

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Chlamydomonas reinhardtii*'de BAZI FOSFATAZ VE FİTAZ PROTEİNLERİNİ
KODLAYAN GENLERİN FOSFAT EKSİKLİĞİ ALTINDAKİ EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ**

Gizem Hatice HAVUTCU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

TEMMUZ 2021

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Chlamydomonas reinhardtii*'de BAZI FOSFATAZ VE FİTAZ PROTEİNLERİNİ
KODLAYAN GENLERİN FOSFAT EKSİKLİĞİ ALTINDAKİ EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ**

Gizem Hatice HAVUTCU

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

TEMMUZ 2021

ANTALYA

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

***Chlamydomonas reinhardtii*'de BAZI FOSFATAZ VE FİTAZ PROTEİNLERİNİ
KODLAYAN GENLERİN FOSFAT EKSİKLİĞİ ALTINDAKİ EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ**

Gizem Hatice HAVUTCU

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2020-5308 nolu proje ile desteklenmiştir**

TEMMUZ 2021

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Chlamydomonas reinhardtii*'de BAZI FOSFATAZ VE FİTAZ PROTEİNLERİNİ
KODLAYAN GENLERİN FOSFAT EKSİKLİĞİ ALTINDAKİ EKSPRESYON
DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ**

Gizem Hatice HAVUTCU

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

Bu tez 07/07/2021 tarihinde jüri tarafından oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Doç. Dr. Arzu Ünal

Dr. Öğr. Üyesi Demir Özdemir

ÖZET

***Chlamydomonas reinhardtii*'de BAZI FOSFATAZ VE FİTAZ PROTEİNLERİNİ KODLAYAN GENLERİN FOSFAT EKSİKLİĞİ ALTINDAKİ EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN RT-PCR İLE BELİRLENMESİ**

Gizem Hatice HAVUTCU

Yüksek Lisans Tezi

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Temmuz 2021; 55 sayfa

Chlamydomonas reinhardtii moleküler biyolojide model organizma olarak kullanılmaktadır. Bu mikro algin doğal habitatı toprak ve tatlı su ortamlarıdır. Bildiğimiz kadarıyla literatürde *C. reinhardtii* genomunda metallofosfoesteraz (MPA) ve fitaz olarak anote edilen genlerin transkripsiyonu üzerine yapılan RT-PZR çalışması yoktur. Bu genler ziraat ve biyoteknoloji açısından önemli proteinleri kodlamaktadır. *C. reinhardtii* toprakta yaşadığı için salgıladığı bu enzimlerle topraktaki bitki besin maddelerinin bitkilere yararlı olması üzerine etki gösterebilir. Dolayısıyla model organizma olmasına ilaveten biyogübre olarak da kullanılabileceğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmanın amacı Phytozome veritabanında *C. reinhardtii* genomunda bulunan fosfataz (PHOX, PHOD ve PHO1) ve metallofosfoesteraz (MPA) genlerini tespit ederek olası peptidlerinin domain, motif, hücre içi lokalizasyon vb. analizlerini biyoinformatik araçlar kullanarak belirlemektir. Buna ilaveten bu genlerin gerçekte aktiviteye sahip olup olmadıklarının ve fosfat eksikliğine toleransda rol alıp almadıklarının daha iyi anlaşılabilmesi için mRNA düzeylerini deneysel olarak RT-PZR ile belirlemek ve bu genlerin fosfat eksikliği altında ekspresyonlarının değişip değişmediğini belirlemektir. RT-PZR sonuçları MPA ve fitaz olarak adlandırılan genlerin bazılarının transkripsiyonunda fosfat açlığı altında artış, bazılarında ise fazla bir değişiklik olmadığını göstermiştir. Bu sonuçların ışığı altında bu enzimlerin biyoteknolojide kullanılabilme olasılıkları tartışılarak gelecekteki uygulamalar için önerilerde bulunulmuştur. Çalışmada bu genler için geliştirdiğimiz primerler ve RT-PCR protokolleri ilerideki çalışmalarda bu genlerin ekspresyon analizleri için de kullanılabilecektir.

ANAHTAR KELİMELE: *Chlamydomonas reinhardtii*, Metallofosfoesteraz, Fitaz, Fostafaz, RT-PZR, Biyogübre

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Doç. Dr. Arzu Ünal

Dr. Öğr. Üyesi Demir Özdemir



ABSTRACT

DETERMINATION OF EXPRESSION LEVELS UNDER PHOSPHATE DEFICIENCY OF THE GENES ENCODING PHOSPHATASE AND PHYTHASE PROTEINS IN CHLAMYDOMONAS REINHARDTI BY RT-PCR

Gizem Hatice HAVUTCU

MSc Thesis in Agriculture Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Münever AKSOY

July 2021; 55 Pages

C. reinhardtii is used as a model organism in molecular biology. The natural habitat of this microalgae is soil and freshwater environments. To the best of our knowledge, there is no RT-qPCR study on the transcription of *C. reinhardtii* metallophosphoesterase and phytase genes in the literature. The study we are planning will be the first study to be done on these genes. These genes encode proteins important for agriculture. Since *C. reinhardtii* lives in the soil, we think that these enzymes will have an effect on the plant nutrients in the soil. Therefore, in addition to being a model organism, this organism can also be used directly as biofertilizer. Our aim in Phytozome is to analyze the predictive peptides of phosphatase (PHOX, PHOD and PHO1) and metallophosphoesterase (MPA) genes in the *C. reinhardtii* genome by domain, motif, intracellular localization, using bioinformatics. In order to better understand whether these genes are active and whether they play a role in the tolerance to phosphate deficiency, mRNA levels are analyzed by RT-PCR. RT-PCR analysis showed that some of these genes are upregulated under phosphate deficiency. In light of these results future biotechnological applications are discussed. The primers and RT-PCR protocols we will develop for these genes in the study can be used in future studies for analyzing the expression of these genes.

KEYWORDS: *Chlamydomonas reinhardtii*, Phytase, Metallophosphoesterase, Phosphatase, RT-PCR, Biofertilizer

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Assoc. Prof. Dr. Arzu Ünal

Asst. Prof. Dr. Demir Özdemir

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışması süresince hiçbir desteğini esirgemeyen, hep yanımda olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'a, teşekkürü borç bilirim.

Yüksek öğretimimde hayatıma giren, maddi ve manevi her zaman yanımda olan çok değerli dostlarım Tuğçe YAYLA, Seval ŞENÇOPUR ve Yasemin ÖZE'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim süremde aynı laboratuarda birlikte çalışma şansı bulduğum Fatma SALARVAN'a deneyler sırasındaki yardımları ve desteğinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, tüm zorlukların üstesinden gelebilmemi sağlayan, daha ileri gidebilmem için beni cesaretlendirip yol gösteren, akademik kariyerim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, kıymetli babam İbrahim HAVUTCU' ya annem Ümmü HAVUTCU' ya ve kardeşim Tefik Samet HAVUTCU' ya teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	iv
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ve Biyoteknolojideki Önemi	2
2. KAYNAK TARAMASI	3
2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ’ nin Taksonomisi ve Hücresel Yapısı	3
2.2. Fosfatazlar	5
2.3. Fitazlar.....	5
2.4. Fostafaz ve Fitaz Enzimleri Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar	7
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Biyoinformatik Analizler	10
3.1.1. Fosfataz ve fitaz proteinlerin domain analizi.....	10
3.1.2. Hücre içi lokalizasyon analizi.....	10
3.1.3. Moleküler ağırlık analizi.....	10
3.1.4. Signal peptid analizi	10
3.1.5. MPA (Metallofosfoesteraz) proteinlerinin motif analizi ve hizalama analizi.....	10
3.1.6. Moleküler filogenetik analizi.....	10
3.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Fosfat Açlığına Maruz Bırakılması	10
3.2.1. Hücre sayımı.....	11
3.2.2. Hücre kültüründe kullanılan TAP besi yeri içeriği ve solüsyonlar.....	12
3.3. RNA İzolasyonu ve Kuantifikasyonu:	14
3.3.1. RNA kalitesinin agaroz jel ile kontrol edilmesi	15
3.3.2. RNA miktarının Nanodrop ile belirlenmesi	15
3.4. Revers Transkripsiyon (RT) ile cDNA Elde Edilmesi.....	15
3.5. Primer Dizaynı	16

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	17
3.7. PZR ve RT-PZR Ürünlerinin Agoroz Jelde Yürütülmesi	19
3.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. Biyonformatik Analiz Sonuçları	21
4.1.1. Fosfataz ve fitaz (Metallofosfoesteraz) olduğu düşünülen proteinlerin domain analizi	21
4.1.2. Fitaz olduğu düşünülen (Metallofosfoesteraz) proteinlerinin motif hizalama analizi	23
4.1.3. Fosfataz ve fitaz olduğu düşünülen proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu analizi	24
4.1.4. Moleküler filogenetik analiz sonucu	25
4.2. RT-PZR Sonuçları	26
4.2.1. Akalen fosfataz ve metallofosfoesteraz genlerinin fosfat açlığı altında ekspresyon düzeylerinin RT-PZR ile belirlenmesi	26
4.2.2. Metallofosfoesteraz genlerinin sülfat açlığı altında ekspresyon düzeylerinin RT-PZR ile belirlenmesi	31
5. SONUÇLAR	34
6. KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas reinhardtii*’de Bazı Fosfataz ve Fitaz Proteinlerini Kodlayan Genlerin Fosfat Eksikliği Altındaki Ekspresyon Düzeylerinin RT-PCR 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.

07/07/2021

Gizem Hatice HAVUTCU

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
∞	: Sonsuz
V	: Volt
µm	: Mikrometre

Kisaltmalar

ALP	: Alkalen Fosfataz
Bp	: Baz Çifti
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
ddH ₂ O	: Çift Distile Su
dH ₂ O	: Distile Su
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamin Tetra Asetik Asit
g	: Gram
Kb	: Kilobaz
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MPA	: Metallofosfoesteraz
ng	: Nanogram

PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribo Nükleik Asit
Rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PZR	: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	: Tris-Asetik Asit-Edta
Tm	: Erime Sıcaklığı



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>C. reinhardtii</i> 'nin hücre yapısının şematik olarak gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Fitik asit yapısı.....	6
Şekil 2.3. Fitaz enziminin hidroliz reaksiyonu	7
Şekil 3.1. Hücre Kültürü TAP besi ortamından alınan örnekler.....	11
Şekil 3.2. Fosfat açlığının başlatılması ve örneklerin toplanması	11
Şekil 3.3. RT-PZR ve PZR analiz çalışması	19
Şekil 4.1. PHOX , PHOD ve İkinci PHOD proteinlerinin domain analizi	21
Şekil 4.2. MPA (metallofosfoesteraz) proteinlerinin domain analizi	22
Şekil 4.3. Phytozome veri tabanından elde edilmiş korunmuş fosfoesteraz alanlarının sekansların hizalaması.....	24
Şekil 4.4. Moleküler filojeni analizi	26
Şekil 4.5. 1. ve 2. kültür fosfat açlığında gen ekspresyon analizi	29
Şekil 4.6. 3. kültür fosfat açlığında gen ekspresyon analizi	30
Şekil 4.7. Sülfat açlığında gen ekspresyon analizi.....	31

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. 1 L için TAP ortamı	12
Çizelge 3.2. Fosfat içermeyen TAP sıvı besi ortamı	12
Çizelge 3.3. PZR’da kullanılan primerler	16
Çizelge 3.4. RT-PZR bileşenleri	18
Çizelge 3.5. RT-PZR analizi protokolü	18
Çizelge 3.6. Cihaz listesi ve kullanım amaçları	20
Çizelge 4.1. Fosfataz ve Fitaz olduğu düşünülen proteinlerin analizleri	32
Çizelge 4.2. Fosfataz ve Fitaz genlerinin ekspresyon sonuçları özeti	33

1. GİRİŞ

Dünyada artan nüfus ile birlikte tarım yapılabilecek arazilerde giderek azalmaktadır ve gıda üretimine olan ihtiyaç artmış olup birim alandan daha fazla ürün elde etmek zorunda kalınmıştır. Bu amaçla da kimyasal gübre kullanımı oldukça artmıştır. Tarım alanlarındaki bu yoğun kimyasal kullanımı, verim ve üretimi artırmış fakat sürdürülebilir toprak verimliliği ile birlikte doğal dengenin bozularak tehlikeye girmesine sebep olmuştur. Sonuçta da başta gelir düzeyi yüksek ülkelerde olmak üzere birçok ülkede üretici ve tüketiciler insanlarda toksik etki yaratmayan ve doğayı tahrip etmeyen yöntemlerle üretilen tarımsal ürünleri tercih etmeye başlamışlardır (Özdemir 2014).

Toprağa uygulanan kimyasal gübrelerin büyük bir kısmı bitkiler tarafından alınamamaktadır ve zamanla yağışlar ile yıkanarak taban suyuna karışıp yer altı sularını da kirletmektedir (Sharma vd. 2013). Bu hem ekonomik kayba sebep olmakta hem de çevreye zarar vermektedir. Biyogübre kullanımının bu sorunun çözümü için etkili olabileceği düşünülmektedir; biyogübreler toprakta alınamaz formda olan besin maddelerini alınabilir forma dönüştürmektedir (Alori vd. 2017; Liu vd. 2018).

Fosfat bitki büyümesi için gerekli bir makro elementtir. Ülkemiz toprakları genellikle kireçli olduğundan uygulanan gübrenin içerdiği fosforun toprakta fiksasyonu sonucu bitki tarafından kullanımı kısıtlanmaktadır (Aydın 1988). Toprakta fosfor kalsiyum, demir ve Al fosfatlar, apatit ve fitik asit şeklinde bulunur.

Biyogübreler bakteri, maya, mikroalg ve fungus türü mikroorganizmalardır. Biyogübreler azot fiksasyonu, fosfat çözme gibi aktiviteleri sayesinde bitki beslenmesine pozitif etki gösterirler. Toprağa enzimler salgılayarak bitkiler tarafından alınamaz formda olan besin maddelerinin çözünümünü sağlarlar ve böylece bitki beslenmesine pozitif etki gösterirler. Bu enzimlerden fosfataz ve fitaz enzimleri, fosfatı diğer moleküllerden hidrolize ederek bitki tarafından alınabilir forma getirirler. Fitaz enzimi spesifik olarak fitik asitteki fosfatı hidrolize ederek fosfatı alınabilir forma getirir. Fitaz aktivitesi olan bakteriler doğadan izole edilmekte ve biyogübre etkinlikleri araştırılmaktadır (Kumar vd. 2013; Liu vd. 2018). Domuz, kümes hayvanları ve balıklar gibi tek mideli hayvanların midelerinde fitaz enziminin düşük olması, fitaz enziminin kullanımıyla yemlerdeki fitik asiti metabolize ederek fosfatın dışkı ile atılımının ve çevreye etkilerini azaltır. Hayvanların bünyelerinde bulundurdıkları fosfatı büyüme, üreme ve kemiklerin kalsilasyonunda 16 gerekli mineraller ile birlikte kullanırlar. Doğaya bırakılan fosfor miktarının artması kokuya ve çevre için potansiyel bir tehlike doğurmaktadır (Zhao ve X.Qu, 2006). Fitat bulunan ortama fitaz ilavesiyle fitatın hidroliz oluşu ve minerallerin serbest kalmasıyla canlıların minerallerden yararlanmasını arttırmak amaç edilmiştir (Vohra vd. 2003). Bu yüzden biyogübre olarak kullanılabilecek mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu önem taşımaktadır. *C. reinhardtii* biyogübre olarak kullanılabilecek bir organizmadır ve biyogübre potansiyelinin araştırılması gerekmektedir.

Yukarıda anlatıldığı gibi organik tarımda sınırlı olan gübreler konusunda yapılan alternatif arayışlar, alglerin biyogübre olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Tunç 2015). Toprağa uygulanan kimyasal gübrelerin büyük bir bölümü bitkiler tarafından

kullanılamamaktadır. Toprakta bulunan mikroorganizmalar tarafından salgılanan enzimler toprakta bulunan besin maddelerini bitkiler için alınabilir forma geçirebilmektedir. *C. reinhardtii* toprakta yaşayan bir yeşil mikroalg türüdür. Bu mikroalg ve diğer toprak mikroorganizmaları tarafından salgılanan enzimler tarımsal çalışmalar için önem taşımaktadır. Bu genlerin fonksiyonlarının araştırılması önem taşımaktadır.

1.1. *Chlamydomonas reinhardtii* ve Biyoteknolojideki Önemi

C. reinhardtii toprakta ve tatlı su ortamlarında bulunan tek hücreli bir yeşil alg (Chlorophyta) türüdür (Harris vd. 2009). Moleküler biyoloji alanında birçok biyolojik olayın; örnek olarak fotosentez, kamçı yapısı ve işlevi, hücre bölünmesi gibi konuların araştırılmasında model organizma olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda biyodizel araştırmalarında da kullanılmıştır (Wang vd. 2009). *C. reinhardtii* besin eksikliğine toleransının araştırılmasında da model organizma olarak kullanılmaktadır. *C. reinhardtii* demir (Fe), azot (N), fosfor (P) ve sülfür (S) eksikliği dahil olmak üzere, besin yoksunluğu altında fotosentetik ökaryotların tepkilerini araştırmak için güçlü bir model organizma olmuştur (Gonzalez-Ballester vd. 2010; Aksoy vd. 2013). Bu organizma besin eksikliği altında hücre dışına enzimler salgılayarak alınamaz formdaki besin maddelerini alınabilir hale getirebilmektedir; sülfat eksikliği altında arilsülfataz (ARS) ve fosfat eksikliği altında alkalın fosfataz (PHOX) gibi (Quisel vd. 1996; Moseley vd. 2009; Aksoy vd. 2014). Bu enzim aktivitelerinden dolayı biyogübre olarak kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

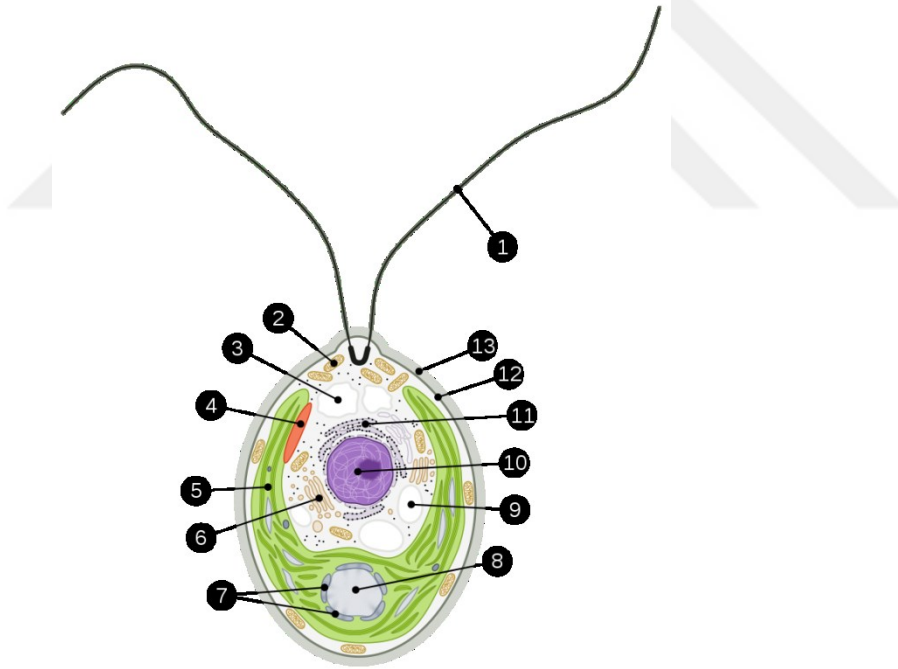
C. reinhardtii tarımda kullanılan kimyasal gübreler ile birlikte kullanılarak daha ucuz ve çevre sağlığına zarar vermeyen bir uygulama olabilir. Ancak dünyada ve ülkemizde mikroalglerin biyogübre olarak kullanılması bakteriler ile ilgili yapılan çalışmalarla karşılaştırılınca sınırlı sayıda ve dar kapsamlıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda Chlorophyta üyesi olan yüksek protein içeriğine sahip *Chlorella vulgaris* biyogübre olarak kullanılmış ve başarılı olmuştur (Özdemir 2014; Özdemir vd. 2016; Tunç 2015). *C. reinhardtii* bu alanda çalışılmamış olup *C. vulgaris*'ten daha başarılı olacağı düşünülmektedir. Dolayısıyla model organizma olmasına ilaveten ziraatte kendisi direk biyogübre olarak da kullanılabilir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Chlamydomonas reinhardtii*'nin Taksonomisi ve Hücresel Yapısı

- ❖ **Domain:** Eukaryota
- ❖ **Alem:** Plantae
- ❖ **Şube:** Chlorophyta
- ❖ **Sınıf:** Chlorophyceae
- ❖ **Takım:** Chlamydomonadales
- ❖ **Aile:** Chlamydomonadaceae
- ❖ **Cins:** *Chlamydomonas* Ehrenberg
- ❖ **Tür:** *Chlamydomonas reinhardtii*

Chlamydomonas tuzlu ve tatlı sulara yaşayabilen yaklaşık 500 türü olan tek hücreli hareketli mikroalglerdir. Hücreleri genel olarak oval, küresel yada dikdörtgen şekilli olabilir. *Chlamydomonas* türlerinin çevresel değişikliklere adaptasyonları yüksek olup farklı ortamlara hızlıca alışıp yaşamlarını sürdürebilirler. Laboratuvarlarda hızlı ve maliyeti düşük besi ortamlarında hızlı ve kolay üretilme imkanı sağlarlar. (Harris vd. 2009). Laboratuvar en yaygın kullanılan tür *C. reinhardtii*'dir.



Şekil 2.1. *C. reinhardtii*'nin hücre yapısının şematik olarak gösterimi: 1) Kamçı ; 2) Mitokondri; 3) Kontraktıl vakuol; 4) Göz cisimciği (eye spot); 5) Kloroplast; 6) Golgi cisimciği; 7) Nişasta granülleri; 8) Pirenoid; 9) Vakuol; 10) Çekirdek; 11) Endoplazmik retikulum; 12) Hücre zarı; 13) Hücre duvarı belirtilmektedir (http://cellimagelibrary.org/images/CIL_37252 17.02.21)

Günümüze ait *C. reinhardtii* ana laboratuvar suşlarının, 1945'te Gilbert Morgan Smith tarafından Amherst, Massachusetts yakınlarındaki elde edilen topraklardan hazırlanan izolatlardan kaynaklandığı bilinmektedir (Harris 2001). *C.reinhardtii* tek

hücreli bir yeşil alg (Chlorophyta) türüdür. Bu algler dünyanın her yerinde, toprakta, tatlı suda, okyanuslarda ve hatta dağ tepelerinde karda bulunur. Bu cinsteki algler, bir hücre duvarı, bir kloroplast, ışığı algılayan bir göze (eye spot) sahiptir ve iki ön kamçı sayesinde yüzebilirler. Yirminci yüzyılın ortalarında, tek hücreli ve genetik olarak izlenebilir, yeşil bir alg olan *C. reinhardtii* fotosentez, ışık algısı ve flagella yapısı, fonksiyonel ve biyolojik temel hücresel süreçleri aydınlatmak için model organizma olarak geliştirilmiştir. *C. reinhardtii*, tek karbon kaynağı olarak asetatı kullanması nedeniyle *Chlamydomonas*'ın baskın laboratuvar türü olarak kullanılmaktadır. Bu türün hücreleri haploiddir ve enerji sağlamak için fotosentez kullanarak basit bir inorganik tuz ortamında büyüebilir. Alternatif bir karbon kaynağı olarak asetat sağlanırsa, karanlıkta da büyüebilirler. Azottan yoksun bırakıldığında, mavi ışığın varlığında, haploid hücreler, isojenik gametlere farklılaşır. İki çiftleşme türü (*artı* ve *eksi* olarak ifade edilen mating type), kromozom 6'da bulunan tek bir lokus (*mt*) tarafından kontrol edilir ve Mendel kalıtımı gösterir (Harris vd. 2009). Zıt eşleşme türlerinin gametleri karıştırıldığında, olumsuz çevresel koşullardan koruyan sert bir dış duvar oluşturan diploid bir zigot (zygospor) haline gelir. Koşullar düzeldiğinde (ya da azot içeren kültür ortamına geri döndürüldüklerinde ve ışık ve su sağladığında), diploid zigot mayoz bölünmeye gider ve vejetatif yaşam döngüsünü sürdüren dört haploid hücreyi serbest bırakır (Harris vd. 2009). Dört farklı mayoz ürününü ayırmak için rutin yöntemler mevcuttur; tetrad analizlerinin yapılabilmesi *C. reinhardtii*'nin genetik araştırmalarda güçlü bir model organizma olarak kullanılmasının temel sebeplerindendir. *C. reinhardtii*'nin eşeyli üreme döngüsü aşağıdaki maddelerle özetlenebilir;

- ❖ Gametogenez
- ❖ Aglütinasyon
- ❖ Çift oluşumu ve sinyal iletimi
- ❖ Hücre duvarı lizisi
- ❖ Birleşme yapılarının aktivasyonu
- ❖ Hücre füzyonu
- ❖ Zigospor oluşumu, olgunlaşması ve çimlenmesi (Harris vd. 2009).

Daha önce yapılan çalışmalarda Chlorophyta üyesi olan yüksek protein içeriğine sahip *Chlorella vulgaris* kullanılmış ve başarılı olmuştur. *C. reinhardtii* bu alanda çalışılmamış olup *C. vulgaris*'ten daha başarılı olacağı düşünülmektedir. Çünkü *C. reinhardtii* S-yetersiz ve S-tükenmiş koşullar altında arilsülfataz (ARS) aktivitesi gösterir. Fosfat eksikliğinde ise fosfataz salgılamaktadır. Tek hücreli yeşil alg *C. reinhardtii* demir, azot (N), fosfor (P) ve S için yoksunluk dahil olmak üzere, besin yoksunluğu altında fotosentetik ökaryotların tepkilerini araştırmak için güçlü bir model organizma olmuştur (Aksoy vd. 2013).

2.2. Fosfatazlar

Bitki büyümesi ve gelişimi çok çeşitli mikro ve makro besin elementleri gerektirir ve fosfor (P) bitki büyümesi ve gelişimi için gerekli olan temel bir makro besin elementidir. Fosfor (P), bitki büyümesi için gerekli olan önemli bir besindir ve topraktaki yönetimi, çevre üzerinde minimum etkiye sahip, sürdürülebilir ve karlı tarımın sağlanması için kritik öneme sahiptir. Topraklar büyük miktarda toplam P içerebilse de, bitkilerin yalnızca küçük bir kısmı hemen kullanılabilir (Richardson vd. 2009). Öncelikle bitkiler olmak üzere tüm tarım için önemi yüksek olan fosforun temel kaynağı topraktaki fosfattır (Aydeniz 1972). Biyosferde P, çoğu organizma için inorganik fosfat (Pi) formunda biyolojik olarak bulunur, ancak konsantrasyonu, özellikle metal katyonları ve organik partiküller ile kompleksleşme nedeniyle genellikle çok sınırlıdır (Bajhaiya vd. 2016). Bu sınırlı kullanılabilirlikle başa çıkmak için, bitkiler ve mikro algler, P'nin daha iyi edinilmesini ve korunmasını kolaylaştırmak ve P açlık koşullarında hayatta kalmaya izin vermek için uyarlanabilir mekanizmalar geliştirmiştir (Moseley ve Grossman 2009).

Bitkiler ve fotosentetik olmayan mikroorganizmalar gibi, çoğu alg P-açlığına yanıt olarak bir dizi fosfatazi sentezler. Mikrobiyal kökenli yüksek seviyelerde fosfataz / fitaz aktiviteleri rizosfer de bulunur ve bu aktivitenin çoğu P açlığına yanıt olarak sentezlenir (Grossman ve Aksoy 2015).

Alkalen fosfatazin da içinde bulunduğu fosfomonoesterazlar, düşük molekül ağırlıklı asit fosfatazlar, yüksek molekül ağırlıklı asit fosfatazlar, protein fosfatazlar ve mor asit fosfatazlar olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır (Çelik vd. 2017).

Fosfataz hidrolizi P-esterler ve çevreye salgılandıklarında bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından alınması ve asimilasyon için organik -P'den Pi'yi serbest bırakabilir. Fosfataz enzimleri birçok mikroorganizma tarafından bitki köklerinde üretilir. Alkalen fosfatazlar (ALP) ve asit fosfatazlar ve bu enzimleri kodlayan genler birçok organizmadan izole edilmiştir. Alkalen fosfatazları kodlayan genler, Arabidopsis sucul makrofit Spirodels oligorrhiza ve birçok mahsul bitkisini içeren bitkilerden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Grossman ve Aksoy 2015).

ALP enzimi (EC: 3.1.3.1) yüksek pH'larda farklı fosfat türlerinin fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen hücre zarında bulunan glikoprotein özellikli bir enzimdir. Magnezyum, mangan ve kobalt gibi iyonlar alkalen fosfatazi aktive eder. Kalsiyum ve inorganik fosfat inhibe ederken çinko yapısal rol oynar (Akça vd. 2010).

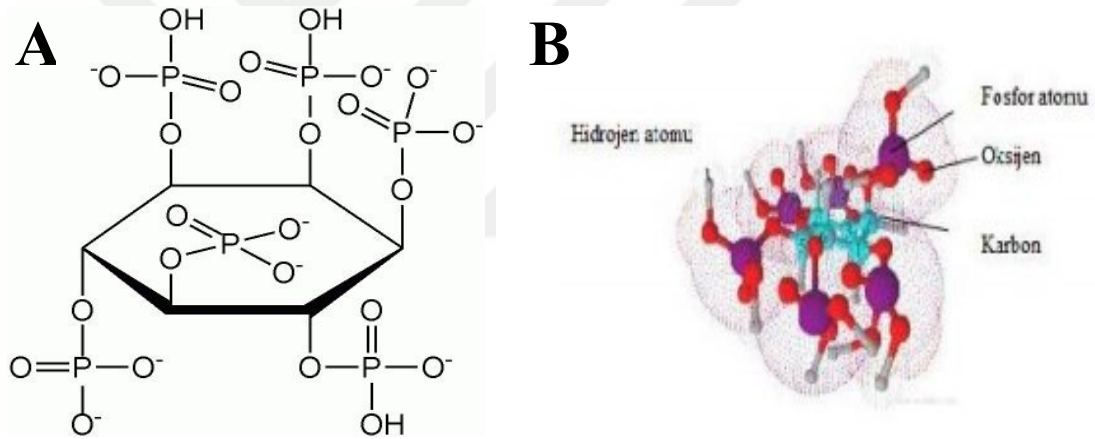
2.3. Fitazlar

Fitik asit ilk olarak 1855 ve 1856 senelerinde Hartig ve arkadaşları tarafından çeşitli bitki tohumlarından nişasta içermeyen ve küçük parçalar olarak izole edilmiştir (Erkan 2014). İlerleyen senelerde araştırmacılar fitik asiti küresel formda izole edilmiş kimyasal yapısının karbon, fosfor ve metal iyonlarından oluştuğunu ortaya çıkarmıştır.

1987 senesinde Winterstein fitik asite ‘inositol- fosforik asit’ demiştir. 1968 senesinde de IUPAC-IUB tarafından günümüzde kullanılan ‘ Miyo-inositol 1, 2, 3, 4, 5, 6, hezkakis dihidrojen fosfat’ olarak isimlendirilmiştir (Erkan 2014).

Fitik asit (fitat) bitki hücresinde fosforun depo şeklidir. Başta buğday olmak üzere pirinç, arpa, çavdar gibi tahıllarda ve çeşitli tohumlarda bulunan organik bir bileşiktir.. Fitik asite miyo-inositol hekzaforik asit (hekzaforat) denilmektedir. Fitik asitin günümüzde kabul görmüş şekli miyo-inositol hekzaforat yapısıdır (Maga 1982). Fitik asit merkez inositol halkasının etrafında bulunan 6 fosfat grubundan oluşup geniş pH aralığında negatif yüklü bir iyondur Şekil 2.2. A ve B’ de gösterilmiştir (Berikten ve Kıvanç 2018).

Fitik asit yüksek oranda fosfor içerir ve başta baklagil ve tahıllar olmak üzere fosforun en önemli depo şeklidir (Şat ve Keleş 2004). Tohumlarda bulunan fosforun % 60’ dan fazlasının temel kaynağı fitik asittir (Berikten ve Kıvanç 2018). Fitik asit bitkilerle beslenen hayvanların doğal temel fosfor kaynağıdır ancak inositol molekülünden fosfat’ı uzaklaştırılmadıkça bu fosfor kullanılamaz. Uzaklaştırma ise besinlerde bulunan fosfataz yada fitaz enzimi tarafından gerçekleştirilir (Şat ve Keleş 2004).

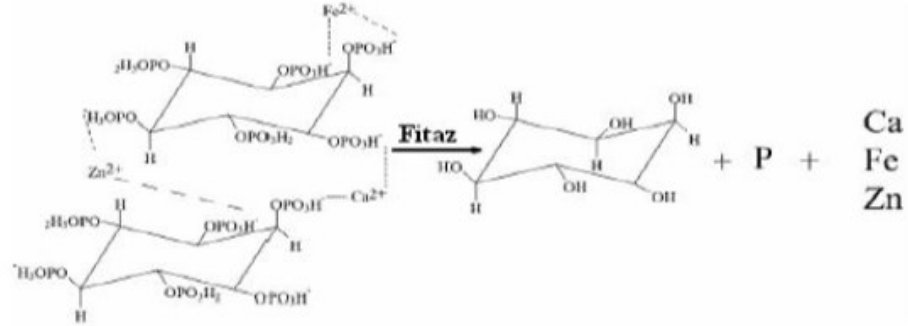


Şekil 2.2. Fitik asit yapısı **A:** Fitik asitin moleküler yapısı (Vucenik vd. 2005) **B:** Fitik asitin atom yapısı (Berikten ve Kıvanç 2018) gösterilmiştir

Fitaz enzimi fitik asitten fosforu ayırmaya yarayan bir enzimdir. Gelişmekte olan ülkelerde izlenen yol, tahıl ve tohumların fermantasyonu ile fosforun kullanım şeklini arttırmaktır. Birçok bakteri fitaz enzimini aktif hale getirir. Laktik asit bakterileri tahıl ve tohumların fermantasyonu ile, fitat molekülü parçalanarak minerallerin kullanılabilirliği (biyo aktivitesini) artırılmıştır (Vucenik vd. 2005).

Fitazlar (EC 3.1.3.8./ EC 3.1.3.26), fitik asitten fosfomonoester bağlarını hidrolize eden ve inorganik ortofosfatları serbest bırakan enzimlerdir (Şekil 2.3.) (Erkan 2014).Fitazların sayısı son yıllarda giderek artmaktadır. Bir enzimin fitaz olabilmesi için fosfataz aktivitesi göstermesi gerekmektedir.

Fitaz enzimlerinin hepsi yapısal olarak benzer değildir ve hepsi aynı mekanizma ile fosfat gruplarını fitik asitten ayırmaz (Mullaney ve Ullah 2003).



Şekil 2.3. Fitaz enziminin hidroliz reaksiyonu. Fitik asitin fitaz enzimi ile inositol, fosfat ve diğer elementlere hidrolizi (Berikten ve Kıvanç 2018)

Fitaz enzimleri uygun pH'larına göre alkali veya asit, katalitik işlevlerine göre histidin asit fosfatazlar (HAF), β -pervane fitazlar (BPFhy), sistein fosfatazlar (SF), veya mor asit fosfataz (MAF) olarak dört grupta incelenmektedir.

HAF'lar fitazların en çok bilinen grubudur. HAF'ların tüm üyeleri hem ortak bir aktif bölge motifi (RHGXRRP) hem de fosfomonoesterleri hidrolize eden iki aşamalı yapıya sahiptirler. Bu gruptaki fitazların aktif bölgesi 3 boyutlu katlanmalar esnasında amino asit dizisinin C ve N uçlarının bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu uçlar bir araya gelerek bir tane katalitik uç oluştururlar ve fosfomonoesterlerin hidrolizini iki adımda başlatır (Berikten ve Kıvanç 2018; Erkan 2014).

β -pervane fitazlar (BPFhy) ise HAF'ların tersine substratını hidrolize etmek için yeni bir mekanizmaya sahip oldukları keşfedilmiş bir fitaz sınıfıdır. Molekülün üç boyutlu yapısı beş-altı yapraklı pervaneye benzer ve ismini buradan almıştır (Mullaney ve Ullah 2003).

Mor asit fosfataz (MAF), bütün üyeleri spesifik 7 metal-ligand amino asiti barındıran metallofosfoesteraz grubundadırlar. Bitki, hayvan, mantar ve bakterilerde bulunan fosfataz grubudur (Berikten ve Kıvanç 2018).

Sistein fosfatazlar (SF) ise , anaerobik rumen bakterisi olan *Selenomonas ruminantium*'un barındırdığı fitaz sistein fitaz sınıfındadır. Bu sınıftaki fitazların temel özelliği aktif bölgelerinin substrat spesifikliği sağlayan geniş ve derin bir cep halinde bulunmasıdır. Bu cep fitik asitin fosforillenmiş olan inositol gruplarını içine almaktadır (Berikten ve Kıvanç 2018).

2.4. Fostafaz ve Fitaz Enzimleri Hakkında Yapılan Bazı Çalışmalar

Aydeniz 1972 yılında bitki besin elementlerinin önemini vurgulayarak fosfatın tarım için öneminden bahsetmiştir. Bitkiler olmak üzere tüm tarım için önemi yüksek olan fosforun temel kaynağı topraktaki fosfat olduğunu savunmuştur (Aydeniz 1972).

Erkek ve Ünlü 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada son yıllarda yem katkı maddelerinden olan enzimlerin hayvansal üretimde kullanımı giderek yaygınlaştığını ve bu enzimlerden biri olan fitazın, yem hammaddelerinin yapısında var olan ve basit

mideli hayvanlar tarafından yeterince yararlanılamayan fitik asidi hidrolize ederek mineraller ile protein-amino asit ve nişastanın sindirimine olanak sağladığını vurgulamışlardır (Erkek ve Unlu 2003). Enzim ilavesi ile yemdeki besin maddelerinden yararlanmanın artması ekonomik açıdan olduğu gibi hayvansal gübrelerden kaynaklanan kirliliğinde azalması bakımından yararlı olacağından bahsetmişlerdir. Kümes hayvanlarının karma yemlerinin önemli bir kısmını dane yemler ve küspelerden oluşmakta ve bu yemlerdeki toplam fosforun büyük bir kısmı da fitin fosforu şeklinde olup bileşiği hidrolize eden fitaz enzimi bu hayvanların sindirim sisteminde çok az veya hiç üretilmemektedir. Yem hammaddelerindeki fitin fosforundan basit mideli hayvanların etkin bir şekilde yararlanamaması nedeni ile bu besin maddesi gübre ile dışarıya atılmaktadır. Bu durum ise çevreyi özellikle yer altı ve üstü su kaynaklarını fosfor yönünden tehlikeli ölçüde zenginleştirmektedir. Ayrıca hayvanların değerlendiremedikleri fitin fosforu yerine karmalara inorganik fosfor kaynakları ilave edilmekte bu da üretim maliyetlerini arttırmaktadır. Ayrıca bitkisel fitatların sindirilebilirliğinin düşük oluşunun protein ve mineral sindirimine de olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Mikrobiyal fitaz kaynaklarının karmalara ilavesine dayanan enzim teknolojisindeki gelişmeler karmalardaki fitatların sindirimine olanak sağlamaktadır. Yapılan çalışma ile fitaz enzimi, işleyiş mekanizması ve etlik piliçlerde bazı mineral maddelerden yararlanmaya olan etkileri üzerindedir. Sonuç olarak ise kanatlı karmalarında kullanılan yem hammaddeleri yüksek seviyede fitat içermekte ve bu durum sadece fosforun yararlanılabilirliğini değil fitik asitin bağladığı tüm mineral, protein ve nişastanın yararlanılabilirliğini düşürmektedir. Ancak karmalara yapılan mikrobiyal fitaz ilavesi fitik asitin bağ kurduğu bütün besin maddelerinden hayvanların daha fazla yararlanmasına imkan sağlayarak hem üretim maliyetlerinin belli bir ölçüde düşmesini sağlamakta hem de hayvansal gübrelerden kaynaklanan fosfor kirliliğinin azalmasına yardımcı olmaktadır.

Şat ve Keleş 2004 yılında yaptıkları çalışma fitik asit ve beslenmeye etkisi üzerinedir. Fitik asit gıdaların fonksiyonel ve besin içeriği özellikleri üzerinde büyük önem taşımaktadır. Fitik asit gıdalarda yalnız bağımsız olarak bulunur ve farklı bileşiklerle tüketilmektedir. Fitatlar posa, mineraller, iz elementleri ve diğer mikro maddelerle bitkisel matriks içinde bileşik oluşturmaktadır. Fitik asidin parçalanma ürünlerinden birkaçı mineral emilimini inhibe eden ve bazıları sağlığa olumlu etkisi olan ürünlerdir. Fitik asidin kontrollü olarak parçalanmasıyla istenilen sağlığa yararlı spesifik ürünlerin oluşturulması fitik asidin faydalı ya da zararlı etkilerinin aydınlatılmasını sağlamıştır.

Deniz (2014), tarafından yapılmış olan çalışmada kanatlı hayvanların rasyonları üzerinde fitaz enziminin etkisini araştırmıştır. Kanatlı hayvanların rasyonları üzerinde büyük oranda bitkisel kökenli yem maddelerinden oluştuğunu ve yem maddelerindeki toplam fosforun önemli bir bölümü (% 60-80) kanatlı hayvanlar tarafından yeterince yararlanılamayan fitik asite bağlı fitat fosforu formundadır. Fitik asit fosforundan yararlanma, fitatların kaynağı, kanatlının yaşı, rasyondaki kalsiyum ve vitamin D3 düzeylerine bağlı olarak % 0-50 oranları arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Fitik asit güçlü şelat oluşturma özelliği sayesinde; fosforun yanında yem maddelerindeki önemli besinleri de (kalsiyum, çinko, bakır) bağlayarak, bu maddelerin kanatlı hayvanlar tarafından kullanımını azaltmakta ya da tamamen engel olmaktadır. Fitik asit ayrıca yem maddelerindeki protein ve karbonhidratları da

bağlayarak kanatlıının bu besin maddelerinden yararlanmasını azaltmaktadır. Hem endojen hem de eksojen kaynaklı fitaz enzimi; fitatları inositol ve inorganik fosfora ayırarak, fitatların antinutrisyonel işlevini ortadan kaldırmaktadır. Endojen fitaz enziminin konsantrasyonu genç kanatlı hayvanlarda düşük olup, yaşlı kanatlı hayvanlarda ise enzim aktivitesinde artış olmaktadır. Eksojen kaynaklı fitaz enziminin rasyonlara ilavesiyle; fitik asite bağlı fosfor, kalsiyum ve çinko gibi mineraller ile protein, amino asitler ve nişasta sindirilebilirliğinde oluşan artışlar kanatlı performansında iyileşme sağlamıştır. Ayrıca eksojen fitaz eklenmesi ile, mineral maddelerin biyoyararlanımların da artış sağlanarak kanatlı gübresindeki seviyeleri düşürülmekte ve böylece çevre kirliliğinin önlenmesine katkıda bulunmaktadır .

Strenkert ve arkadaşları 2019 yılında *C. reinhardtii*'in yaşamında bir gün boyunca moleküler olayları incelemişlerdir. *C.reinhardtii*, karanlık anoksik koşullar altında fotosentez, fermantasyon ve diğer anaerobik koşulları incelemek için önemli bir modeldir. Subproteomik analizlerle doğrulanan ve pigment ölçümleri, seçilen metabolitler ve fizyolojik parametrelerle eşleştirilen bir günlük transkriptom üretmişlerdir. Alg genomunun çoğunluğunun gün boyunca farklı bir şekilde ifade edildiğini ve belirli genlerin zamanlamasının biyolojik işlevleri tarafından belirlendiğini bildirmişlerdir. Nişastadan türetilen glikolitik piruvatın tercih edilen metabolik yolunun solunum yerine fermantasyon olduğunu da keşfetmişlerdir. Bulguları arasında *C.reinhardtii*, gece gündüze göre daha düşük solunum aktivitesi göstermiştir.

Pek çok ökaryotik mikroalg, büyük ölçüde depolama metaboliti biyosentezini indükleyen fosfor (P) açlığı gibi besin streslerine yanıt olarak metabolizmalarını değiştirir, ancak bu yanıtı düzenleyen genetik mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bajhaiya ve arkadaşları (2016) yaptıkları çalışmada Pi Açlık Yanıtı 1 (PSR1) transkripsiyon faktöründen yoksun bir *Chlamydomonas reinhardtii* mutantında P açlığıyla indüklenen lipid ve nişasta birikiminin inhibe edildiğini göstermektedirler. Transkriptomik analiz, P açlığı ile indüklenen ancak *psr1* mutantının metabolizma transkriptlerini belirlemişlerdir. Bunlar, nişasta ve triasilgliserol sentezi için transkriptleri ve aynı zamanda fotosentez-, redoks- ve stres sinyaliyle ilişkili proteinler için transkriptleri içerir. Ayrıca lipid ve nişasta metabolizmasını düzenleyen PSR1 rolünü incelemek için, *PSR1* de tamamlama hatları *psr1* stres ve *PSR1* bir hücre duvarı eksikliği suşunda aşırı hatları üretilmiştir. *PSR1* ekspresyonu *psr1* hatlarının bağlı kurtarmak için işlevsel olduğu gösterilmiştir. *PSR1* aşırı ekspresyon çizgileri, artan nişasta içeriği ve hücre başına nişasta granülü sayısı sergilemiş; bu, spesifik nişasta metabolizması genlerinin daha yüksek ekspresyonu, ancak azaltılmış nötr lipid içeriği ile bağlantılıdır. Ayrıca bu fenotip, asetat varlığında ve yokluğunda tutarlıydı. Bu sonuçlar birlikte, küresel metabolizmada anahtar bir transkripsiyonel düzenleyiciyi tanımlar ve nişasta biyosentezini modüle etmek için mikroalglere transkripsiyon mühendisliğini göstermektedir. Genel olarak bakıldığında bu veriler, P açlık koşulları altında indüklenen birincil metabolizma genlerinin bir alt kümesinin, PSR1 tarafından transkripsiyonel olarak düzenlendiğini göstermektedir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Biyoinformatik Analizler

3.1.1. Fosfataz ve fitaz proteinlerin domain analizi

Fosfataz ve fitaz proteinlerinin domain bölgelerini belirlemek amacı ile Smart ve Pfam veri tabanları kullanılmıştır. Pfam, protein dizisi ailelerinin bir veri tabanıdır. Her Pfam ailesi, Hidden Markov (Saklı Markov Modeli) modeli olarak bilinen istatistiksel bir modelle temsil edilir (Punta vd. 2012).

Smart veri tabanında ise bu proteinlerin TM (trans membran) domaininin var olup olmadığına bakılmıştır (Letunic vd. 2012).

3.1.2. Hücre içi lokalizasyon analizi

Predalgo biyoinformatik veri tabanı kullanılarak proteinlerin hücre içindeki yerleri belirlenmek amaçlanmıştır. Protein dizilimi Phytozome veri tabanından alınıp Predalgo veri tabanına fasta formatında yüklenmiştir (Tardif vd. 2012).

3.1.3. Moleküler ağırlık analizi

Expasy veri tabanında bulunan Compute pI/Mw aracı kullanılarak moleküler ağırlıklar ve izoelektrik noktasının teorik değerleri tespit edilmiştir (https://web.expasy.org/compute_pi/)

3.1.4. Signal peptid analizi

Phobius ve SignalP veri tabanları kullanılarak proteinlerin signal peptid dizileri tespit edilmiştir (Kall vd. 2007 ; Armenteros vd. 2009).

3.1.5. MPA (Metallofosfoesteraz) proteinlerinin motif analizi ve hizalama analizi

Klabunde ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma referans alınarak mor asit fosfataz enzimine ait olan GNHE/GNHD motifi MPA genlerinin peptid dizisinde taranmıştır. Bulunan sonuçlar Clustal W veri tabanı kullanılarak MPA motifleri hizalanmıştır.

3.1.6. Moleküler filogenetik analizi

Filogenetik ağaç analizi için Clustal W veri tabanı kullanılarak yapılmıştır. (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>).

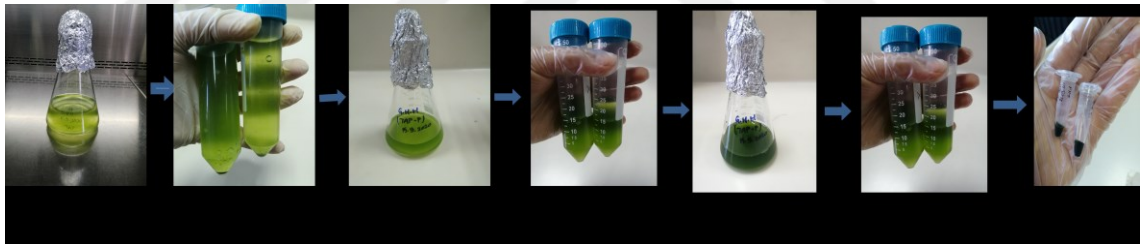
3.2. Hücre Kültürü ve Hücrelerin Fosfat Açlığına Maruz Bırakılması

C. reinhardtii hücreleri sıvı TAP besi yerinde $2-4 \times 10^6$ hücre/mL yoğunluğa ulaşacak şekilde çalkalayıcı üzerinde oda sıcaklığında üretilmiştir. Bu kültürden steril kabin

içerisinde 20 mL alınarak santrifüj edilmiş ve peletteki hücelere 500 µl Trizol (kullanılan izolasyon yöntemine bağlı olan lizis tamponu değişiklik gösterebilir) eklenip -80 C°'de RNA izolasyonu için saklanmıştır (Şekil 3.1.). TAP sıvı besi ortamının geri kalan kısmı da santrifüj edilip, TAP sıvı besi yeri atıldıktan sonra aynı hacimde fosfat içermeyen besi yeri eklenmiştir. Fosfat içermeyen besi yerinin hücelere eklendiği zaman not edilmiştir ve bu zamandan sonra değişik aralıklarla (24 h, 48 h ve 7 gün) kültürden yukarıda açıklandığı şekilde örnek alınıp çöktürölüp ependorf tüplere alındıktan sonra üzerine kullanılacak olan RNA izolasyon yöntemine bağlı olarak lizis tamponu eklenip hücelere -80 C°'de RNA izolasyonu için saklanmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.1. Hücre Kültürü TAP besi ortamından alınan örnekler **a:** Çalışmada yabancı tip CC -124 suşu kullanılmıştır; **b:** 50 ml'lik TAP sıvı besi ortamında hücre kültürünün başlatılması; **c:** Hücrelerin büyümesi **d:** Hücre sayımı sonucuna bağlı olarak 50 ml'lik kültürden 150 ml'lik kültür başlatılması **e:** Hücrelerin büyümesi **f:** 150 ml'lik TAP sıvı besi ortamından alınmış örnekler; **g:** TAP sıvı besi ortamından alınan örneklerin çöktürülmesi ile elde edilen peletler



Şekil 3.2. Fosfat açlığının başlatılması ve örneklerin toplanması. **a:** TAP sıvı besi ortamından örnekler alındıktan sonra kültürün geri kalan kısmı **b:**TAP sıvı besi ortamının falkon tüplerde Fosfat içermeyen TAP sıvı besi ortamı ile yıkanması **c:** Yıkanan hücrelerin yeni erlene aktarılması ve büyütülmesi **d:** 24 saat sonunda Fosfat içermeyen besi ortamından örnek alınması ve çöktürülmesi **e:** 48 saat sonundaki hücreler **f:** örnek alınıp çöktürülmesi **g:** Çöktürülen hücrelerin peletlerinin ependorf tüplere alınıp izolasyon yöntemine bağlı olarak kullanılacak lizis tamponun eklenip -80 °ne bırakılması

3.2.1.Hücre sayımı

Thoma tip hemositometre ile hücrelerinin sayımı yapılmıştır. Geliştirilmiş tip sayım kamerası 0,1 mm derinlikte ve 9 adet 1 mm²'lik kare alanı bulunmaktadır. Thoma lamının merkezinde 16 büyük kare alanına ve her bir kare 25 küçük kare alanına bölünmüştür. Merkezdeki 25 büyük karedeki hücrelerin sayımı yapılmıştır. Sayım lamaları, örnekler thoma lamına konulmadan önce %70 etil alkol ile iyice temizlenmiş ve kurutulmuş, daha sonra, örneklerin sayımı yapılarak, gerekli hesaplamalarla hücre sayısı tespit edilmiştir. Hesaplama şekli; her bir kültürden alınan

örneklerin thoma lamında alt ve üst kısmın sayılarak bulunan değerlerin aritmetik ortalaması ile seyreltme faktörü ve 10^4 çarpma işlemi yapılması ile bulunan değer ortalama hücre sayısını vermektedir. Bulunan değer 10^6 çevrilerek mililitrede bulunan hücre sayısı tespit edilmiştir.

3.2.2. Hücre kültüründe kullanılan TAP besi yeri içeriği ve solüsyonlar

Bu tez çalışmasında kültür ortamı olarak Tris Asetat Fosfat (TAP) besi yeri sıvı formu ve fosfat içermeyen TAP sıvı formu kullanılmıştır.

Besi yeri hazırlanırken;
Tartım $\Rightarrow$ Kaba aktarma $\Rightarrow$ Çözündürme $\Rightarrow$ Sterilizasyon şeklinde yol izlenmiştir.

Çizelge 3.1. 1 L için TAP ortamı (nihai pH'ı 7.0'a ayarlayın)

1M Tris bazı	2.42 gr
Fosfat Tampon II	1.0 ml
Solution A	10.0 ml
Hutner'in eser elementleri	1.0 ml
Buzul asetik asit	1.0 ml

TAP sıvı besi yerinin hazırlanışı: Çizelge 3.1 de verilen TAP besi yeri 1L'lik otoklavlanabilir cam şişelerde hazırlanmıştır. Besi yeri hazırlanmasında her kimyasal ayrı ayrı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1 L'lik mezüre 500 ml distile su eklenmiştir. Mezürden 1L'lik otoklavlanabilir şişeye boşaltılarak solüsyon iyice karıştırılmıştır. Distile su ile 1 L'ye tamamlanmış ve besi yeri 20 dakika 121°C 'de otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra besi yeri oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. Fosfat içermeyen TAP sıvı besi ortamı

1M Tris bazı	2.42 gr
1.5 M KCL	1.0 ml
Solüsyon A	10.0 ml
Hutner'in eser elementleri	1.0 ml
Buzul asetik asit	1.0 ml

Fosfat içermeyen sıvı besi yerinin hazırlanışı: fosfat içermeyen TAP besi yeri için Çizelge 3. 2 de verilen fosfat içermeyen TAP besi yeri 1L'lik otoklavlanabilir cam şişe de hazırlanmıştır. Besi yeri içerisinde yer alan her kimyasal için farklı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1 L'lik mezüre 500 ml distile su eklenmiş ve 1L'lik otoklavlanabilir şişeye aktarılmıştır. Ayrıca karışım homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Distile su ile 1 L' ye tamamlandıktan sonra 20 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası besi yeri oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Fosfat Tampon II (100 ml için)

K_2HPO_4	10.8 g
KH_2PO_4	5.6 g

Fosfat tamponu hazırlamak için hassas terazide K_2HPO_4 'dan 10.8 g ve KH_2PO_4 ise 5.6 g tartılarak son hacim 100 ml olacak şekilde dH_2O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Solüsyon 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

Solüsyon A (500 ml için)

NH_4Cl	20 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2.5 g

Hassas terazide NH_4Cl 'den 20 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ' dan 5 g ve $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ' den 2.5 g tartılarak 500 ml olacak şekilde dH_2O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Solüsyon 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

1M Tris-HCl (250 ml): 30,27 g Tris tartıldı, 200 ml distile su ile çözdürüldü. HCl ile pH 7,5 değerine ayarlandı ve dH_2O su ile hacim 250 L tamamlandı. Solüsyon 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

0.5M EDTA (250 ml): $EDTA \cdot 2Na \cdot 2H_2O$ 'den 46.5 g tartıldı ve 150 ml distile su ile çözdürüldü. NaOH ile pH'sı 8 değerine ayarlandı ve dH_2O ile hacim 250 ml ayarlandı.

TAE tamponu (50X): Hassas terazide 242 g Tris tartıldı. 57.1 ml Asetik Asit ve 100 ml 0.5M EDTA (pH:8) eklendi. dH_2O ile 1 L tamamlandı ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırıldı.

TAE tamponu (1X): 20 ml 50X TAE stok çözeltisinden alınarak 980 ml distile su 1L tamamlandı.

Primerler (100 μ M): Öncelikle primerler üretici firmanın direktiflerine uyularak DNase RNase-free su kullanılarak 100 μ M'a sulandırıldı. Daha sonra 30 dk buz üzerinde inkübe edildi ve vortekslendi. Forward (F) ve Revers (R) primerden 10 μ M (100 μ M'lık ana stok çözeltisinden 5 μ l alınıp üzerine 45 μ l DNase RNase-free su eklendi) ara stok oluşturuldu ve bu ara stoktan kullanılmıştır.

3.3. RNA İzolasyonu ve Kuantifikasyonu:

RNA'yı saf elde etmek için 2 farklı protokol birleştirilerek izolasyon yapılmıştır. İlk olarak Trizol Reagent (İnvitrogen) protokolü kullanılmıştır.

Protokol basamakları;

TAP, 24 saat fosfatsız ve 48 saat fosfatsız ve 7.gün fosfatsız besi yerlerinden alınan örnekler ependorf tüpte çöktürülmüş, üzerlerine 500 µl Trizol eklenmiş ve -20'ye bırakılmıştır.

1. -80'den çıkan örnekler 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
2. Hücrelere 100 µl kloroform eklendi ve tüpler alt üst yapılmıştır.
3. 2-3 dk inkübasyona bırakılmıştır.
4. 15 dk , 4 °C, 12.000 g' de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası oluşan faz ayrımından en üstteki şeffaf sıvı alınarak yeni bir tüpe aktarılmıştır.
6. Alınan şeffaf sıvının üzerine 200 µl isopropanal eklendi, tüpler alt üst yapılmıştır.
7. 10 dk od sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
8. 10 dk, 4 °C, 12.000 g' de santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj sonrası üst sıvı döküldü ve pellet kaldı.
10. Pellete 500 µl % 75'lik ethanol eklenmiştir.
11. 5 dk, 4 °C, 7.500 g'de santrifüj yapıldı ve üst sıvı dökülüp pellet kaldı tüpte.
12. Pelet kurutuldu ve kurduğundan emin olunduktan sonra üzerine DNase/RNase free dH₂O' dan eklenmiştir.
13. Buz üzerinde 1 saat bekletilmiştir.

Trizol Reagent protokolü ile RNA elde edildikten sonra QIAGEN markasının RNesay® mini kiti kullanılmıştır.

1. Trizol metodu ile elde ettiğimiz RNA'ları 100 µl hacimde olacak şekilde RNase içermeyen su ilave edilmiştir.
2. 100 µl hacimde ki tüplere 350 µl RLT tampon eklenmiş ve karıştırılmıştır.
3. 250 µl ethanol (%96-100) eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
4. 700 µl hacimce ulaşan örneği RNase mini döndürme kolona aktarılmış ve 15 saniye 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
5. Santrifüj sonrası sıvı dökülmüş spin kolon kullanılmaya devam edilmiştir.
6. gDNA uzaklaştırma (DNA digestion) işlemi yapılmıştır. Bunun için karışım hazırlanmıştır.
7. 10 µl DNase I ve 70 µl RDD tamponu gereklidir ve bu sadece bir örnek için geçerlidir. Kaç tane örneğimiz varsa bu değerler örnek sayısı ile çarpılır.
8. Kolona 350 µl RW1 tamponu eklenmiş ve 30 saniye 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
9. Hazırlanan karışımdan 80 µl her tüpe eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında beklenmiştir.

10. Daha sonra üzerine 350 µl RW1 tamponu eklenmiş 30 saniye 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
11. Santrifüj sonrası sıvı dökülmüş ve döndürme kolona 500 µl RPE tampon eklenip 30 saniye 8000 g' de santrifüj edilmiştir.
12. 2. defa kolona 500 µl RPE tamponu eklenip santrifüj süresi 2 dakika uzatılmıştır ve santrifüj sonrası sıvı dökülüp 1 dakika santrifüj edilmiştir.
13. Kolon 1.5 ml'lik toplama tüpüne aktarılmış ve 30-50 µl arasında RNase içermeyen su eklenmiş ve 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilmiştir.
14. Santrifüj işlemi bittikten sonra kolonlar tüplerin üzerinden alınarak tüplerin kapakları kapatıldı. RNA muhafaza edilmek amacıyla -80°C'ye kaldırıldı. RNA'ların kantitatif analizi ise NanoDrop kullanılarak yapılmıştır.

3.3.1. RNA kalitesinin agaroz jel ile kontrol edilmesi

RNA izolasyonu tamamlandıktan sonra jelde yürütüldü. RNA'nın yürütüleceği agaroz jel tankı, taraklar ve kullanılan bütün malzemeler özenle yıkanmış ve saf sudan geçirilmiştir.

Kullanılacak olan agaroz jel yeni hazırlanmıştır. Jel tabakasına kuyucukların oluşması için jel tarağı yerleştirildi. 250 ml'lik erlene yüzde kaçlık agaroz kullanılacak ise o miktarda hassas terazi kullanılarak tartıldı. Agaroz, yeni hazırlanmış 1X TAE tampon içinde çözündükten sonra yaklaşık 50 °C sıcaklığa düştüğünde 2 µl etidyum bromür ilave edildi ve karıştırıldı elde edilen bu karışım jel tabakasına dökülerek katılaşması beklenildi. Jel katılaştıktan sonra tarağı oluşan kuyucuklara zarar vermeyecek şekilde yavaşça ve dikkatlice çıkartıldıktan sonra jel elektroforez tankına yerleştirildi. Yeni hazırlanmış 1X TAE tamponu jelin üzerini tamamen örtünceye kadar tanka aktarıldı.

4 µl RNA çözeltilerinin üzerine 2 µl yükleme boyası eklendi. Bu RNA karışımı 6 µl olarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. İlk ya da son kuyucuğa referans olarak 2 µl (1/5 seyreltilmiş şekli) 1kb DNA laderının üzerine 2 µl yükleme boyası eklenerek 2 µl yüklendi.

3.3.2. RNA miktarının Nanodrop ile belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların miktarlarının belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik ölçüm yapmak için NanoDrop cihazı kullanıldı. İlk önce cihaz 1 µl distile su ile temizlendi. Daha sonrasında RNA'nın çözülmüş olduğu RNase içermeyen sudan 1µl alınarak ölçüm değeri sıfırlandı. İzole edilen RNA'dan (1:10 dilusyon) 1 µl alınarak 230, 260 ve 280nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.4. Revers Transkripsiyon (RT) ile cDNA Elde Edilmesi

Total RNA'lardan cDNA sentezi için OneScript® Plus cDNA Sentez kiti (ABM Kat. No: 13485) kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen maddelerdeki reaksiyon yapılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Bu maddeler;

1. Nükleaz içermeyen 1.5 ml mikro santrifüj tüplerine toplamda RNA hacmi 1 ng - 2 µg/rxn olacak şekilde hesaplandı ve gerekli miktarlarda RNA eklendi.

2. Daha sonra 1 µl (10µM) Rastgele primer eklendi ve üzerine 1 µl (10 mM) dNTPs karışımı eklenmiştir. Toplam hacim 14.5 µl tamamlayacak şekilde ddH₂O eklenmiştir.
3. Hazırlanan mikro santrifüj tüpleri 15 dk 65 °C PZR cihazında inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra 1 dk buzun üzerinde bekletilmiştir.
4. Santrifüj işlemi bittikten sonra tüplerin içerisine 4 µl 5X RT tamponu, 0.5 µl RNaseOFF Ribonükleaz İnhibitörü (40 U/µl), 1 µl OneScript® Plus RTase (200 U/µl) eklenmiştir. Eklendikten sona tüpler yavaş bir şekilde parmak ucuyla karıştırılmıştır.
5. Tüplerin toplam hacmi 20 µl oldu.
6. Daha sonra kısa süreli bir santrifüj yapılmıştır.
7. Rastgele Primerler kullandığımız için tüpü 25 ° C'de 10 dakika inkübe edilmiştir.
8. Tüpleri 50 ° C'de 15 dakika (qPCR için) veya 50 dakika (PZR için) inkübe ederek cDNA sentezini gerçekleştirilir.
9. Tüpler 50 dk 50 °C PZR' da inkübe edilmiştir. Karışım 5 dk 85 °C ısıtılarak reaksiyon durdurulmuştur.
10. Elde edilen cDNA -20 °C muhafaza edilmiştir.

3.5. Primer Dizaynı

Primer3 programı kullanılarak her bir gen için ekzon bölgesine bağlanacak şekilde ikiye çift primer dizayn edilmiştir. Primerler 100-250 bp büyüklükte ürün oluşturacak şekilde dizayn edildi.

Çizelge 3.3. PZR'da kullanılan primerler

Gen	Primer Adı	Baz Dizilimi	Amplikon Uzunluğu
PHOX	qPHOX-E24F	TGACTACGACGACATGACCC	116 bp
	qPHOX-E25R	GGCGCTCCACATCCACAG	
PHO1	qPHO1-E7F	TGAGTACGTTGCCATTCCCT	120 bp
	qPHO1-E8R	CAGATGGACTTGATGCGCTC	
PHOD	qPHOD-E17F	ATCTACCTGGCCATTGACGG	123 bp
	qPHOD-E18R	GATGGAGGTGTAGCGATCGA	
MPA1	qMPA1-E7F	AGCTACGACTTCATCCACCC	113 bp
	qMPA1-E8R	ATGGGGATGTGGGTGAAGG	
MPA2	qMPA2-E8F	ATCGAGGACCTGCTGCTG	105 bp
	qMPA2-E9R	CTCCTCCACGCACTTGTTG	

Çizelge 3.3.’ ün devamı

MPA6	qMPA6-E5F	GCATTGAGCGGCTAAACAGT	119bp
	qMPA6-E6R	GTTCCACATCACGCTGTTGG	
MPA8	qMPA8-E11F	CGAGTGCGGTATAACCCTTTG	112 bp
	qMPA8-E12R	CTCCGTGCTGTACTGTAGGA	
MPA9	qMPA9-E18F	ACCTCATGTCCGACACGTC	163 bp
	qMPA9-E19R	TTTGCTCGTGTGGTTTAGGC	
MPA10	qMPA10-E7F	AAGGGCCACGAGTGATTACA	135 bp
	qMPA10-E4R	GTGAGCCAAAGATGCGGTAC	
MPA11	qMPA11-E9F	GGTGATCTTGTTGGGAGACA	233 bp
	qMPA11-E11R	AGTTGGTGGGGAAGGAGAAG	
MPA12	qMPA12-E8F	CGTAATGGCCGTGTTCTCTG	107 bp
	qMPA12-E9R	AGTTGTCTGAGTCGTAGCGG	
MPA13	qMPA13-E15F	CTCACTCGCGACCTCAGTT	242 bp
	qMPA13-3utrR	CACGTGGGTTTATGTTTCGCA	
CBLP	qCBLP-F1	CTTCTCGCCCATGACCAC	105 bp
	qCBLP-R1	CCCACCAGGTTGTTCTTCAG	

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA’nın amplifikasyonu gerçekleştirmek için polimeraz zincir reaksiyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır. PZR reaksiyonu için AMPLIQON (Kat.No/A331703) kiti kullanılmıştır. Her örnek, aşağıdaki Çizelge 3. 4’ de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım örnek sayısı kadar PZR tüplerine 18 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve her bir örneğin cDNA’ sı ayrı PZR tüplerine 2 µl olarak eklenmiştir. RT-PZR koşulları Çizelge 3. 5 ’de belirtilen değerlerde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.4. RT-PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
2x Master mix	10 µl
Left Primer (10µM)	1.6 µl
Right Primer (10µM)	1.6 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	4.8 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.5. RT-PZR analizi protokolü

Basamak	Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
1	95 °C	15 dk	1
2	95 °C	30 s	35
3	55°C	30 s	35
4	72 °C	20 s	35
	34 defa 2. Basamağa git		
Son uzatma	72 °C	20 s	1
	12 °C	∞	



Şekil 3.3. RT-PZR ve PZR analiz çalışması

3.7. PZR ve RT-PZR Ürünlerinin Agoroz Jelde Yürütülmesi

Agaroz jel hazırlama: PZR işlemi yapıldıktan sonra oluşan PZR ürünleri aşağıdaki açıklamalara göre yürütülmüştür. Jel tabakasına kuyucukların oluşması için jel tarağı yerleştirilmiştir. 250 ml 'lik erlenmayere 3 g agaroz, 100 ml 1 X TAE tamponu içine eklenmiş, mikrodalga fırında hafif hafif ısıtılarak ve karıştırılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı ve böylece %3'lük agaroz jel hazırlanmış oldu. Agaroz, tampon içinde çözüldükten sonra yaklaşık 50 °C sıcaklığa düştüğünde 1,5-2 µl etidyum bromür ilave edildi ve karıştırıldı elde edilen bu homojen karışım jel tabakasına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleşmesi tamamen gerçekleştikten sonra tarağı oluşan kuyucuklara zarar vermeyecek şekilde ortamdaki dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. 1X TAE tamponu jelin üzerini tamamen örtünceye kadar tanka aktarıldı.

Hazırlanan %3'lük agaroz jel, içi 1X TAE tamponuyla doldurulmuş olan tanka yerleştirildi. PZR veya RT PZR ürünlerinden 6 µl alınarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Referans olarak son kuyucuğa 3 µl (1/5 seyreltilmiş şekli) 1kb ve 50 bp DNA Laderin üzerine 2 µl yükleme tamponu eklenerek 5 µl yüklendi. Örnekler tamamen açılana kadar 150V'da yürütülmüştür.

3.8. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması için kullanılan cihazlar Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün araştırma laboratuvarı imkanlarıyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cihaz ve ekipmanların bilgileri ve kullanım amaçları Çizelge 3.6. ' da gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Cihaz listesi ve kullanım amaçları

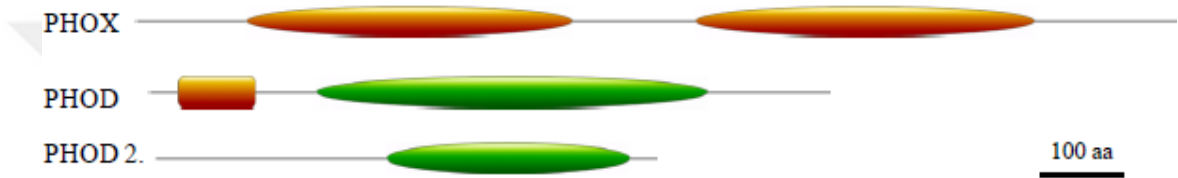
Cihaz	Marka Model	Kullanım Amaçları
Santrifüj	Isolab/FY2405000	RNA izolasyonu aşamalarında örneklerin çöktürülmesini sağlamak
Hassas terazi	KERNPLJ / 700-3CM	Besi yeri ve solüsyonların hazırlanmasındaki sarf malzemelerin tartılması
Otoklav	Autoclave / 23X-500E	Besi yeri ve kullanılan ekipmanların sterilizasyonu
Mikro Dalga	Vestel / MD 20 DB	Agaroz jellin hazırlanmasında
Işık Mikroskobu	Primovert Zeiss	Hücre sayımı
Nano Drop	Thermo Scientific, Waltham, MA)	RNA örneklerinin kalitatif tayininde
Vorteks	DragonLab / MX-S	RNA izolasyonu sırasında tüplerin karıştırılması
Jel görüntüleme	Minilumi, DNR Bio-Imaging Systems	RNA izolasyonun, PZR ve RT ürünlerinin jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Laminar Flow	Tez San / 14-1490	Hücre kültürünün başlatılması,örnek alımı ve fosfat açılığının başlatılması
PZR	BIO-RAD / T100	Gen bölgelerinin çoğaltılması
Çalkalayıcı	Ruiwell / MPS-10	Sıvı hücre kültürünün büyütülmesinde

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik Analiz Sonuçları

4.1.1. Fosfataz ve fitaz (Metallofosfoesteraz) olduğu düşünülen proteinlerin domain analizi

Bir domain, protein dizisinin ve protein zincirinden bağımsız olarak işlev görebilen, gelişebilen ve proteinin üçüncül yapısının oluşmasında rol alan korunmuş parçalardır. Korunmuş olan her parça üç boyutlu yapıyı oluşturur ve stabildirler. Ayrıca domainler farklı işlevlere sahip proteinler oluşturmak için farklı düzenleme ile yeniden birleştirilebilirler. Genel olarak domain alanların uzunluğu yaklaşık 50-250 amino asit arasında değişir (Xu ve Nussinov 1998).



Şekil 4.1. PHOX , PHOD ve İkinci PHOD proteinlerinin domain analizi: Turuncu elips; DUF839 domaini , Turuncu dikdörtgen; PHOD- N terminal Yeşil elips; alkalin fosfataz

Smart ve Pfam analiz sonuçları PHOX proteini için DUF839 domainini vermektedir. DUF 839 işlevi bilinmeyen bir domain ailesidir.

PHOD proteini için Phytozome veri tabanında iki farklı protein sekansı bulunmuştur. Bu sekanslar analiz edildiği zaman ortak olan PHOD fosfataz domaini olmuştur (Şekil 4.1). Alkalın fosfataz D (PhoD) reaksiyonu (fosfat monoester + H₂O = bir alkol + fosfat) katalize eder. PhoD, fosfolipidlerin fosfatidik asit ve alkol kısımları arasındaki ester bağının hidrolizini katalize eden Ca²⁺ - bağımlı fosfolipazdır.

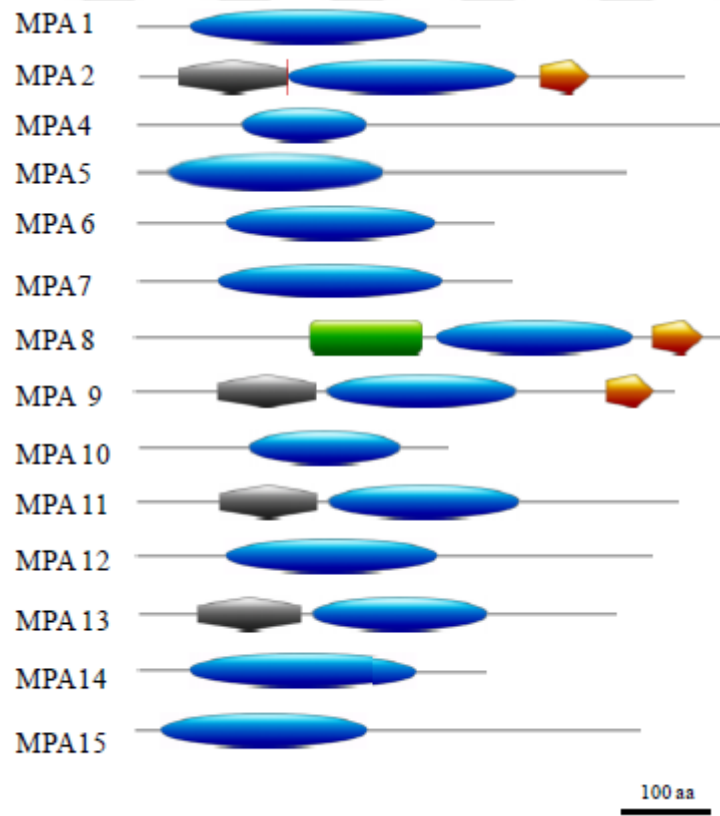
İlk bulunan PHOD için turuncu dikdörtgen; PHOD- N terminal domaini, Fosfolipaz D'nin (PLD) N-terminalinde bulunabilir. PLD, fosfatidik asit ve fosfolipidlerin alkol kısımları arasındaki ester bağının hidrolizini katalize eder. İkinci bulunan PHOD de bu domain bölgesi yoktur.

Phytozome veri tabanının da PHOX ve PHO1 geni için Alkalen fosfataz denilmektedir. Ancak domain analizi sonucunda PHOX ve PHO1 genlerinin Alkalen Fosfataz domaininde yer almadığı gözlenmiştir. Ayrıca PHO1 proteini için veri tabanlarında domain sonucu bulunamamıştır.

Transmembran proteinler (TMP), hücre zarı membranında gömülmüş olarak bulunur. TMP farklı doku ve organlara yerleşmiş ve birçok hayati fonksiyonu gerçekleştiren; membran taşıyıcıları, membran kanalları, membran enzimleri ve membran reseptörleri gibi çeşitli fenotipleri bulunmaktadır (Çetin ve Traş 2015).

Transmembran domain analiz sonuçlarında ise bazı proteinlerin transmembran domaini bulundurduğu bazı proteinlerin ise transmembran domainlerinin bulunmadığı görülmüştür. Çizge 4.1’de gösterilmiştir.

Mor asit fosfatazlar (PAP'ler), asidik pH optimaları ve TyrO'dan FeIII'e yük transferine bağlı yoğun mor renkleri ile karakterize edilen, her yerde bulunan iki çekirdekli metal içeren asit hidrolazlardır. Metal iyonlarını koordine eden amino asit kalıntıları tüm PAP'larda korunur. Aktif PAP'ler, bir His N, bir His N ve bir Asn O tarafından koordine edilen iki değerlikli bir metal iyonuna (Fe, Zn veya Mn) ek olarak Tyr O, bir His N ve bir Asp O2'ye koordine edilmiş bir FeIII iyonu içerir. Bir hidroksit iyonu ve bir Asp O2, iki metal iyonu arasında köprü oluşturur [(PUBMED: 12440878)]. Bu enzimler, N-uçları [(PUBMED: 10510276)] içinde yüksek derecede homoloji paylaşır. Bu alan, bis (5'-nükleosil) -tetrafosfaz (apaH), nükleotidazlar, sfingomiyelin fosfodiesterazlar ve 2'-3 'cAMP fosfodiesterazlar dahil olmak üzere çeşitli fosfoesterazlar [(PUBMED: 9685491)] aralığında bulunur (Bakteriyel SbcD veya archaeal / maya Mre11 olarak). Bu alandaki en korunmuş bölgeler, metal şelatlama kalıntılarının etrafında merkezlenir. Bu alan, mor asit fosfataz proteinlerinin C terminalinde bulunur.



Şekil 4.2. MPA (metallofosfoesteraz) proteinlerinin domain analizi: Mavi elips; metallofosfoesteraz domaini, Turuncu beşgen ; metallofos C domaini, Siyah altıgen ; mor asit fosfataz N terminal , Yeşil dikdörtgen ; FN3

Şekil 4.2.’ de görüldüğü gibi MPA genlerinin hepsinde metallofosfoesteraz domainleri mevcuttur.

MPA 1, MPA4, MPA5, MPA6, MPA7, MPA10, MPA12, MPA14, MPA15 proteinlerinin domain analiz sonucuna göre metallofosfoesteraz domaini içerirler ve hepsinde ortaktır.

MPA 2 ve MPA 9 proteinlerinde ise metallofosfoesteraz domainine ek olarak Şekil 4.2.' de siyah altıgen ile gösterilen mor asit fosfataz N-terminalini ve turuncu beşgen ile gösterilen mor asit C –terminalini içerdiği görülmektedir.

MPA 11 ve MPA 13 proteinleri metallofosfoesteraz domaini ve mor asit fosfataz N-terminal domaini içermektedir.

MPA 8 proteinine bakıldığında ise diğer proteinlerden farklı olarak FN3 domaini içermektedir. FN3 plazma proteini olan fibronektin içindeki üç tip dahili tekrardan biridir. Hücre yapışması, hücre morfolojisi, tromboz, hücre göçü ve embriyonik farklılaşmada rol oynar (Antonyuk vd. 2014) . Diğer moleküllerle etkileşim bölgeleri, çeşitli FN3 alanlarında bulunan Arg-Gly-Asp (RGD) dizisi gibi kısa amino asit uzantıları ile eşleştirilmiştir. 2 iplik arasındaki esnek bir döngüde bir RGD hücre tanıma sekansı içerir. Diğer proteinlerle ortak olarak da metallofosfoesteraz domaini içerir ve mor asit fosfataz C terminal domaini mevcuttur.

4.1.2. Fitaz olduğu düşünülen (Metallofosfoesteraz) proteinlerinin motif hizalama analizi

Mor asit fosfatazlar için, bir fosfoesteraz imza motifi DX [G / H] - (X) n-GDXX [Y / X] - (X) n-GNH [E / D] mevcuttur. Büyük bir mor asit fosfatazlar (PAP) , protein fosfatazlar, diadenozin tetrafos-fazlar, eksonükleazlar, 5'-nükleotidazlar ve diğer fosfomonoesterazların sekansları dahil olmak üzere fosfoesteraz motifini içerir. Karakterize edilen PAP'ler, aktif bölgede bir Fe (III) -Fe (II) merkezi içeren yaklaşık 35.000 Da'lık bir moleküler kütleye sahip monomerik proteinlerdir (Klabunde vd. 1996).

Motif A					Motif B					
DX[G/H]-(X)n- GDXX[Y/X]-(X)n- GNH[E/D]-(X)n- H-(X)n- GHXH										
MPA2	LGSSRTTD	156	VHIGDLAYADG	220	YMVGIGNHAGPCR	254	VGESIR	415	VLSGHVWYAY	439
MPA4	GSISNGYT	109	VQLGDVVDRGH	190	VQAILGNHMLVH	226	SDASSA	267	QPSGHHLSV	302
MPA6	IGDLGDL	115	NVCGDFFVTP	199	VYMLNGNHSLNVC	191	ERYIAC	324	LVVSHTEQLG	348
MPA8	TRIVGVAQ	236	VHNGDISYRG	420	YMVTPGNHEDWPG	454	VGGARP	538	TLQGHHTYQ	584
MPA13	-----	---	LIVGDFAYANI	236	VLTTQGNHEMELQL	290	LECSRL	385	ALHGHVHGYE	408
MPA14	IGITNGDYH	73	NVMGDHRYATP	153	LYLLNGNHETMNMV	145	LPARVE	256	MVVGHITQTR	329
MPA1	VADVHYQNG	76	VFTGDNVWYPG	123	YMLTFGNHCESED	158	AFTIIP	254	VNVGHDLVND	341
MPA5	LGDLALPE	39	VQLGDLGHGKH	74	YGMILGNHLEGDE	109	VARRRN	225	WFSGHFELSH	238
MPA7	VGVWGRGN	106	VSTGDNFYPSG	139	WYVVMGNHGYGDAV	178	VVGSHF	313	YINGHEDQQ	356
MPA12	LADANLIGP	118	VFLGDVIHNGY	169	VRYLWGNHGYHTTC	211	LLARSD	338	VFSGHYHRL	352
MPA15	VGVVGAWK	44	LLVGDGFGNENV	71	KAVILGNHCAWFTM	97	AGDGD	243	VTFGHMEHHL	272
MPA9	CYDQGIQAV	78	IMVGDNTYADN	264	ILNCAANHELETSG	312	YYTEYK	418	VLNGHVWYAYE	448
MPA11	IADVQQTWN	237	ILVGDNSYADN	264	ILNCAANHELETEG	312	YFTEYK	418	VFNGHVWYAYE	448
MPA10	ASDEQRTS	73	LFPGDVEVGSV	165	-----	---	ILTGP	266	WVCGHIEQY	307
	*		** *		*** :		*		* *	

Şekil 4.3. Phytozome veri tabanından elde edilmiş korunmuş fosfoesteraz alanlarının sekansların hizalaması. Hizalama iki metalofosfoesteraz imza motifini ortaya çıkarmıştır

Hizalamalar, tüm bu enzimlerde (motif A) ortak olan ve dört korunmuş metal bağlama kalıntısı içeren bir dizi motif (DXH\G- (X) 025-GDXXY- (X) 025-GNH [E / D] ortaya çıkarmıştır.

İkinci bir metalofosfoesteraz motif (motif B) ortaya çıkmıştır (Klabunde vd. 1996).

GHXH sekansının ikinci histidini (H) ise protein fosfatase sekanslarında kaybolur (Klabunde vd.1996).

Şekil 4.3'de gösterilen bu ikinci metalofosfoesteraz motif B, birinci fosfoesteraz imza dizisini içeren tüm fosfoesterazlarda mevcuttur. Tüm fosfoesterazlar benzer imza motif yapılarına sahiptir.

MPA13 ve MPA10 proteinlerinde farklılık görülmektedir. MPA13 proteininde DXH\G motifi bulunamamıştır. MPA10 proteini için GNH [E / D] motifi bulunamamıştır.

MPA9 ve MPA11 proteinlerin de bütün motifleri içermekte fakat GNH [E / D] motifi yerine ANHE motifi bulunmuştur.

4.1.3. Fosfatase ve fitaz olduğu düşünülen proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu analizi

Proteinin hücre içi yerleşim yerinin belirlenmesi amacı ile Predalgo veri tabanı kullanılmıştır. Predalgo veri tabanı üç hücresel bölme için (mitokondri, kloroplast ve salgı yolu) bir skor hesaplamaktadır. Bu üç skor belirli bir puanlamanın altında olduğunda, protein "Diğer" (O) kategorisine yerleştirilir.

Predalgo analizlerinde PHOX, PHO1, PHOD, MPA1, MPA2, MPA4, MPA8, MPA9, MPA11 ve MPA13 proteinlerinin sekratuvar yolla (SP); MPA6 proteininin kloroplastta (C); MPA15 proteininin için ise mitokondride (M) lokalize olduğu Predalgo veri tabanı ile tahmini elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Bu üç hücre içi

yerleşimde olmayanlar ve veri tabanında diğer olarak (O) gösterilen proteinler ise şunlardır; MPA5, MPA7, MPA10, MPA12 ve MPA14 (Çizelge 4.1).

4.1.4. Moleküler filogenetik analiz sonucu

Filogenetik, bütün organizmalar arasındaki evrimsel ilişkiyi ata-soy şeklinde ortaya sunmayı amaçlar. Organizmaların sahip oldukları moleküler yapılar bir ataya ait olduklarını gösterir. Ortak atadan evrimselleşmelerinden dolayı türler birbirleriyle bağlantı oluşturabilir. Saptanan filogenetik bağlantının grafiksel gösterimine ise ‘filogenetik ağaç’ denir (Sarıçam ve Müştak, 2015).

Karşılaştırma yapmak ve fosfataz-fitaz olduğu düşünülen proteinlerin ilişkilendirilmesi için peptid seksanları Phytozome veri tabanından elde edilmiştir. Sekansların karşılaştırılması için NCBI (National Center for Biotechnology Information) ve PDB (Protein Data Bank) veri tabanlarından fitaz olduğu bilinen 5 farklı türün sekanslarına ulaşılmıştır. Bu 5 tür ise şunlardır; *Danio rerio* (Zebra balığı), *Shewanella* spp.(Probakteri), *Lupinus luteus* (Sarı acı bakla), *Triticum aestivum* (Buğday) , *Rattus norvegicus* (Kahverengi keme). 5 tür ile fosfataz-fitaz olduğu düşünülen proteinler ile ilişkilendirmek için Clustal W programı kullanılarak filogenetik ağaç oluşturulmuştur.

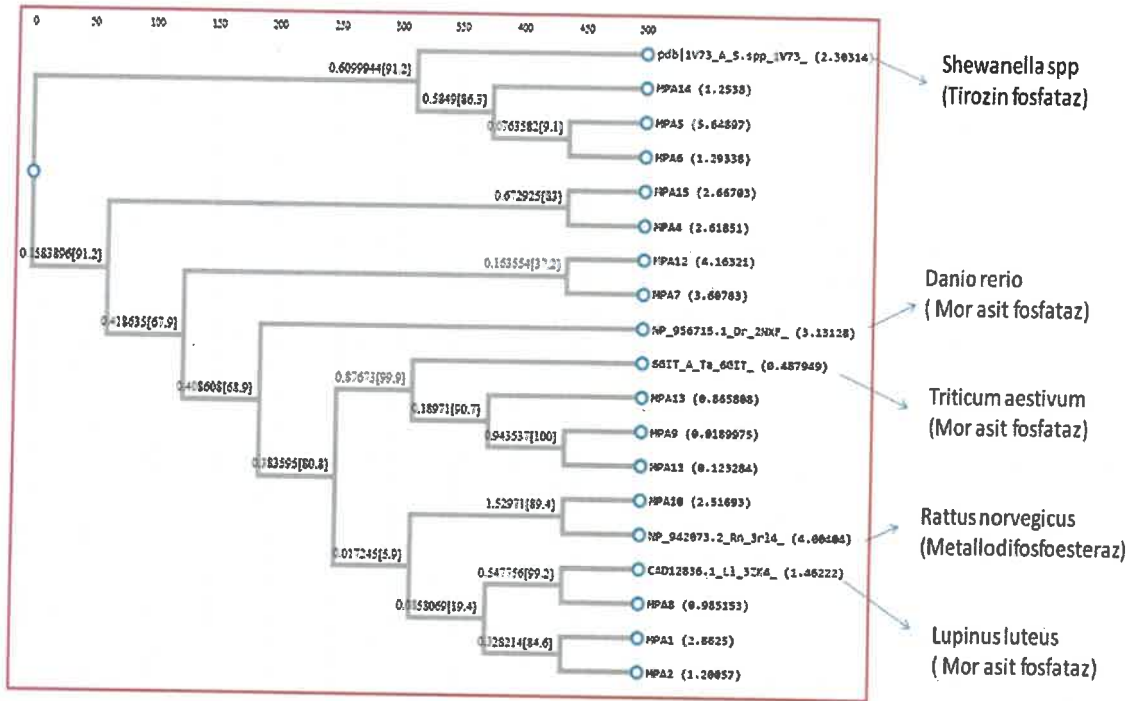
Şekil 4.4. incelendiği zaman türler tek atadan gelip 2 ana dala ayrılmıştır. 2 ana dal da kendi arasında alt gruplara ayrılmıştır.

MPA14, MPA5, MPA6 ve *Shewanella* sp. ile birbirine yakın ilişkili olduğu görülmüştür. *Shewanella* sp. Tirozin fosfataz (sistein fosfataz) olarak bilinmektedir. Yakın ilişkili olan MPA14, MPA5 ve MPA6 proteinlerinin tirozin fosfataz olabileceğini düşünmekteyiz.

MPA13, MPA9 ve MPA11 proteinleri *Danio rerio* (mor asit fosfataz) ve *Triticum aestivum* (mor asit fosfataz) ile yakın ilişkilidir. Bu iki tür mor asit fosfataz olarak bilinmektedir. Bu türler ile ilişkili olan MPA13, MPA9 ve MPA11 proteinlerinin mor asit fosfataz olabileceğini düşünmekteyiz.

MPA10 proteini *Rattus norvegicus* (Metallodifosfoesteraz) türü ile yakın ilişkilidir. *Rattus norvegicus* türü metallodifosfoesteraz olarak bilinmektedir. MPA10 proteinin de metallodifosfoesteraz olabileceğini düşünmekteyiz.

MPA8, MPA1 ve MPA2 proteinleri *Lupinus luteus* (mor asit fosfataz) ile yakın ilişkilidir. *Lupinus luteus* türü mor asit fosfataz olarak bilinmektedir. MPA8, MPA1 ve MPA2 proteinlerinin de mor asit fosfataz olabileceğini düşünmekteyiz.



Şekil 4.4. Moleküler filojeni analizi. Bilinen fitazlardan kullanılan türler *Danio rerio* (NP_956715, Zebra balığı), *Shewanella* spp. (pdb|1V73, Probakteri), *Lupinus luteus* (CAD12836, Sarı acı bakla), *Triticum aestivum* (pdb/ 6GIT, Buğday), *Rattus norvegicus* (NP_942073, Kahverengi keme). PHOX, PHO1, PHOD, PHOD2 ve MPA protein sekanları kullanılmıştır.

MPA15, MPA12, MPA7 ve MPA4 proteinleri birbirleri ile ilişkilidir ve bilinen fitazlardan hiçbirisi ile yakın ilişkileri bulunmamaktadır. Bu proteinlerin farklı fitaz gruplarından olabileceklerini düşünmekteyiz.

4.2. RT-PZR Sonuçları

4.2.1. Akalen fosfataz ve metallofosfoesteraz genlerinin fosfat açlığı altında ekspresyon düzeylerinin RT-PZR ile belirlenmesi

Strenkert ve ark. *C. reinhardtii*'in yaşamında bir gün boyunca moleküler olayları incelemişlerdir. *C.reinhardtii*, karanlık anoksik koşullar altında fotosentez, fermantasyon ve diğer anaerobik koşulları incelemek için önemli bir modeldir. Alg genomunun çoğunluğunun gün boyunca farklı bir şekilde ifade edildiğini ve belirli genlerin zamanlamasının biyolojik işlevleri tarafından belirlendiğini bildirmişlerdir. Bulguları arasında *C.reinhardtii*, gece gündüze göre daha düşük solunum aktivitesi göstermiştir.

Bajhaiya ve diğerleri yaptıkları çalışmada Pi Açlık Yanıtı 1 (PSR1) transkripsiyon faktöründen yoksun bir *Chlamydomonas reinhardtii* mutantında P açlığıyla indüklenen lipid ve nişasta birikiminin inhibe

edildiğini göstermektedirler. 3. Ve 5. Günlerdeki fosfat açlığı altında gen ekspresyonuna bakmışlardır.

RNA sekans (<http://genomes.mcdb.ucla.edu/CreSulfur/>) verileri fosfataz ve fitaz olduğu düşünülen genler için incelendiğinde sülfür, azot ve benzeri birçok ortamda TAP’da ekspresyonun olup olmadığına bakılmıştır.

Strenkert vd. ile Bajhaiya vd. yapmış olduğu çalışmalar referans alınarak sonuçlar analiz edilmiştir (Strenkert vd. 2019; Bajhaiya vd. 2016).

Literatürde PHOX geni üzerine yapılmış fonksiyonel çalışmalar bulunmaktadır fakat diğer genler üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. PHOX (alkalin fosfataz) proteini fosfat eksikliği altında hücre dışına salgılanan ve *C. reinhardtii*’nin fosfat besin maddesi eksikliğine aklimasyonun da görev alan önemli bir proteindir (Quisel vd. 1996). Bu gen RT-PZR analizlerimizde pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

PHOX geni için TAP besi ortamında ekspresyon saptanmamıştır. Fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24.saatte ekspresyon artışı olduğu görülmüş ve 48.saatte de artış devam etmiştir. . İkinci ve üçüncü kültürlerde 7.gün de incelenmiştir. PHOX geni için 7. günde ekspresyon azalmıştır (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve ark.(2019) ile Bajhaiya ve ark.(2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyusmaktadır.

PHO1 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon var iken bazı koşullarda TAP besi ortamın da ekspresyon saptanmamıştır. Bizim deneyimizde de yapılan kültürlerde TAP besi ortamında ekspresyon görülmemiştir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında 24 h ve 48 h fosfat açlığında artış görülmüştür. PHO1 geni için 7.günde ekspresyonun azaldığı görülmüştür (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyusmaktadır.

PHOD geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon çok az ya da yoktur. Bizim deneyimizde ise yapılan kültürler de TAP besi ortamında ekspresyon görülmemiştir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 48 h de artış görülmüştür. PHOD geni için 7.günde ekspresyon görülmemiştir (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyusmaktadır. Ancak PHOX ve PHO1’ e göre ekspresyonu daha az ancak beklenilenden de ekspresyonu az görülmüştür. Bu durum kullanılan primerlerin verimliliğinin düşük olmasından kaynaklanabilir.

MPA1 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyonu saptanmamıştır. Bizim deneyimizde de yapılan kültürler de TAP besi ortamında ekspresyon görülmemiştir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24. Saate artış başlamış ve 48.saatte de ekspresyonun arttığı

görlmüştür (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

MPA2 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyonu saptanmamıştır. Bizim deneyimizde de yapılan költürler de TAP besi ortamında ekspresyon görölmemiştir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24. saate artış başlamış ve 48.saatte de ekspresyonun arttığı görölmüştür. 7. günde ekspresyon görölmemiştir (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

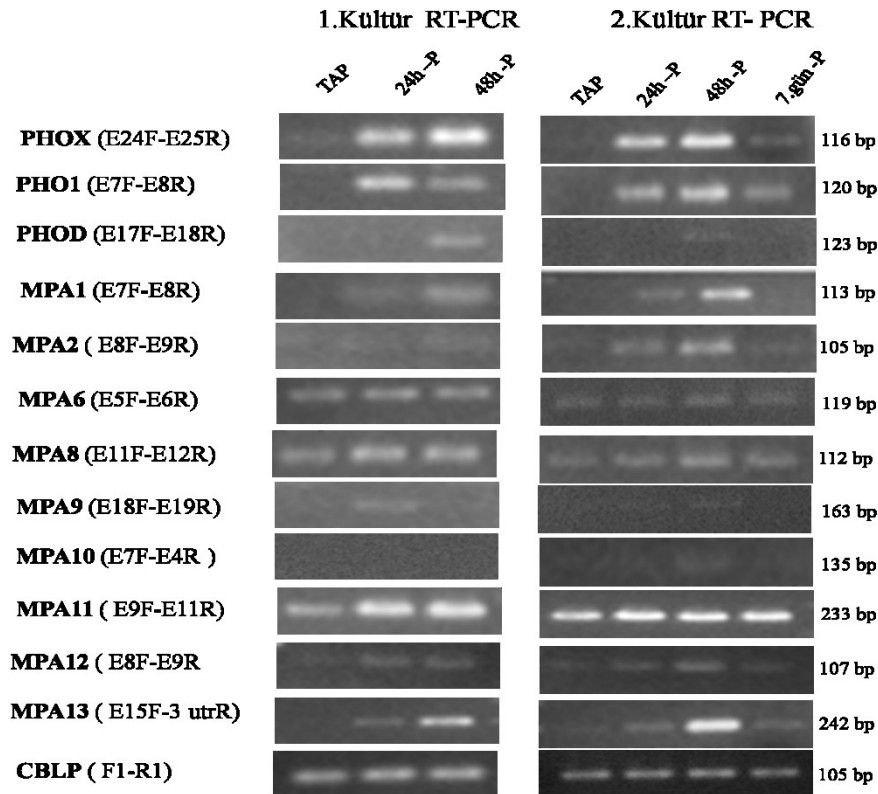
MPA6 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon görölmektedir. Bizim deneyimizde de költürlerde TAP besi ortamında ekspresyon saptanmamıştır. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24 h ve 48 h fosfat alığında artış görölmektedir. MPA6 geni için 7.günde ekspresyon görölmüştür (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

MPA8 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon görölmektedir. Bizim deneyimizde de költürlerde TAP besi ortamında ekspresyon görölmüştür. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24 h ve 48 h fosfat alığında artış görölmektedir. MPA8 geni için 7.günde ekspresyon vardır ve azaldığı görölmüştür (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

MPA9 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon var iken bazı koşullarda TAP besi ortamın da ekspresyon yok ya da çok azdır. Bizim deneyimizde de yapılan költürlerde TAP besi ortamında ekspresyon saptanmamıştır. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24 h ve 48 h fosfat alığında artış görölmektedir. MPA9 geni için 7.günde ekspresyon görölmemiştir (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

MPA10 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon var iken bazı koşullarda TAP besi ortamın da ekspresyon yok ya da çok azdır. Bizim deneyimizde ise yapılan költürlerde TAP besi ortamında ekspresyon görölmemiştir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24. saatte artış ikinci költürde görölmüştür ancak diğer költürlerde gösterilememiştir. MPA10 geni için 7.günde ekspresyon görölmemiştir (şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır.

MPA11 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon var iken bazı koşullarda TAP besi ortamın da ekspresyon yoktur. Bizim deneyimizde de yapılan kültürlerde TAP besi ortamında ekspresyon saptanmamıştır. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24 h ve 48 h fosfat açlığında artış görülmektedir. 7. günde de bu artışın devam ettiği görülmektedir. Çalışılan genler arasında sadece MPA11'de 7. günde artış devam etmiştir. (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyushmaktadır.



Şekil 4.5. 1. ve 2. kùltür fosfat açlığında gen ekspresyon analizi

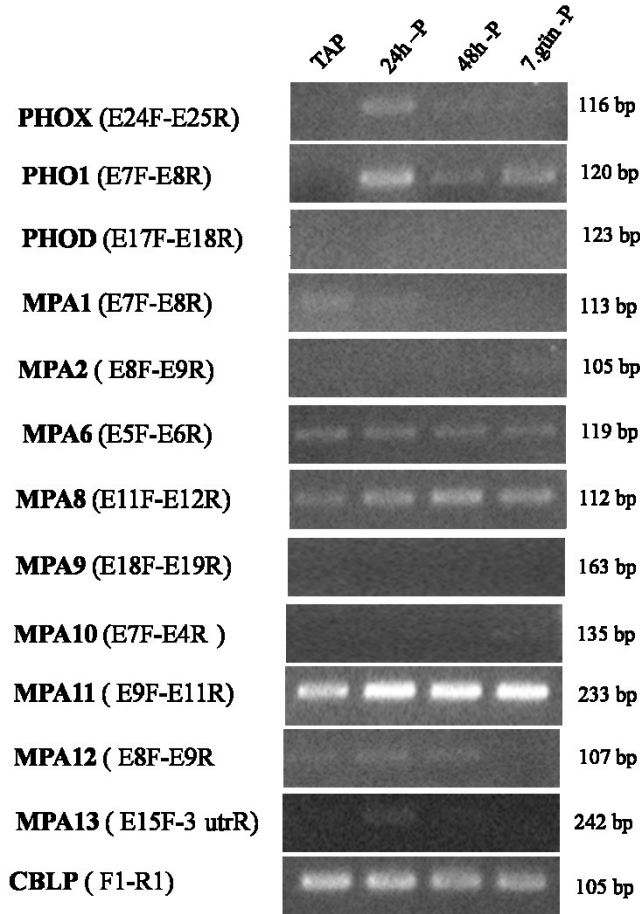
MPA12 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon var iken bazı koşullarda TAP besi ortamın da ekspresyon çok azdır. Bizim deneyimizde ise yapılan kültürlerde TAP besi ortamında ekspresyon çok az görülmektedir. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24. saatte ve 48. saatlerde ekspresyon artışı görülmüştür. 7. günde ise ekspresyonun azaldığı görülmüştür. (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyushmaktadır.

MPA13 geni için RNA sekans verileri incelendiğinde bazı koşullarda (sülfür, azot vs.) TAP besi ortamın da ekspresyon yoktur. Bizim deneyimizde de yapılan kültürlerde TAP besi ortamında ekspresyon saptanmamıştır. Ancak fosfat içermeyen TAP besi ortamında ise 24. saatte artmış ve 48. saatde ekspresyon artışı devam

etmektedir. 7. günde ise ekspresyonun azaldığı görülmüştür. (Şekil 4.5.). Bu sonuç Strenkert ve diğerleri (2019) ile Bajhaiya ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmalar ile sonucumuz uyuşmaktadır. MPA13 sekreatuar yolakta yer almaktadır hücre dışına atıldığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak CBLP primerleri kullanılmıştır. Ve tüm koşullarda ekspresyonu görülmektedir.

3.Kültür RT-PCR



Şekil 4.6. 3. Kültür fosfat açlığında gen ekspresyon analizi

3. kültür RT-PZR sonucu 1. ve 2. kültürden farklı sonuç vermiştir. Pozitif kontrol olarak kullandığımız PHOX geni çalışmadı ve istenilen sonucu vermemiştir. 3.kültürün yetiştirildiği laboratuardaki çalkalayıcı üzerinde bulunan florasan lambaların değişmiş olması kültürdeki hücrelerin büyümesini engellediğini düşünmekteyiz.

MPA4, MPA5, MPA7, MPA14 ve MPA15 genleri için literatür de bakıldığında her koşulda ekspresyonu görülmüştür ve fosfat eksikliğinde ekspresyonu değişmeyeceği düşünüldüğü için bizim çalışmamızda bakılmamıştır.

4.2.2. Metallofosfoesteraz genlerinin sülfat açlığı altında ekspresyon düzeylerinin RT-PZR ile belirlenmesi

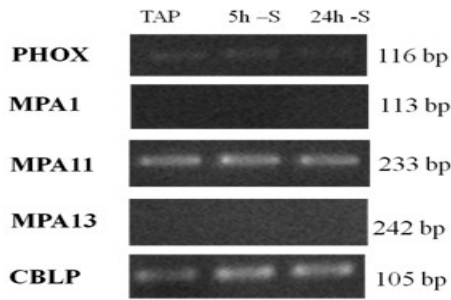
Fosfat açlığına bırakılan hücrelerin RT-PZR'ı yapıldıktan sonra ekspresyonu artan genlerden 5 tanesi seçilmiş ve sülfat açlığı çeken hücrelerin cDNA sı kullanılarak PZR kurulmuştur.

PHOX geni fosfat açlığında yapılan RT-PZR'da TAP' da yoktur ve 24 saat ve 48 saat açlıkta artmıştır. sülfat açlığında yapılan RT-PZR sonucunda ise artış yoktur ve TAP, 5h ve 24 h de eşit miktarda vardır.

MPA1 geni için bakıldığında fosfat açlığında ekspresyonda artış var iken sülfat açlığında yapılan RT-PZR sonucunda artış görülmemiştir.

MPA11 fosfat açlığında TAP da ekspresyonu vardır ve fosfat açlığında ekspresyonu artarken sülfat açlığında yapılan RT-PZR sonucunda hepsi eşit şekilde görülmektedir.

MPA13 geni için bakıldığında fosfat açlığında ekspresyonda artış var iken sülfat açlığında yapılan RT-PZR sonucunda artış görülmemiştir.



Şekil 4.7. Sülfat açlığında gen ekspresyon analizi

Fosfat açlığında gen ekspresyonu artan PHOX, MPA1,MPA11 ve MPA13 genleri ile kurulan sülfat açlığında yapılan RT-PZR sonucuna bakıldığı zaman bu genlerin fosfat yoksunluğuna spesifik olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.1. Fosfataz ve Fitaz olduğu düşünülen proteinlerin analizleri

Transkript ismi (Cre)	İsim	TM domain var / yok	Lokalizasyon	PI/MW	Signal peptid pozisyonu	Signal peptid dizisi	Motif analizi
Cre04.g216700	PHOX	Var	SP	5.11 / 159100.92	1-22	MAPRRVACAALAIVALAGVAQA	----
Cre08.g359300	PHO1	Var	SP	5.25 / 63065.89	1-35	MSRHHQPRAGSALASSLLAAALLTSWAAAPASA	----
Cre05.g239850	PHOD	Yok	SP	8.64 / 90139.97	1-23	MATSSVARGCLAYCALLALYAVALTSG	----
Cre07.g321350	PHOD2	Var	O	5.70 / 65673.68	----	----	----
Cre03.g146207	MPA1	Yok	SP	6.35 / 43388.12	1-24	MMMQRKSLLLAVAALAALAVCASA	GNHD
Cre12.g500200	MPA2	Yok	SP	4.58 / 70226.11	1-21	MAPRALLVLLALLQLGACAFA	GNHE
Cre02.g144900	MPA4	Var	SP	5.90 / 71002.80	1-20	----	GNHE
Cre03.g152900	MPA5	Yok	O	5.52 / 51083.33	----	----	GNHD
Cre03.g185200	MPA6	Yok	C	6.02 / 44482.32	----	----	GNHE
Cre06.g259650	MPA7	Var	O	5.86 / 47919.86	----	----	GNHD
Cre11.g468500	MPA8	Var	SP	5.66 / 75294.62	1-28	MAPKAGVWPPVLLPLLVGAAFTAPVLG	GNHE
Cre11.g476700	MPA9	Yok	SP	6.25 / 69228.13	1-22	MAQSRLALALSALVLA AAVVNA	ANHE
Cre12.g525550	MPA10	Var	O	7.92 / 37189.21	----	----	----
Cre13.g578350	MPA11	Yok	SP	6.04 / 69739.47	1-22	MAYSRLVLALSALALAGVVVNA	ANHE
Cre16.g657450	MPA12	Yok	O	5.75 / 63723.64	---	----	GNHD
Cre16.g672250	MPA13	Var	SP	8.69 / 60849.56	1-20	MSRSVLSIAAALALFGAAHA	GNHE
Cre17.g718800	MPA14	Yok	O	8.42 / 43786.73	---	----	GNHE
Cre17.g729650	MPA15	Yok	M	6.04 / 60588.55	---	----	GNHD

Çizelge 4.2. Fosfataz ve fitaz genlerinin ekspresyon sonuçlarının özet

Fosfat açlığında ekspresyonu artan genler	Fosfat açlığında ekspresyonu değişmeyen ve ekspresyonu gösterilemeyen genler
PHOX	MPA6 (ekspresyon aynı)
PHO1	MPA10 (ekspresyon yok)
PHOD	
MPA1	
MPA2	
MPA8	
MPA9 (artış çok az)	
MPA11	
MPA12	
MPA13	

5. SONUÇLAR

Çalışmamızda Phytozome veritabanında Blast ve keyword araştırması yapılarak *C. reinhardtii* genomunda bulunan fosfataz (*PHOX*, *PHOD* ve *PHOI*) ve metallofosfoesteraz (*MPA*) genleri tespit edilerek sekansları (gen ve protein) alınmıştır.

Literatürde bu genlerden *PHOX* üzerine yapılmış fonksiyonel çalışmalar bulunmaktadır fakat diğer genler üzerine yapılmış çalışma bulunmamaktadır. *PHOX* (alkalin fosfataz) proteini fosfat eksikliği altında sentezlendikten sonra hücrede bir membrana lokalize olan ve *C. reinhardtii*'nin fosfat besin maddesi eksikliğine aklimasyonunda görev alan önemli bir proteindir (Quisel vd. 1996). Phytozome veritabanında *MPA* olarak adlandırılan genlerden bazıları fitaz (*MPA9*, *MPA11*, *MPA13*), bazıları metallofosfoesteraz (*MPA1*, *MPA2*, *MPA6*, *MPA15*), bazıları mor asit fosfataz (*MPA8*), bazıları fosfoesteraz (*MPA10*, *MPA12*, *MPA5*, *MPA7*) ve son olarak da protein fosfataz (*MPA4*, *MPA14*) olarak anote edilmişlerdir. Fakat bu gen modellerinin gerçekten işlevsel oldukları bilinmemektedir. Çalışmamızda bu genlerin gerçekte aktiviteye sahip olduklarının ve fosfat eksikliğine toleransında rol aldıklarının belirlenmesi için mRNA düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Böylece *MPA* genlerinin aktivitelerinin araştırılması ile hem temel bilimsel araştırma alanına hem de *C. reinhardtii*'nin biyoteknolojide kullanım potansiyelinin araştırılmasına katkıda bulunmak hedef alınmıştır.

Fitaz enzimi spesifik olarak fitik asitteki fosfatı hidrolize ederek fosfatı alınabilir forma getirir. Zamanımızda fitaz aktivitesi olan bakteriler doğadan izole edilmekte ve biyogübre etkinlikleri araştırılmaktadır (Kumar vd. 2013; Liu vd. 2018). Fitaz enzimlerinin biyoteknolojide diğer kullanım alanları da vardır, örneğin hayvan yemlerine eklenerek tahıl tanelerinde depolanmış olan fitik asitin yapısında bulunan fosfatı kullanılabilir hale getirmektedirler (Vohra vd. 2003). Bu yüzden fitaz sentezleyen mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu önem taşımaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada *C. reinhardtii*'de *MPA* olarak adlandırılan genlerin analizi yapılmıştır.

RT-PZR sonuçlarına göre *MPA1* ve *MPA2* genlerinin normal koşullarda (TAP besiyeri) ekspresyonu görülmezken fosfatsız besi ortamında ekspresyonları artmaktadır. Biyoinformatik tahmin analizlerinde lokalizasyonlarının sekratuvar yolakta olduğu ve transmembran domainlerinin olmadığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle hücre dışına salgılandıklarını düşünmekteyiz.

MPA11 geninin normal koşullarda ekspresyonu var iken fosfatsız besi ortamında daha da arttığı görülmüştür. Biyoinformatik tahmin analizlerinde lokalizasyon olarak sekratuvar yolakta olduğu tahmin edilmektedir ve transmembran domaini yoktur. Bu nedenle *MPA11*'in de hücre dışına atıldığını düşünmekteyiz.

MPA13 geninin normal koşullarda (TAP besiyeri) ekspresyonu görülmezken fosfatsız besi ortamında ekspresyonu görülmektedir ve lokalizasyon olarak sekratuvar yolakta yer alır. *MPA13*'ün transmembran domaini bulunmaktadır. Dolayısıyla *MPA13* proteininin hücre membranına veya lizozoma (vakuol) lokalize olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak MPA1, MPA2, MPA11 ve MPA13 (eğer MPA13 plazma membranında ise) proteinlerinin *C. reinhardtii*'nin biyogübre etkinliğinde rol olabileceğini düşünmekteyiz.

Bitkisel kaynaklı yemlerdeki fosforun büyük bir kısmı fitik asite bağlı (fitat) olup kanatlılar ve balıklar (fitaz enzimi yok) tarafından yararlanılamamaktadır. Bu nedenle kanatlı yemlerine fitaz ilavesi yapılmaktadır.

MPA6 ve *MPA8* genlerinin normal besi ortamında ekspresyonu olabilmektedir; bu da *C. reinhardtii*'de her koşulda fitaz enziminin bulunduğunu önermektedir. İlerideki çalışmalarımızda bu olası fitaz enzimlerinin sıcaklık ve pH optimalarının belirlenmesi planlanmaktadır.

Fitaz enzimleri biyoteknolojide önemli yere sahiptirler. *C. reinhardtii* *MPA* genleri gerçekten fitaz enzimlerini kodluyorsa biyoteknolojide kullanılabilirler. En başta *C. reinhardtii* biyogübre olarak kullanılabilir. Böylece topraktaki fitik asite bağlı fosfat kullanılabilir forma geçerek bitki büyümesine pozitif etki sağlayacaktır. Ayrıca bu genlerden rekombinant protein üretilerek biyoteknolojide yem katkı maddesi olarak kullanılabilirler. Bu çalışmada *C. reinhardtii* genomunda fitaz enzimlerini kodlayan genler tespit edilerek fosfatlı ve fosfatsız ortamda transkripsiyon düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca genlerin kodladığı olası proteinlerin hücredeki lokalizasyon tahminleri yapılarak biyoteknolojide hangi amaçlarla kullanılabilecekleri öngörülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen veriler ilerideki uygulamalı çalışmalar için ön hazırlık niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

- Akça,S.,Çelik,K., Aydın,H., Yıldız,G., Alagöz,H.,Yılmaz,A. 2010. Siroz Hastalarında Alkalen Fosfataz Üzozimlerinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi,*Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 8 (1), 015-022 .
- 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.
- 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.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K. *et al.* 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol* 37, 420–423.
- Alori, E.T., Glick, B.R., Babalola, O. O. 2017. Microbial Phosphorus Solubilization and Its Potential for Use in Sustainable Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8 (Article 971).
- Anonim 1: <https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw> [Son erişim tarihi: 01.05.2021].
- Anonim 2: https://web.expasy.org/compute_pi/ [Son erişim tarihi: 04.04.2021].
- Antonyuk SV, Olczak M, Olczak T, Ciuraszkiewicz J, Strange RW. 2014. The structure of a purple acid phosphatase involved in plant growth and pathogen defence exhibits a novel immunoglobulin-like fold. *IUCrJ*. Feb 28;1(Pt 2):101-9.
- Aydeniz, A . 1972. FOSFATIN TARIM İÇİN ÖNEMİ. *Bilimsel Madencilik Dergisi* , 11 (4) , 19-46 .
- Aydın, A. 1988. Doğu Karadeniz Bölgesi asit topraklarına kireç ilavesinin bazı besin elementlerinin elverişliliğine etkisi üzerinde bir araştırma. Atatürk Üniversitesi. Ziraat Fak. Toprak Anabilim Dalı, Erzurum (Yüksek Lisans Tezi).
- Bajhaiya AK, Dean AP, Zeef LA, Webster RE, Pittman JK. 2016. PSR1 Is a Global Transcriptional Regulator of Phosphorus Deficiency Responses and Carbon Storage Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* Mar;170(3):1216-34.
- Berikten, D. Kıvanç, M. 2018. Fitazlar: Çevreye Etkisi, Beslenme ve Biyoteknolojideki Önemi. *Akademik Gıda*, 16 (1) , 109-119.
- Çelik S. Y, Demir N, Demir Y. (2017). Serum Alkalen Fosfataz ve Asit Fosfataz Enzimlerinin Aktivileri Üzerine Lizinoprilin In-Vitro Etkisi. *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 13(1), 233 - 237.

- Çetin, G ve Traş, B.2015. Transmembran Taşıyıcı Proteinlerin Fenotipleri, *Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1(1): 19-25.
- Erkan, K. 2014. Mikrobiyal fitaz üretimine ve aktivitesine etkili parametrelerin belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 88s.
- Erkek, R, Ünlü, H. (2003). Fitaz Enziminin Etlik Piliçlerin Beslenmesinde Kullanımı *Dergipark Dergisi*, Hayvansal Üretim , 44 (2) .
- 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.
- 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.
- Grossman, A.R., Aksoy, M. 2015. Chapter 12 Algae in a Phosphorus-Limited Landscape. Annual Plant Reviews book series, Volume 48:337-374s.
- Harris, E. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1): 363-406.
- Harris, E. H., D. B. Stern, and G. B. Witman. 2009. “The Sexual Cycle.” In *The Chlamydomonas Sourcebook*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp.119–57.
- Harris, E., Stern, D.B., Witman, G. B. (Ed.). 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook* (2nd Ed.). Academic Press.
- Illmer, P., Schinner, F. 1995. “Solubilization of inorganic calcium phosphates - Solubilization mechanisms”. *Soil Biology and Biochemistry*, 27, pp.257–263.
- Kall L, Krogh A ve Sonnhammer E. L. L. 2007. Advantages of combined transmembrane topology and signal peptide prediction—the Phobius web server. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jul; 35(Web Server issue): W429– W432.
- Klabunde,T., Sträter,N., Fröhlich,R., Witzel,H., Krebs, B. 1996. Mechanism of Fe(III) – Zn(II) Purple Acid Phosphatase Based on Crystal Structures, *Journal of Molecular Biology*, 259(4), 737-748p.
- Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M. A., Sangwan, P., Kumar, P., Verma, A. K., & Agrawal, S. 2013. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29, 1361–1369.
- Liu, L., Li, A., Chen, J., Su, Y., Li, Y., & Ma, S. 2018. Isolation of a Phytase-Producing Bacterial Strain from Agricultural Soil and its Characterization and Application as

- an Effective Eco-Friendly Phosphate Solubilizing Bioinoculant. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*.
- Maga, J. A. 1982. Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance, and methods of analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 30 (1), 1-9.
- Moseley, J. L., Gonzalez-Ballester, D., Pootakham, W., Bailey, S., & Grossman, A. R. 2009. Genetic interactions between regulators chlamydomonas phosphorus and sulfur deprivation responses. *Genetics*, 181(3), 889–905.
- Moseley JL, Grossman AR (2009) Phosphorus limitation from the physiological to the genomic. In Stern DB, ed, The Chlamydomonas Sourcebook: Organellar and Metabolic Processes, **Vol 2** Academic Press, San Diego, pp 189–215.
- Moseley,J., Grossman, A.R. 2009. Chapter 6 - Phosphate Metabolism and Responses to Phosphorus Deficiency, The Chlamydomonas Sourcebook (Second Edition), Volume 2, 189-215 s.
- Mullaney, EJ, Ullah, AH. 2003. The term phytase comprises several different classes of enzymes. *Biochem Biophys Res Commun*. Dec 5;312(1):179-84.
- Özdemir, S. 2014. *Sera Organik Domates Yetistirciliğinde Chlorella vulgaris [Beijerinck]’in Biyogübre Olarak Kullanımının Bitki Gelişimi, Verim ve Meyve Kalitesi Üzerine Etkileri*. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir,
- Özdemir, S., Sukatar, A., & Öztekin, G. B. 2016. Chlorella vulgaris ü;retimi ve sera organik domates yetiştiriciliğinde biyogübre olarak kullanımının etkileri. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 22, 596–605.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*.
- Punta, Marco et al. 2012. “The Pfam Protein Families Database.” *Nucleic Acids Research*, 40(D1): D290–301.
- Richardson AE, Simpson RJ, George TS, Hocking PJ . 2009. Toprak fosforuna erişimi optimize etmek için bitki mekanizmaları. *Crop Mera Sci* 60 (2).
- Sarıçam, S., Müştak, H. 2015. Filogenetik Ağaçlandırma Metotları . *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 26 (2) , 58-64.
- Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. et al. 2013.Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus* 2, 587.
- Şat, İ.G. ve Keleş, F. 2004. Fitik Asit ve Beslenmeye Etkisi. *Gıda*, 29 (6): 405-409.
- 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. *Mol Biol Evol*. Dec;29(12):3625-39.

- Tunç, N. 2015. Mikroalglerin mikrobiyal gübre potansiyelinin buğday bitkisi kullanılarak belirlenmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 264s.
- Quisel, J. D., Wykoff, D. D., & Grossman, A. R. 1996. Biochemical Characterization of the Extracellular Phosphatases Produced by Phosphorus-Deprived *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*.
- Vohra A ve Satyanarayana T. 2003. Phytases: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, 23:1, 29-60.
- Vucenik I, Ramakrishna G, Tantivejkul K, Anderson LM, Ramljak D. 2005. Inositol hexaphosphate (IP6) blocks proliferation of human breast cancer cells through a PKCdelta-dependent increase in p27Kip1 and decrease in retinoblastoma protein (pRb) phosphorylation. *Breast Cancer Res Treat.* 2005 May;91(1):35-45.
- Zhao, J., Li, X. Qu, Y., 2006. Application of enzymes in producing bleached pulp from wheat straw. *Bioresource Technology*, 197: 1470-1476.
- Wang, Z. T., Ullrich, N., Joo, S., Waffenschmidt, S., & Goodenough, U. 2009. Algal lipid bodies: Stress induction, purification, and biochemical characterization in wild-type and starchless *chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1856–1868.
- Xu, Dong, and Ruth Nussinov. 1998. “Favorable Domain Size in Proteins.” *Folding and Design*, 3(1): 11–17.

ÖZGEÇMİŞ

Gizem Hatice HAVUTCU

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2018-2021	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi
2014-2018	Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Aydın