type minus mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 49 (3), 321-332.
- Aksoy, M., Pootakham, W., & Grossman, A. R. 2014. Critical function of a *Chlamydomonas reinhardtii* putative polyphosphate polymerase subunit during nutrient deprivation. *Plant Cell*, 26(10): 4214-4229.
- Aksoy, M., Pootakham, W., Pollock, S. V, Moseley, J. L., González-Ballester, D., & Grossman, A. R. 2013. Tiered regulation of sulfur deprivation responses in *Chlamydomonas reinhardtii* and identification of an associated regulatory factor. *Plant Physiology*, 162 (1): 195–211.
- Altschul, S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anonim, 1: <http://www.Tessengerlo-Agrochem.com> [Son erişim tarihi: 02.10.2021].
- Appiah, M. R., & Ahenkorah, Y. 1989. Determination of available sulphate in some soils of Ghana using five extraction methods. *Biology and Fertility of Soils*, 8: 80–86.
- Arıcı, M., 2007, Enzimoloji, Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, s.35.
- Attwood, T. K. 2000. The Babel of Bioinformatics. *Science*, 290(5491): 471-473.
- Baldi, P., and Brunak, S., 2001. Bioinformatics The Machine Learning Approach,
- Becker, E. W. 1994. Microalgae: Biotechnology and microbiology. New York: Cambridge University Press.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235-242.
- Bhamawat, P.M. 2010. Growth of *Chlamydomonas reinhardtii* under nutrient-limited conditions in steady-state bioreactors. Master of Science Thesis. Faculty of the Graduate School of Cornell University, 83 p.
- Blair, M.F., Kokabian, B. and Gude, V.G. 2013. Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2: 665-674.
- Blundell, T.L., Sibanda, B.L., Montalvão, R.W., Brewerton, S., Chelliah, V., Worth, C.L., Harmer, N.J., Davies, O., & Burke, D. 2006. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1467): 413-423.
- Brown, M. and Robert, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207: 289-309.

- Callow, M.J., Dudoit, S., Gong, E.L., Speed, T.P. and Rubin, E.M. 2000. Microarray expression profiling identifies genes with altered expression in HDL-deficient mice. *Genome research*, 10(12):2022-2029.
- Campbell, A. M., Rayala, H. J., Goodenough, U. W. 1995. The iso1 gene of *Chlamydomonas* is involved in sex determination. *Molecular Biology Of The Cell*, 6(1): 87-95.
- Dangeard, P.A. 1888. *Chlamydomonas reinhardtii*'in sistematigi. http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=27356. (Erişim Tarihi:30.10.2017).
- Dangeard, P.A. 1888. Recherches sur les algues inférieures. *Annales des Sciences Naturelles, Botanique*, 77: 105-175.
- Davies, J.P. Yildiz, F.H. Grossman, A.R. 1996. Sac1, a putative regulator that is critical for survival of *Chlamydomonas reinhardtii* during sulfur deprivation. *EMBO J.* 15: 2150–2159.
- Davies, J.P. Yildiz, F.H. Grossman, A.R. 1999. Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell* 11: 1179–1190.
- de Hostos, E. L., Togasaki, R. K., & Grossman, A. 1988. Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic arylsulfatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Biology*, 106: 29–37.
- Deng, X., Zhou, Y., Li, Y. and Fei, X. 2012. Optimization of the culture conditions of a *Chlamydomonas* high oil content ultraviolet mutant CC124-M25 and polymorphism analysis by inter-simple sequence repeat (ISSR). *African Journal of Microbiology Research*, 6: 3604-3619.
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 1;36(Web Server issue): W465-9.
- Dibyajyoti, S., Bin, E.T., Swati, P. 2013. Bioinformatics: The effects on the cost of drug discovery. *Galle Medical Journal*, 18(1).
- Dodgson, K.S. and Rose, F.A. 1976. Sulfohydrolases In: *Metabolism of Sulfur Compounds Vol. 7. Metabolic Pathways* (Greenberg DM. Ed.), 359-431. Academic Press, London.
- dos Santos, R.R., Moreira, D.M., Kunigami, C.N., Aranda, D.A., Teixeira, C. M. 2015. Comparison between several methods of total lipid extraction from *Chlorella vulgaris* biomass. *Ultrason Sonochem.* 22: 95-9.
- Duygu-Yalçın, D. ve Özer, T. 2018. *Chlamydomonas* suşlarının farklı kùltür besi ortamları ve doğal mineralli su kullanılarak biyomas ve üreme oranlarının artırılması. *Fırat Üniv. Fen Bilimleri Dergisi*, 30 (2): 63-71.
- Eberhard, S., Finazzi, G. Wollman, F.A. 2008. The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42: 463-515.
- Eraslan, F., Nal, A., Güneş, A., Çiçek, N. ve Alpaslan, M. 2008. Ekmeklik ve

- makarnalık buğday çeşitlerinin gelişimi ve mineral madde içeriğine kükürtlü gübrelemenin etkisi. 4. *Ulusal Bitki Besleme ve Gübre Kongresi*, 8-10 Ekim, Konya. Bildiri kitabı s:268-278.
- Finn, R.D., Coghill, P., Eberhardt, R.Y., Eddy, S.R. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44: 279-285.
- Fischer, B. B., Eggen, R. I. L., Trebst, A., Krieger-Liszkay, A. 2006. The glutathione peroxidase homologous gene *Gpxh* in *Chlamydomonas reinhardtii* is upregulated by singlet oxygen produced in photosystem II. *Planta*, 223: 583-590.
- Fitzgerald, J.W. 1976. Sulfate Ester Formation and Hydrolysis: A Potentially Important yet Often Ignored Aspect of the Sulfur Cycle of Aerobic Soils. *Bacteriol Rev* 40(3): 698–721.
- Franco, B., Meroni, G., Parenti, G. 1995. A cluster of sulfatase genes on Xp22.3: mutations in chondrodysplasia punctata (CDPX) and implications for warfarin embryopathy. *Cell* 81: 15-25.
- Fuentes-Grünwald, C., Alacid, E., Garcés, E., Rossi, S. and Camp, J. 2012. Biomass and lipid production of dinoflagellates and raphidophytes in indoor and outdoor photobioreactors. *Marine Biotechnology*, 15: 37-47.
- Fuhrmann, M. Oertel, W. Hegemann, P. 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 19: 353-361.
- Giordano, M. Norici, A. Hell, R. 2005. Sulfur and phytoplankton: acquisition, metabolism and impact on the environment. *New Phytol.* 166: 371–382.
- Giugliani, R., P. Harmatz, and JE. Wraith. 2007. Management Guidelines for Mucopolysaccharidosis VI. *Pediatrics* 120(2): 405–418.
- González-Ballester, D., Casero, D., Cokus, S., Pellegrini, M., Merchant, S.S., Grossman, A.R. 2010. RNA-Seq Analysis of Sulfur-Deprived *Chlamydomonas* Cells Reveals Aspects of Acclimation Critical for Cell Survival. *The Plant Cell*, 22(6): 2058-2084.
- Goodenough, U.W., Armbrust, E.V., Campbell, A.M., Ferris, P.J. 1995. Molecular genetics of sexuality in *Chlamydomonas*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 21-44.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and Rokhsar, D.S. 2012. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40:1178–1186.
- Gorman, D. S., & Levine, R. P. 1965. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(6): 1665–1669.
- Goto, K. Johnson, C. H. 1995. Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology*, 129(4): 1061-1069.

- Gross, C.H., Ranum, L.P.W. and Lefebvre, P.A. 1988. Extensive restriction fragment length polymorphisms in a new isolate of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics*, 13:503-508.
- Harris, E. H. 2001. *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 363-406.
- Harris, H.E., Stern, D.B., Witman, G. B. (Ed.). 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook* (2nd Ed.). Academic Press.
- Havutcu, G.H., 2021. *Chlamydomonas reinhardtii*'de Bazı Fosfataz ve Fitaz proteinlerini Kodlayan Genlerin Fosfat Eksikliği Altındaki Ekspresyon Düzeylerinin RT-PCR ile Belirlenmesi. Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 55 s.
- Herrin, D.L. Nickelsen, J. 2004. Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynthesis Research*, 82: 301-314.
- Hettiarachchi, D., & Dissanayake, V. H. W. 2019. Three novel variants in the arylsulfatase A (ARSA) gene in patients with metachromatic leukodystrophy (MLD). *BMC Research Notes*, 12(726).
- Higa, T. and Parr, J.F. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research Center, Atami, Japan, pp. 4-16.
- Holmes, R. S. 2017. Comparative and evolutionary studies of mammalian arylsulfatase and steryl sulfatase genes and proteins encoded on the X-chromosome. *Computational Biology and Chemistry*, 68: 71-77.
- Horton, P., Park, K.-J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., & Nakai, K. 2007. WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res.*, 35: 585-587.
- Hutner, S. H. Provasoli, L. Schatz, A. and Haskins C. P. 1950. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society*, 94 (2): 152-170.
- J McGill, J.J., Inwood, A.C., Coman, D.J. 2010. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis VI from 8 weeks of age-a sibling control study. *Clin Genet*, 77 (5): 492-498.
- Jarvis, N.J., P.B. Leeds-Harrison, and J.M. Dosser. 1987. The Use of Tension Infiltrometers to Assess Routes and Rates of Infiltration in a Clay Soil. *Journal of Soil Science* 38(4): 633-640.
- Käll, L., Krogh, A., & Sonnhammer, E. L. L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction--the Phobius web server.. *Nucleic Acids Res.*, 35:429-432.
- Kargın, H. 2006. Mikroalg üretimi için fotobiyoreaktör tasarımları. *E. U. Journal of Fisheries, Aquatic Sciences*, 23(1/2): 327-332.
- Kaya Akkale, H.B., Soya, S., Akkale, C., Tanyolaç, M.B. 2010. Biyoteknoloji ve Biyoinformatik. Eds: Ahmet Yıldırım, Fevzi Bardakcı, Mehmet Karataş, Bahattin Tanyolaç. Moleküler Biyoloji, Genişletilmiş 2.Baskı 16.Bölüm. Ankara: Nobel Yayınevi s.313-345.

- King, K.R., J.T. Hollibaugh, and F. Azam. 1980. Predator-Prey Interactions between the Larvacean *Oikopleura dioica* and Bacterioplankton in Enclosed Water Columns. *Marine Biology* 56(1): 49–57.
- Knauff, Udo & Schulz, Margot & Scherer, Heinrich. 2003. Arylsulfatase activity in the rhizosphere and roots of different crop species. *European Journal of Agronomy*. 19: 215-223.
- Kõressaar, T., Lepamets, M., Kaplinski, L., Raime, K., Andreson, R., Remm, M. 2018. Primer3_masker: integrating masking of template sequence with primer design software. *Bioinformatics*, 34(11): 1937-1938.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., & Sonnhammer, E. L. 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, 305(3): 567-580.
- Kuriyama, H. Takano, H. Suzuki, L. Uchida, H. Kawano, S. Kuroiwa, H. Kuroiwa, T. 1999. Characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* zygote-specific cdnas that encode novel proteins containing ankyrin repeats and WW domains. *Plant Physiology*, 119(3): 873-884.
- Kurvari, V., Grishin, N.V., Snell, W.J. 1998. A gamete-specific, sex-limited homeodomain protein in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, 143(7): 1971-1980.
- Lee, J.H., Huawen, L., Sunjoo, J., and Ursula, G. 2008. Early Sexual Origins of Homeoprotein Heterodimerization and Evolution of the Plant KNOX/BELL Family. *Cell*, 133(5): 829–40.
- Lee, R. E. 2008. *Phycology*. Cambridge University Press, London, UK, pp: 561.
- Letunic, I., Doerks, T., Bork, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 40 (1): 302–305.
- Leustek, T. Martin, M. Bick, J.-A. Davies, J. 2000. Pathways and regulation of sulfur metabolism revealed through molecular and genetic studies. *Annual Review of Plant Biology and Plant Molecular Biology*, 51(1): 141–165.
- Lewis, M.A. 1995). Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environmental Pollution*, 87: 319-336.
- Lukatela, G., Krauss, N., Theis, K., Selmer, T., Gieselmann, V., von Figura, K., Saenger, W. 1998. Crystal structure of human arylsulfatase A: the aldehyde function and the metal ion at the active site suggest a novel mechanism for sulfate ester hydrolysis. *Biochemistry*. 17;37(11):3654-64.
- Madigan, T. M., Martinko, J. M. (2012) *Brock Biology of Microorganisms Kitabı* (Onbirinci baskı), Palme Yayıncılık, Ankara, 0-13-144329-1.
- Maroteaux, P., B. Leveque, J. Marie, and M. Lamy. 1963. A New Dysostosis With Urinary Elimination of Chondroitin Sulfate B. *Presse Med*. 25(71): 1849-1852
- Maruyama-Nakashita, A. 2017. Metabolic changes sustain the plant life in low-sulfur environments. *Current Opinion in Plant Biology*, 39: 144–151.
- Mendez-Alvarez, S., Leisinger, U., Eggen, R.I. 1999. Adaptive responses in *Chlamydomonas reinhardtii*. *International Microbiology*, 2(1): 15-22.

- Merchant, S.S. Prochnik S.E. Vallon O. Harris E.H. Karpowicz S.J. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848): 245-251.
- Meslet-Cladiere, L., and Vallon, O. 2011. Novel shuttle markers for nuclear transformation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 10: 1670-1678.
- Moazami, N. Ashori, A. Ranjbar, R. Tangestani, M. Eghtesadi, R. Nejad, A.S. 2012. Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, 39: 449-453.
- Neufeld, E., and J. Murnzer. 2001. The Mucopolysaccharidosis. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease.*, Eds. C. Scriver, A. Beaudet, and S. Sly. New York, McGraw-Hill, pp. 3421–3452.
- Neupert, J., Shao, N., Lu, Y., Bock, R., 2012. Genetic Transformation of the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Transgenic Plants*, pp. 35-47.
- Nielsen, M.N. and Winding, A. 2002. Microorganisms as Indicators of Soil Health. National Environmental Research Institute, Denmark, Technical Report No: 388.
- Nikiforova, V., Freitag, J., Kempa, S., Adamik, M., Hesse, H., & Hoefgen, R. 2003. Transcriptome analysis of sulfur depletion in *Arabidopsis thaliana*: Interlacing of biosynthetic pathways provides response specificity. *Plant Journal*, 33: 633–650.
- Norici, A. Hell, R. Giordano, M. 2005. Sulfur and primary production in aquatic environments: an ecological perspective. *Photosynth. Res.* 86: 409–417.
- Ohresser, M., Matagne, R. F., Loppes, R. 1997. Expression of the arylsulfatase reporter gene under the control of the nit 1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 31: 264-271.
- Özkan, Adem. 2013. Metakromatik Lökodistrofi: Üç Arilsülfataz A Mutasyonunun (p.307Glu→Lys, p.318Trp→Cys ve c.1165G Delesyonu) Arilsülfataz A Aktivitesi ve Arilsülfataz A Proteini Üzerine Etkisinin Tanımlanması. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1 s.
- Pankhurst, C.E., Doube, B.M., and Gupta, V.V.S.R. 1997. Biological indicators of soil health: synthesis. In: Pankhurst, C.E., Doube, B.M. and Gupta, V.V.S.R. (Eds), *Biological Indicators of Soil Health*. CAB International, UK, pp. 419-435.
- Pearson, W.R. and Lipman D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 4: 2444-2448.
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10): 785-786.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 1;29(9): 45.
- Polat, M. ve Karahan, A. 2009. Multidisipliner yeni bir bilim dalı: Biyoinformatik ve Tıpta Uygulamaları. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 16(3): 41-50.

- Pootakham W, González-Ballester D, Grossman AR. 2010. Identification and regulation of plasma membrane sulfate transporters in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* 153: 1653–1668.
- Punta, M., Coghill, P.C., Eberhardt, R.Y., Mistry, J., Tate, J., Boursnell, C., Pang, N., Forslund, K., Ceric, G., Clements, J., Heger, A., Holm, L., Sonnhammer, E.L., Eddy, S.R., Bateman, A., Finn, R.D. 2012. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 40(1):1 290–301.
- Quarmby, L. M. 1994. Signal transduction in the sexual life of *Chlamydomonas*. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, 35-51, Springer, Dordrecht.
- Saito K. 2004. Sulfur assimilatory metabolism. The long and smelling road. *Plant Physiol.* 136: 2443–2450.
- Saydam, A.C. ve Senyuv, H.Z. 2002. Deserts: Can They Be Potential Suppliers of Bioavailable Iron? *Geophysical Research Letters*, 29 (11): 191-193.
- Searls, D.B. 2000. Using bioinformatics in gene and drug discovery. *Drug Discovery Today*, 5(4):135-143.
- Selzer, P.M., Marhöfer, R.J. and Koch O. 2018. *Applied Bioinformatics: An Introduction*, Second Edition. Springer Nature, Heidelberg, German, 183p.
- Tunçer, M. ve Ay, H. 2019. *Uygulamalı Biyoinformatik Giriş İkinci Baskıdan Çeviri*. Palme Yayınevi, Ankara, 183.
- Sevgi, T. 2019. Rekombinant *Chlamydomonas reinhardtii* suşları kullanılarak ısı şok yanıtına bazı fiziksel ve kimyasal parametrelerin etkisinin araştırılması. Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bursa, 91 s.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., et al. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539.
- Sievers, T., Higgins, D.G., 2014. Clustal omega. *Current Protocols Bioinformatics*, 48(3.13), 1-16.
- Sigrist C.J., de Castro E., Cerutti L., Cuče B.A., Hulo N., Bridge A., Bougueleret L., Xenarios I. 2013. New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res*, 41: 344-347.
- Sönmez, M. 2014. Biyogübre uygulamalarının toprakta agregat oluşumu ve stabilitesi üzerine etkileri. Yüksek lisans tezi, Akdeniz Üniversitesi, Antalya, 3 s.
- Starckx, S. 2012. A place in the sun-algae is the crop of the future, according to researchers in Geel, Flanders Today. <http://www.flanderstoday.eu/content/place-sun-> [Son erişim tarihi: 22.04.2017].
- Stephens, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D, Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. and Hankamer, B. 2010. Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends Plant Science*, 15: 554-564.
- Strenkert, D., Schmollinger, S., Gallaher, S.D., Salomé, P.A., Purvine, S.O., Nicora, C.D., Mettler-Altmann, T., Soubeyrand, E., Weber, A.P.M., Lipton, M.S., Basset, G.J., Merchant, S.S. 2019. Multiomics resolution of molecular events

- during a day in the life of *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 116 (6) 2374-2383.
- Szivák, I., Behra, R., Sigg, L. 2009. Metal-induced reactive oxygen species production in *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 45(2): 427-435.
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. 1970. Factors Affecting Soil Arylsulfatase Activity. *Soil Science Society of America Journal*, 34(3): 427–29.
- Tabatabai, M. Ali, and Warren A. Dick. 1982. Soil Enzymes, Methods of soil analysis, part 2. Chemical and Microbiological properties. Agronomy Monograph No:9 (2nd ed.) ASA-SSSA. Madison, Wisconsin. USA, pp. 903-943.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., Hell, R. 2011. Sulfur Assimilation in Photosynthetic Organisms: Molecular Functions and Regulations of Transporters and Assimilatory Enzymes. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 157–184.
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., Hippler, M., Ferro, M., Bruley, C., Peltier, G., Vallon, O., Cournac, L. 2012. PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae. *Molecular Biology and Evolution*, 29(12): 3625–3639.
- Thao, T.Y., Linh, D., Si, V.C., Carter, T.W., & Hill, R.T. (2017). Isolation and Selection of Microalgal Strains from Natural Water Sources in Viet Nam with Potential for Edible Oil Production. *Marine drugs*, 15(7), 194.
- Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Vessey, J.K. 2003. Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Wang, C.Y., Fu, C.C., Liu, Y. C. 2007. Effects of using light-emitting diodes on the cultivation of *Spirulina platensis*. *Biochemical Engineering Journal*, 37(1): 21–25.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1): 57–63.
- Wilson, N. F., Foglesong, M. J., Snell, W. J. 1997. The *Chlamydomonas* mating type plus fertilization tubule, a prototypic cell fusion organelle: isolation, characterization, and in vitro adhesion to mating type minus gametes. *The Journal Of Cell Biology*, 137(7): 1537-1553.
- Wilson, N. F., O'Connell, J. S., Lu, M., Snell, W. J. 1999. Flagellar adhesion between mt+ and mt– *Chlamydomonas* gametes regulates phosphorylation of the mt+-specific homeodomain protein GSP1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48): 34383-34388.
- Wilson, N. F., Snell, W. J. 1998. Microvilli and cell-cell fusion during fertilization. *Trends in Cell Biology*, 8(3): 93-96.

- Xia, X. 2017. Bioinformatics and Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 17(15): 1709-1726.
- Yılmaz, Ö. 2018. Zeta-Cypermethrin insektisitinin *Chlamydomonas reinhardtii* (mikro yeşil alg) ve *Lemna minör* (su mercimeği) üzerine fitotoksik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Ordu Üniversitesi, Ordu, 138s.
- Zhao, F.J., Hawkesford, M.J., & McGrath, S.P. 1999. Sulphur assimilation and effects on yield and quality of wheat. *Journal of Cereal Science*, 30: 1–17.



ÖZGEÇMİŞ

FATMA SALARVAN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2019-2021	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji BD, Antalya
Lisans 2012-2017	Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Eskişehir