

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASİDİK VE ALKALİ SULARIN
Daphnia magna'da TELOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE TRANSKRİPTOMİK VE
PROTEOMİK SEVİYEDEKİ ETKİLERİ**

Aslı ÇETİN

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

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASİDİK VE ALKALİ SULARIN
Daphnia magna'da TELOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE TRANSKRİPTOMİK VE
PROTEOMİK SEVİYEDEKİ ETKİLERİ**

Ash ÇETİN

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

HAZİRAN 2025

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASİDİK VE ALKALİ SULARIN
Daphnia magna'da TELOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE TRANSKRİPTOMİK VE
PROTEOMİK SEVİYEDEKİ ETKİLERİ

Ash ÇETİN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu Tez Akdeniz Üniversitesi Strateji Geliştirme Daire Başkanlığı tarafından FYL-
2023-6490 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASİDİK VE ALKALİ SULARIN
Daphnia magna'da TELOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE TRANSKRİPTOMİK VE
PROTEOMİK SEVİYEDEKİ ETKİLERİ

Aşlı ÇETİN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 16/06/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kemal KARABAĞ	
Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR	
Prof. Dr. Deniz EKİNCİ	

ÖZET

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ASİDİK VE ALKALİ SULARIN *Daphnia magna*'da TELOMERAZ ENZİMİ ÜZERİNE TRANSKRİPTOMİK VE PROTEOMİK SEVİYEDEKİ ETKİLERİ

Aslı ÇETİN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Haziran 2025; 72 sayfa

Bu yüksek lisans tezinde, tatlı su kabuklusu *Daphnia magna*'nın farklı pH ortamlarında telomeraz gen ekspresyonuna verdiği moleküler yanıtlar araştırılmıştır. Telomeraz enzimi, hücresel yaşlanma ve genetik istikrar açısından büyük öneme sahiptir. Telomerlerin kısalmasını önleyen bu enzimin çevresel stres koşullarında nasıl davrandığı, özellikle model organizmalar üzerinden incelendiğinde biyolojik yaşlanma süreçlerine dair önemli ipuçları sunabilir. Bu bağlamda *Daphnia magna*, hem genomik yapısı hem de çevresel değişkenlere karşı verdiği tepkiler bakımından bu tür araştırmalar için uygun bir model organizmadır.

Çalışma kapsamında üç farklı pH ortamı oluşturulmuştur: asidik (pH 5.90), bazik (pH 10.13) ve nötr-kontrol (pH 8.33). Bu ortamlarda 21 gün boyunca yetiştirilen *Daphnia magna* bireylerinden elde edilen RNA örnekleriyle telomeraz genine ait altı farklı ekzon bölgesinin (P1–P6) göreceli gen ifade düzeyleri RT-qPCR yöntemiyle analiz edilmiştir. Deney aynı zamanda bireylerin sağkalım oranlarını ve yaşadıkları ortamın pH dengesine etkilerini de değerlendirmeyi amaçlamıştır.

Daphnia magna bireylerinin yaşadığı ortamın pH'ını zamanla dengeleyebilme eğiliminde olduğunun saptanmasıdır. Hem asidik hem de bazik ortamlarda, ortam pH'ı zamanla nötr değerlere yaklaşmış, bu da organizmaların homeostatik bir dengeleyici rol oynayabileceğini göstermiştir. Sağkalım analizleri sonucunda, asidik ortamda bireylerin hayatta kalma oranının %7.2'ye kadar düştüğü, bazik ortamda bu oranın %12.0 olduğu, kontrol grubunda ise %9.6 ile en yüksek değere ulaştığı görülmüştür. Bu bulgular, özellikle asidik ortamların *Daphnia magna* için daha stresli ve ölümcül olabileceğini ortaya koymaktadır.

Gen ekspresyon analizleri, çevresel pH'ın telomeraz gen aktivitesi üzerinde doğrudan etkili olduğunu göstermiştir. En çarpıcı sonuçlardan biri, Primer 3 ile temsil edilen üçüncü ekzon bölgesinin hem asidik hem bazik ortamlarda anlamlı şekilde yüksek ekspresyon göstermesidir. Bu durum, P3 bölgesinin pH stresine karşı duyarlı ve belki de adaptif bir yanıt üreten gen bölgesi olabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, Primer 5 bölgesinin gen ekspresyon düzeyi oldukça düşük kalmış, farklı gen bölgelerinin çevresel koşullara farklı tepkiler verdiği anlaşılmıştır. Ayrıca, kontrol grubundaki genel gen ekspresyon düzeylerinin hem asidik hem de bazik gruplara göre anlamlı şekilde

düşük olması, ekstrem pH koşullarının telomeraz gen aktivasyonunu artırdığını göstermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması çevresel stresin özellikle pH değişimlerinin, telomeraz gen ailesi düzeyinde farklı tepkiler yarattığını ortaya koymakta; *Daphnia magna*'nın bu tepkilere hem genetik hem fizyolojik düzeyde yanıt vererek adaptasyon yeteneğini sergilediğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, bu organizmanın telomer biyolojisi ve çevresel genom araştırmaları açısından değerli bir model organizma olduğunu güçlü biçimde desteklemektedir.

ANAHTAR KELİMELEER: Çevre stresi, *Daphnia magna*, Gen Ekspresyonu, Telomeraz

JÜRİ: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Doç. Dr. Demir ÖZDEMİR

Prof. Dr. Deniz EKİNCİ

ABSTRACT

TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATION OF ACIDIC AND ALKALINE WATERS ON TELOMERASE ENZYME IN *Daphnia magna*

Ash ÇETİN

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

June 2025; 72 pages

This master's thesis investigates the molecular responses of the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* to varying environmental pH levels, with a specific focus on telomerase gene expression. The telomerase enzyme plays a crucial role in cellular aging and genomic stability by preventing telomere shortening. Understanding how this enzyme behaves under environmental stress conditions may offer significant insights into biological aging processes, particularly when studied through model organisms. In this context, *Daphnia magna* stands out as a promising model due to its genomic structure and sensitivity to environmental changes.

Three different pH environments were established for the study: acidic (pH 5.90), basic (pH 10.13), and neutral-control (pH 8.33). *Daphnia magna* individuals were cultured in these environments for 21 days. RNA samples were collected and analyzed using RT-qPCR to assess the relative expression levels of six distinct exon regions (P1–P6) of the telomerase gene. In addition to gene expression analysis, survival rates and the organisms' effect on environmental pH homeostasis were evaluated.

One of the key findings of the study is that *Daphnia magna* individuals demonstrated a tendency to regulate the pH of their surrounding environment. Over time, both acidic and basic conditions approached more neutral values, suggesting that the organisms may play a homeostatic role in environmental buffering. Survival analysis showed significant differences among the treatment groups: the survival rate dropped to as low as 7.2% in the acidic group, while it was 12.0% in the basic group and 9.6% in the control group. These results indicate that acidic conditions are particularly stressful and lethal for *Daphnia magna*.

Gene expression analysis revealed that environmental pH directly influences telomerase gene activity. One of the most striking results was that the third exon region, represented by Primer 3, exhibited significantly higher expression under both acidic and basic conditions. This suggests that the P3 region may be particularly responsive—and possibly adaptive—to pH stress. In contrast, Primer 5 showed consistently low expression levels, indicating that different exon regions within the telomerase gene family respond differently to environmental conditions. Notably, overall gene expression levels in the control group were significantly lower than in the acidic and basic groups, demonstrating that extreme pH conditions enhance telomerase activation.

In conclusion, this thesis demonstrates that environmental pH fluctuations have a significant impact on telomerase gene expression in *Daphnia magna*. The study highlights that certain regions within the telomerase gene family exhibit heightened sensitivity to environmental stress, suggesting potential regulatory functions. Moreover, the organism's ability to buffer environmental pH indicates a broader role in maintaining ecological homeostasis. These findings strongly support the suitability of *Daphnia magna* as a model organism for research in telomere biology and environmental genomics.

KEYWORDS: *Daphnia magna*, Environmental stress, Gene Expression, Telomerase

COMMITTEE: Prof. Dr. Kemal KARABAĞ

Assos. Prof. Dr. Demir ÖZDEMİR

Prof. Dr. Deniz EKİNCİ



ÖNSÖZ

Yüksek lisansa başladığım günden bu yana geçen tez süreci, yalnızca bilimsel bir yolculuk değil; aynı zamanda hayatın zorlukları karşısında direnç göstermeyi, sabretmeyi ve her koşulda ilerlemeyi öğreten derin bir kişisel gelişim süreci olmuştur.

Bu süreçte, tez konumu belirlerken fikirlerime değer veren, bana yol gösteren ve üzerimde büyük emeği olan çok kıymetli ilk danışmanım, merhum Doç. Dr. Ercüment AKSAKAL'a en derin saygı ve şükranlarımı sunuyorum. Tezimin tamamlanmasında bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan, desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Prof. Dr. Kemal KARABAĞ'a ve laboratuvar sürecinde her zaman yanımda olan, desteğiyle süreci kolaylaştıran kıymetli arkadaşım Dr. Berkant İsmail YILDIZ'a gönülden teşekkür ederim.

Aynı zamanda, iş hayatına adım attığım andan itibaren bana yol gösteren, ilham kaynağı olan ve destekleriyle her zaman yanımda bulunan başta Özgür BASMACI ve Gamze YILDIRIM ŞENEL'e ve her koşulda yanımda durarak beni destekleyen kıymetli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının hayata geçirilmesinde maddi ve bilimsel katkı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne de içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	6
2.1. Telomer	6
2.2. Telomeraz Enzimi	7
2.3. Telomeraz Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar	8
2.4. <i>Daphnia magna</i> 'nın Sınıflandırılması.....	10
2.5. <i>Daphnia magna</i> Biyolojisi	11
2.5.1. Fizyolojisi	11
2.5.2. Üremesi ve gelişmesi.....	12
2.5.3. Beslenmesi.....	14
2.5.4. Dolaşım sistemi	15
2.5.5. İmmün sistemi	15
2.6. <i>Daphnia</i> 'nın Model Organizma Olarak Kullanımı	15
2.6.1. Ekolojik ve çevresel önemi.....	16
2.6.2. Toksikoloji ve ekotoksikoloji çalışmalarında kullanımı	16
2.6.3. Genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında önemi.....	16
2.6.4. Yetiştirilme avantajı	16
2.7. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	16
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Araştırma yeri	20
3.1.2. Tez çalışmasında kullanılan kitler	20
3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	21
3.2. Metot	22

3.2.1. <i>Daphnia magna</i> kültürü ve deneme dizaynı	22
3.2.2. Akvaryumdaki ve beherdeki <i>Daphnia</i> 'ların beslenmesi	22
3.2.3. Deneme gruplarının hazırlanması	23
3.2.4. <i>Daphnia magna</i> 'nın kalp atım sayısının hesaplanması	25
3.2.5. Primerlerin tasarlanması	26
3.2.6. <i>Daphnia magna</i> 'dan RNA izolasyonu	27
3.2.7. RNA'nın kantitatif tayini	29
3.2.8. cDNA sentezi	29
3.2.9. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışmaları	31
3.2.10. Proteomik analizler	33
3.2.11. İstatistiksel analizler	35
4. BULGULAR	37
4.1. pH Koşullarına Bağlı Fizyolojik ve Çevresel Gözlem Bulguları	37
4.1.1. Deney ortamında <i>Daphnia magna</i> canlılık takibi	37
4.1.2. <i>Daphnia magna</i> 'ların sağkalım eğrileri	38
4.1.3. Ortam pH değişim analizi	40
4.1.4. pH değişim miktarları (1. Gün – 21. Gün)	43
4.2. Moleküler Analiz Bulguları	45
4.2.1. Telomerazın proteomik seviyede analizi	51
4.2.2. Telomeraz gen ifade düzeyleri	51
4.2.3. Gen bölgesi bazında ekspresyon farklılıkları	54
4.2.4. pH grupları arası gen ekspresyon farklılıkları	58
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	62
7. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Farklı Konsantrasyonlardaki Asidik ve Alkali Suların *Daphnia magna*’da Telomeraz Enzimi Üzerine Transkriptomik ve Proteomik Seviyedeki Etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

...../...../2025

Aslı ÇETİN

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç	: baz çifti
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
ddH ₂ O	: Çift distile su
g	: Göreceli santrifüj kuvveti
L	: Litre
N	: Normalite
M	: Molar
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
sn	: Saniye
µl	: Mikrolitre
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

Kısaltmalar

ANOVA	: Varyans Analizi
Bpm	: Dakikadaki Kalp Atış Hızı
CNV	: Kopya Sayısı Tayini
Ct	: Eşik Döngüsü
Cq	: Kantitasyon Döngüsü
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dsDNA	: Çift Sarmallı DNA

ABD EPA	: Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
FRTA	: Serbest Radikal Teorisi
HCl	: Hidrojen Klorür
HRM	: Yüksek Çözünürlüklü Erime
NaOH	: Sodyum Hidroksit
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	: Kantitatif PCR
RNA	: Ribonükleik Asit
mRNA	: Mesajcı RNA
RT-PCR	: Ters Transkripsiyon PCR
Rpm	: Dakikadaki devir sayısı
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
Taq	: Thermus Aquaticus
vb	: ve benzeri
vd	: ve diğerleri

Tezde ondalık yazım olarak (.) kullanılmıştır (Örn. “21.01”).

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Telomeraz tarafından terminal primer probleminin çözülmesi (Snustad ve Simmons (2003)'dan uyarlanmıştır)	6
Şekil 2.2. Telomer uzaması ve Shelterin Kompleksinin yapısı (Townesley vd. 2014'ten uyarlanmıştır)	7
Şekil 2.3. <i>Daphnia</i> cinsi su pirelerinin en yaygın türler; a) <i>Daphnia magna</i> (Ebert 2006); b) <i>Daphnia cucullata</i> (Drabiniok 2021); c) <i>Daphnia pulex</i> (Ebert 2022); d) <i>Daphnia longispina</i> (Drew 2017)	11
Şekil 2.4. Dişi bir <i>Daphnia</i> 'nın diagramatik anatomisi; 1) Frontal organ; 2) Özefagus; 3) Anten adüktör kası; 4) Anten; 5) Anten levatör kası; 6) Kalp; 7) Yumurtalık; 8) Kuluçka kesesi; 9) İnce kabuklu yumurtalar; 10) Abdominal çıkıntılar; 11) Apikal iğne; 12) Post abdomen; 13) Post abdominal kanca (çift); 14) Anüs; 15) Rektum; 16) Karapaks; 17) Filtre kılları; 18) 2. ve 3. torasik ekler; 19) Kabuk bezi; 20) Maksilla (körelmiş); 21) Mandibul; 22) Ağız; 23) Labrum; 24) Antenül; 25) Rostrum; 26) Hepatik çeka; 27) Osellus veya nauplius göz; 28) Optik gangliyon; 29) Optik sinirli bileşik göz; 30) Ense veya boyun organı (Ward's Science 2021)	12
Şekil 2.5. Eşeysiz üreme ile oluşan yavru bireyleri serbest bırakan dişi <i>Daphnia</i> 'nın renklendirilmiş görüntüsü (Miss 2019).....	13
Şekil 2.6. Eşeyli üreme sonucunda oluşan yumurtalar a) İki yumurta içeren diyapoz halindeki epifiyum (Lass 2023); b) Epifiyum taşıyan <i>Daphnia magna</i> (Ebert 2005)	13
Şekil 2.7. <i>Daphnia magna</i> 'nın eşeyli ve partenogenetik üreme döngüsü (Ebert 2005'ten uyarlanmıştır)	14
Şekil 2.8. PCR döngüsel aşamaları (Mondal 2023'ten uyarlanmıştır)	17
Şekil 2.9. qPCR'da başlıca kullanılan floresan ışıma yapan boyalar ve TaqMan prob; a) SYBR Green boyasının diziden bağımsız olarak DNA ampikonlarına bağlandığında floresan miktarı artmaktadır (Fraga 2008'den uyarlanmıştır); b) EvaGreen boyası diziden bağımsız olarak çift sarmallı DNA'ya bağlanarak floresan ışıma vermektedir; c) TaqMan probda, 5' ucunda floresan raporlayıcı boya (reporter dye), 3' ucunda söndürücü molekül (quencher dye), ortasında ise hedef DNA dizisine özgü kısa bir oligonükleotid dizisi mevcuttur ve Taq polimeraz sentez sırasında 5'→3' ekzonükleaz aktivitesi ile karşısına çıkan probu parçalayıp 5' ucundaki floresan boyanın 3'ucundaki söndürücüden uzaklaşmasını sağlayarak floresans sinyali vermektedir (Butler 2005'ten uyarlanmıştır)	18
Şekil 3.1. Mikroskop altında <i>Daphnia magna</i> tür tayini yapılması.....	20
Şekil 3.2. Denemede kullanılan <i>Daphnia</i> 'ların akvaryuma alıştırma süreci	22

Şekil 3.3. <i>Chlorella vulgaris</i> 'in hassas terazide tartılması; a) Tartımdan önce kabın darasının alınması; b) 200 mg toz <i>Chlorella vulgaris</i> 'in tartılması.....	23
Şekil 3.4. Asit (A), kontrol (K) ve baz (B) beherlerde 7 günlük ön deneme yapılması ..	24
Şekil 3.5. Deneme süresince kullanılan pH değerleri ayarlanmış stok sular	24
Şekil 3.6. Asit, kontrol ve baz olmak üzere üçer tekerrürlü hazırlanan deney grupları..	25
Şekil 3.7. <i>Daphnia magna</i> 'nın mikroskop altında görüntülemeye önceki preparasyonu	25
Şekil 3.8. Ön denemeler sonunda rastgele seçilen <i>Daphnia magna</i> 'nın mikroskop altında kalp atımlarının belirlenmesi.....	26
Şekil 3.9. <i>Daphnia magna</i> 'dan RNA izolasyon çalışmaları	29
Şekil 3.10. İzole edilen RNA'nın saflığının ölçülmesi	29
Şekil 3.11. Gen ekspresyonu için qPCR hazırlığı.....	32
Şekil 4.1. Ön çalışmalarda farklı pH ortamlarında üçer gün arayla 21 süresince belirlenen canlı <i>Daphnia magna</i> sayıları	38
Şekil 4.2. Asit, baz ve kontrol gruplarında 21 gün boyunca hayatta kalan <i>Daphnia magna</i> bireylerinin sayıları	39
Şekil 4.3. Kaplan-Meier benzeri sağkalım eğrileri, grup düzeyindeki özet verilere dayanarak simülasyon temelli oluşturulmuş olup, farklı pH koşullarında (asidik, bazik ve kontrol) yetiştirilen <i>Daphnia magna</i> bireylerinin 21 günlük deney süreci boyunca hayatta kalma olasılıklarını göstermektedir. Bazik ortam (mavi) en yüksek hayatta kalma olasılığına sahiptir. Kontrol (yeşil) ikinci sıradadır. Asidik ortam (kırmızı) en düşük sağ kalım oranlarını göstermektedir	40
Şekil 4.4. 21 gün boyunca Asidik (A), Bazik (B) ve Kontrol (K) gruplarındaki su pirelerinin bulundukları ortamda pH değerlerinin değişim grafiği.....	43
Şekil 4.5. Her gün için üç grubun pH dağılımını gösteren boxplot	44
Şekil 4.6. Asit, baz ve kontrol grubunda 21 günlük deney sonunda ortalama pH değerleri.....	44
Şekil 4.7. <i>Daphnia magna</i> telomeraz transkriptlerinin RT-qPCR sonuçları	46
Şekil 4.8. Asit beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; a) Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; b) Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; c) Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; d) Primer x4-	

XM_045169747.1 amplifikasyonu; e) Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; f) Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu.....47

Şekil 4.9. Baz beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; a) Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; b) Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; c) Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; d) Primer x4- XM_045169747.1 amplifikasyonu; e) Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; f) Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu.....48

Şekil 4.10. Kontrol beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; a) Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; b) Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; c) Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; d) Primer x4- XM_045169747.1 amplifikasyonu; e) Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; f) Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu.....49

Şekil 4.11. β -aktin RT-qPCR sonuçları; a) Asit beherdeki β -aktin amplifikasyonu; b) Baz beherdeki β -aktin amplifikasyonu; c) Kontrol beherdeki β -aktin amplifikasyonu..50

Şekil 4.12. Telomeraz enziminin proteomik seviyede analizi 51

Şekil 4.13. Gen ve ortam etkileşimleri açısından telomeraz geninin 6 ekzon bölgesinin 3 farklı pH derecesine sahip su ortamında qPCR analizlerine göre hesaplanan gen ifade düzeyleri.....56

Şekil 4.14. Telomeraz geninin 6 ekzon bölgesinin (P1–P6) her biri için gen ifade düzeyleri.....57

Şekil 4.15. Üç farklı pH derecesinde yetiştirilen *Daphnia*'larda telomeraz gen ifade değerleri.....59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. WoRMS (World Register of Marine Species) göre <i>Daphnia magna</i> (Straus, 1820)'nın taksonomideki yeri.....	10
Çizelge 2.2. SYBR Green floresan boya, EvaGreen floresan boya ve TaqMan probun kıyaslaması.....	19
Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan hazır kitlelere ait bilgiler.....	20
Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler.....	21
Çizelge 3.3. Tez çalışması için tasarlanan <i>Daphnia magna</i> telomeraz transkriptlerine ait qPCR primer dizileri ve özellikleri	27
Çizelge 3.4. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri.....	30
Çizelge 3.5. Reverse-transcription reaksiyon bileşenleri.....	31
Çizelge 3.6. SYBR Green qPCR reaksiyon bileşenleri	32
Çizelge 3.7. qPCR cihaz protokolü.....	32
Çizelge 3.8. Telomeraz reaksiyon kurulumu	35
Çizelge 3.9. Telomeraz enzim aktivitesi qPCR reaksiyon kurulumu	35
Çizelge 3.10. Telomeraz enzim aktivitesi qPCR program kurulumu	35
Çizelge 4.1. Ön çalışmalarda farklı pH ortamlarında <i>Daphnia magna</i> 'nın sayımı sonuçları	37
Çizelge 4.2. Deneme gruplarında <i>Daphnia magna</i> 'nın 21 günlük canlılık takibi.....	38
Çizelge 4.3. Her grup için hayatta kalma oranlarının 5 günlük aralıklarla özetlenmesi.....	40
Çizelge 4.4. Asit, kontrol ve baz beherlerde 21 gün boyunca ölçülen 24 saatlik pH değişimler.....	42
Çizelge 4.5. Farklı pH gruplarına ait <i>Daphnia magna</i> 'larda ölçülen absorbans değerleri.....	45
Çizelge 4.6. Üç farklı pH derecesinde 21 gün yetiştirilen <i>Daphnia</i> 'larda telomeraz geninin 6 ekzon bölgesine ait qPCR sonuçları.....	52
Çizelge 4.7. Üç farklı pH ortamında yetiştirilen <i>Daphnia magna</i> 'ların telomeraz geni için hesaplanan $\Delta\Delta C_t$ değerleri.....	53

Çizelge 4.8. pH grupları birlikte değerlendirildiğinde hesaplanan tanımlayıcı istatistikler	54
Çizelge 4.9. Bölge bazında gen ifadelerinin normal dağılım testi sonuçları	54
Çizelge 4.10. Telomeraz gen ifade ortalamalarının çoklu karşılaştırma testi.....	55
Çizelge 4.11. pH grupları arası gen ifade verilerinin normal dağılım testi.....	58
Çizelge 4.12. Farklı pH gruplarında telomeraz gen ifadesi tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırmalar	58



1. GİRİŞ

Yaşlanma; biyolojik, genetik, çevresel ve sosyal faktörlerin karmaşık bir etkileşimi sonucu meydana gelmektedir. Sürekli ilerleyen ve durdurulamayan bu fizyolojik süreç, aslında Prokaryotlar, Protozoalar ve Algler dışında hemen hemen tüm canlılarda görülmektedir (Galloway 1993; Partridge 1993). Yaşlanma, zamanla normal fizyolojik fonksiyonların aşamalı olarak azalması şeklinde tanımlanmaktadır ve bu tür moleküler etkileşimler, hücresel işlev, doku yapısı ve sistemik fizyolojik denge gibi biyolojik sistemleri etkilemektedir. Bu süreç erken yetişkinlik döneminde başlayarak yıllar boyunca birçok zihinsel ve bedensel işlevlerin yavaş yavaş azalmasıyla devam etmektedir (Partridge ve Gems 2002; Partridge vd. 2002). Bu gerilemenin olumsuz etkileri, kısmen yaşa bağlı hastalıkların artmış insidansı olarak ortaya çıkmaktadır ve bu hastalıklar arasında kanser, kardiyovasküler hastalıklar, Alzheimer ve Tip 2 diyabet gibi hastalıklar bulunmaktadır (He ve Jasper 2014).

Yaşla ilgili değişikliklerin mekanizmaları hakkında 350'den fazla teori bulunmaktadır (Viña vd. 2007) ve her bir teori için çelişkili ve destekleyici kanıtlar sunulmuştur. Bunlar arasında Yaşlanma Teorisi (Weismann 1882), Serbest Radikal Teorisi (FRTA) (Harman 1956) ve DNA Hasarı Yaşlanma Teorisi (Gensler ve Bernstein 1981) yer almaktadır. Genel olarak yaşlanma teorileri, programlanmış yaşlanma ve hasar birikimi nedeniyle yaşlanma olmak üzere iki ana kategoriye ayrılabilir (Sergieiev vd. 2015). Bununla birlikte, hiçbir teori yaşlanma sürecini yeterince açıklayamamaktadır ve genellikle birbirleriyle çelişmektedirler. Bu, yaşlanmanın karmaşık doğasının yanı sıra yaşlanma sürecine neden veya sonuç olarak katkıda bulunan çoklu mekanizmaların olduğunu göstermektedir. Örneğin, hücresel makromoleküllerle oksidatif stres kaynaklı hasarın, yaşlanma ile ilişkilendirilen çoğu değişikliğin temel bir mekanizması olduğu uzun süre önce vurgulanmıştır (Praticò 2002). Oksidatif hasarın ilerleyici ve geri dönüşümsüz birikimi, bozulmuş fizyolojik işlevlere, hastalık insidansının artmasına ve yaşlanma sürecine potansiyel olarak etki edebilmektedir (Chen vd. 2001).

Şimdiye kadar gerontoloji üzerine yapılan araştırmalar tek bir hastalığa odaklansa da günümüzde bu alanda yapılan çoğu araştırmada, yaşlanmayı yavaşlatma, sağlıklı yaşama süresini uzatma ve yaşa bağlı hastalıkların önlenmesi üzerine odaklanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşım, 65 yaş üstü kişilerin yaklaşık %60'ının multimorbidite olarak isimlendirilen aynı anda birden fazla hastalıktan muzdarip olduğu gerçeğini açıkça göstermektedir (Tinetti vd. 2012; Fabbri vd. 2015).

Dünya genelinde yaşlı nüfusun (60 yaş ve üstü) hızla artmaya devam etmesi beklenmektedir. 2100 yılına kadar 60 yaş ve üstü kişilerin sayısının 2017'ye kıyasla üç katından fazla artabileceği tahmin edilmektedir (Birleşmiş Milletler 2017). Bu nedenle, yaşlanan bir nüfusun sosyo-ekonomik etkisi, yaşlanma sürecinin farklı yönlerini anlama konusuna önemli vurgular yapmış ve "sağlıklı yaşlanmayı" teşvik etme umuduyla yaşlıların toplumdaki rollerinin yeniden değerlendirilmesi ve sağlık hizmetleri ile sosyal destek sistemlerinin güçlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymuştur (Valenzano vd. 2017).

Moleküler açıdan bakıldığında ise hücresel yaşlanmada doğrudan rol oynayan yapılar telomerlerdir (Blasco 2007; Aubert 2008). Telomerler, kromozomların her iki

ucunda bulunmaktadır ve her hücre bölünmesi sırasında bir miktar kısalmaktadır. Telomerlerin korunması için de telomeraz aktivitesine gereksinim vardır.

Telomeraz, DNA’da üretilen; telomer kısalmasını durdurma, yavaşlatma ve yeniden uzatma gibi etkileri olan telomer uzunluğunun belirlenmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir. Yaşlanma süreci ve karsinogenez için de oldukça önemli bir enzimdir (Artandi ve DePinho 2010).

Telomeraz aktivitesi, gametlerde, kök hücrelerde ve tümör hücrelerinde gözlemlenmektedir. Yüksek ökaryotlarda somatik hücrelerin apoptoz geçirmeden önce çoğalma potansiyeli sınırlıdır ve yaklaşık 50-70 hücre bölünmesinin ardından yaşlanma (senesans) başlamaktadır. Böylece patolojik genetik anomalilerin oluşması önlenmektedir. Buna karşın, çoğu tümör hücresinde replikasyon potansiyeli sınırsızdır. Anomalilere karşı savunmayı atlatılabilen bu tümör hücreleri tipik olarak büyümeyi baskılayıcı ve apoptoz sinyallerinden kaçmaya yönelik gelişmiş proliferatif yetenekler sergilemektedirler. Bu özellikler, lokal bağışıklık ve anjiyojenik mikro çevrelerin manipülasyonunu yöneten mekanizmaların yanı sıra kanser hücrelerinin metastatik yayılımını teşvik edenleri de içeren kanserin ayırt edici özelliklerinden birkaçını oluşturmaktadır (Hannahan 2011).

Doku homeostasisinin bozulması ise organizmalarda ki çoğu patolojik olgunun ana nedenidir ve bu dejenerasyonlara yaşlanma da dahildir (Campisi ve d'Adda di Fagagna 2007). Werner, Hutchinson – Gilford ve Dyskeratosis Congenita (DC) gibi erken yaşlanma sendromları; yaygın olarak telomer kısalması, hızlı yaşlanma ve yaşam süresinin kısalması özelliklerini barındırmaktadır (Hofer vd. 2005). Yapılan bazı çalışmalardan elde edilen veriler sonucunda telomerazın, erken yaşlanmaya neden olan insan hastalıklarında veya normal yaşlanma sürecinde görülen kanser gibi diğer hastalıklarda gen terapisi olarak kullanımı ve tümör büyümesini engelleyen yeni ilaçların geliştirilmesi için potansiyel bir hedef olarak kullanımı önerilmektedir (Giardini vd. 2014).

Son yirmi yılda, yaşlanma mekanizmalarında ki düzenleyici süreçleri tanımlama ve karakterize etme konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Tüm proteomik ürünlerde olduğu gibi telomerazla ilgili yapılan çalışmaların da model organizmalar üzerinde yapılması gerekmektedir. Model organizmalar kullanılsaydı bu ilerlemelerin gerçekleşmeyeceğini belirtmek gerekmektedir. Yaşlanma süreçlerinin altında yatan moleküler mekanizmaların çoğu; maya (*Saccharomyces cerevisiae*), ipliksi solucan (*Caenorhabditis elegans*), meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) ve fare (*Mus musculus*) gibi model organizmalar kullanılarak karakterize edilmiştir (Evans vd. 2008; Valenzano vd. 2017). Ancak bu gerontolojik çalışmalarda "klasik" model organizmaların kullanımı sınırlamalarla doludur. Örneğin, mayanın tek hücreli yapısı sistematik yaşlanma çalışmalarını engellemektedir. Yetişkin ipliksi solucanları ve meyve sinekleri çoğunlukla mitoz sonrası hücrelerden oluştuğundan kök hücre yaşlanma çalışmalarında model organizma olarak kullanımları sınırlanmaktadır (Tissenbaum ve Guarente 2002). Ayrıca, DNA metilasyon mekanizmaları ya yoktur ya da insanlarla karşılaştırılamayacak kadar farklıdır. Bu da onların yaşlanma sürecinde DNA metilasyonunun rolünü araştırmak için kullanımlarını sınırlamaktadır. Farenin maksimum ömrü (> 3 yıl) uzun olduğu için, yaşam süresi ile ilgili çalışmalarda önemli ölçüde zaman ve kaynak gerektirmektedir (Valenzano vd. 2017). Bu nedenle; afrika turkuaz killi balığı

(*Nothobranchius furzeri*) (Harel vd. 2015), kahverengi planarya (*Dugesia tigrina*) (Dasheiff ve Dasheiff 2002), Çıplak kör fare (*Heterocephalus glaber*) (Ruby vd. 2018) ve su piresi (*Daphnia spp.*) (Hearn vd. 2018) gibi gerontolojik çalışmalarda kullanılan model organizmaların, yaşlanma sürecinin altında yatan farklı faktörlerin ortaya çıkarılmasında kullanılacak metodolojik yaklaşımları büyük ölçüde çeşitlendireceği ve böylece insanlar üzerindeki uygulamalarda potansiyel bir öneme sahip olacağı öngörülmektedir (Buffenstein vd. 2008; Constantinou vd. 2014).

Daphnia cinsi, Daphniidae familyasında bulunan, tatlı su kabukluları (Crustacea) arasında en çok bilinen canlılardanır. En yaygın kullanılan “su piresi” ismini ilk olarak Swammerdam (1669) vermiştir. Su piresi isminin verilmesinin üzerinden bir yüzyıl geçtikten sonra Mueller (1785) tarafından bilimsel isimleri olan *Daphnia* ismi verilmiştir. Su pireleri, tatlı su ekosistemlerinde önemli rollere sahiptirler.

Su piresi olarak adlandırılan *Daphnia*, göl ve göletler gibi tatlı su ekosistemlerinde yaygın olarak bulunan planktonik bir sucul omurgasız model organizmadır (Mergeay vd. 2006). Bu mikro kabuklular su içinde hareket ettirmelerini sağlayan özel organlar geliştirmişlerdir. İkinci anten takımını düzenli bir şekilde çırpma, bu mikro kabukluların karakteristik sıçramalarla yüzmelerine imkan tanımaktadır (Dodson vd. 1997). *Daphnia*'nın yüzmeye şekli vücut büyüklüğüne bağlıdır ve ayrıca ışık, su sıcaklığı, besin varlığı ve predatörlerin varlığı gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilmektedir (Ziarek vd. 2011). Pek çok çalışma, pestisitler, nanopartiküller, bakteriyel ürünler veya diğer kimyasalların yüzmeye davranışını değiştirebileceğini gösterdiği için çeşitli parametrelerin analizinde, toksisite değerlendirmesinde ve su kalitesi izlemesinde yeni bir metodolojik yaklaşım olarak kabul edilmektedir (Bownik 2017).

Daphnia, biyolojik araştırmalarda en eski ve en yaygın kullanılan model organizmalardan biridir (Ebert 2005). Hassas davranışsal ve fizyolojik tepkileri, farmasötikler dahil olmak üzere çeşitli çevresel faktörler ve kimyasal maddeler tarafından indüklenen etkilerin biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Bu özellikler, *Daphnia*'nın fenotipik plastisite, toksikoloji ve yaşam döngüsünün evrimi için uygun bir model organizma olmasına neden olmuştur. Ayrıca, su pireleri yaşlanma biyolojisi, ekoloji, çevre/toksikoloji, evrim ve üreme biyolojisi gibi farklı araştırma alanlarında da kullanılmıştır (Barata vd. 2005; Ebert 2005).

Ekolojik ve bilimsel araştırmalar açısından da oldukça önemlidirler. Boyutları ve dayanıklılık özellikleri sayesinde birçok ekotoksikoloji ve çevre araştırmasında model organizma olarak kullanılmaktadırlar. Bu nedenle doğa bilimcilerin ve deneysel biyologların çoğu zaman araştırma odağı olmuştur (Korovchinsky 1997). *Daphnia* cinsi, dünya genelinde kirleticilerin çevresel olarak izlenmesinde ve bazı ülkelerin devlet kurumları tarafından düzenleyici kriterlerin oluşturulmasında da oldukça önemlidir (örneğin, ABD EPA, Çevre Kanada Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Örgütü, Japonya Çevre Ajansı).

Daphnia, ekotoksikolojik testlerde yaygın olarak kullanılan hareketsiz bir model organizmadır. Toksisitenin belirlenmesi için genellikle canlılarda görülen ölüm ve hareketsizlik ana sonuçlar olarak kullanılsada, özellikle daha düşük seviyelerde bazı kimyasallar tarafından indüklenen ince değişikliklerin tespiti için *Daphnia* gibi daha duyarlı biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Daphnia türlerinden biri olan *Daphnia magna*, geniş bir yelpazede kullanılan birçok farmasötik ürünün toksisitesini değerlendirmek için en yaygın kullanılan model organizmalardan biridir. Bu farmasötikler arasında antibiyotikler, antikanser ilaçlar, antidepresanlar, anti-inflamatuar ilaçlar, beta-blokerler ve lipid düzenleyici ajanlar bulunmaktadır. Şu anda, Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) tarafından standardize edilen immobilitasyon ve ölümcüllük temelindeki *Daphnia* toksisite testleri, toksikolojik çalışmalarda başlıca kullanılan yöntemlerdir. *Daphnia* biyolojisinin detaylı analizi, yüzme davranışı gibi fizyolojik son noktaları ve yüzme hızı, kat edilen mesafe, sıçrama frekansı, kalp hızı, alınan miktar, beslenme hızı, oksijen tüketimi, göğüs bacaklarının aktivitesi gibi farklı parametreleri ayırt etmeye olanak tanımaktadır. Bu parametrelerin avantajı, OECD testleri kullanılarak fark edilmeyen daha düşük konsantrasyonlardaki farmasötikler tarafından oluşturulan subletal etkileri gözlemleme olasılığıdır. Ayrıca, test edilen ilaçların toksik etkileri, *Daphnia* toksisitesinin enzimatik ve enzimatik olmayan biyobelirteçleri kullanılarak değerlendirilebilmektedir (Tkaczyk vd. 2021).

Daphnia sp., 100'den fazla tatlı su plankton organizmasını içeren bir cinistir. Bakterileri, algleri, siyanobakterileri, protozoaları ve sudaki diğer küçük partikülleri süzerek beslenmektedir. Tatlı su rezervuarlarında birçok predator türün ve özellikle balıkların besin zincirini oluşturmaktadır. Ayrıca, *Daphnia*'lar algleri tüketmeleri nedeniyle su kalitesini iyileştirmektedirler (Dietrich vd. 2010). *Daphnia*'nın yaşam döngüsü, cinsel veya cinsel olmayan üreme şeklinde karakterize edilebilmektedir. Uygun koşullarda *Daphnia*, döngüsel partenogenez geçirmektedir (Ebert 2005; Tatarazako ve Oda 2007).

D. magna, vücut büyüklüğü, kısa yaşam döngüsü, yüksek üreme kapasitesi ve partenogenetik üreme gibi birçok avantaja sahiptir. Bu organizma, 0.5 mm ile 6 mm veya daha fazla büyüklükte olabilen, yetişkinlerin 5 ila 6 mm arasında değişebildiği en büyük herbivor kladoser türüdür. Vücut büyüklüğü, toksik bileşiklerin birikimini etkileyen önemli bir faktördür (Ebert 2005; Koivisto 1995). Diğer model organizmalara kıyasla *Daphnia*'ların küçük boyutu, bir deneme ortamında birçok organizmanın aynı anda kullanılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, partenogenetik üreme ve yüksek üreme kapasitesi, kısa süre içinde testler için gereken çok sayıda organizma elde etmeye olanak sağlamaktadır (Koivisto 1995).

Yüzey sularının pH değeri, suyun pH'sinin sucul yaşam üzerinde önemli bir etkiye sahip olması nedeniyle önemlidir. Çünkü suyun pH'si, sucul organizmaların su ile iyon alışverişi ve solunumu da dahil olmak üzere normal fizyolojik işlevlerini etkilemektedir. Bu önemli fizyolojik süreçler, çoğu sucul canlıda nispeten geniş bir pH aralığındadır (Quesada vd. 2019; Brezonik vd. 2020).

Yapılan bir çalışmada, tatlı su balıklarına doğrudan öldürücü olmayan pH aralığı 5.0-9.0 olarak tanımlanmıştır. Birkaç istisna dışında, 6.5 ile 9.0 arasındaki pH değerleri, balıklar ve diğer tatlı su sucul yaşam için uzun vadeli olarak tatmin edici kabul edilmektedir. Balıkları da içeren çoğu iç tatlı suyun pH değeri yaklaşık olarak 6 ile 9 arasında değişmektedir. Özellikle sağlıklı, çeşitli ve üretken balıklar ve büyük omurgasız topluluklarının bulunduğu suların pH değeri yaklaşık olarak 6.5 ile 8.5 arasında olmaktadır (Chowdhury ve Saikia 2020).

Sucul organizmaların pH değişikliklerine olan duyarlılığı, sucul ekosistemler arasında önemli ölçüde farklılık gösterebilmektedir. Su kütlelerindeki pH değişikliği, asit yağışları veya antropojenik NaOH sızıntıları nedeniyle olabilmektedir. NaOH, birçok endüstriyel ve evsel amaç için kullanılan, çok yüksek üretim hacmine sahip bir bileşiktir (dünya çapında tahmini talep yaklaşık 44 milyon tondur). Emisyon desenleri, kimyasal özellikleri (yüksek çözünürlük, düşük buhar basıncı), çevresel özellikleri (atmosferde hızlı nötralizasyon ve temizlenme, toprakta nötralizasyon) nedeniyle, yalnızca su içinde istenilen miktarlarda bulunması beklenmektedir. Diğer yandan, asit yağışları, atmosferdeki kirliliğin (kükürt dioksit ve azot oksit) kimyasal olarak değişip bulutlardaki su damlacıkları tarafından emilmesi sonucu oluşmaktadır. Yağış olduğunda damlacıklar yağmur, kar veya çiy olarak yere düşmektedir. Su damlacıklarındaki kirlenici kimyasallar, suyun içindeki hidrojen ve oksijen ile birleşerek bir asit oluşturmaktadır. Bu asidik damlacıklar ($\text{pH} < 5$), toprak asiditesini artırabilmekte ve göllerin ve akarsuların kimyasal dengesini etkileyebilmektedir. Aynı zamanda nehirlerin ve akarsuların asitleşmesine de katkıda bulunmaktadır (Thomas vd. 2022).

Zooplanktonlar, sucul ekosistemlerin besin zincirlerinde önemli bir basamaktır ve onların kaybolması veya azalması trofik ilişkileri büyük ölçüde etkileyebilmektedir. Asit yağışlarının ardından yapılan araştırmalarda zooplankton yoğunluğunda azalmalar olduğu bildirilmiştir (Kagzi vd. 2022). Yapılan diğer çalışmalarda *Daphnia pulex*'in pH 7'nin altında üreme potansiyelinin oldukça dar bir aralıkla sınırlandırılacağı ve gelişim sürecini tamamlayamayacağı bildirilmiştir (Ndah vd. 2022; Choi vd. 2023).

Daphnia magna'nın telomerleri de insanlarda olduğu gibi yaşlanmayla birlikte kısalmaktadır. Bu nedenle telomer biyolojisi için umut vadeden bir omurgasız model organizmadır. İnsanlarda olduğu gibi *Daphnia magna*'da da somatik hücrelerdeki telomeraz gen ekspresyonu telomer kısalmasını önlemek için yeterli değildir.

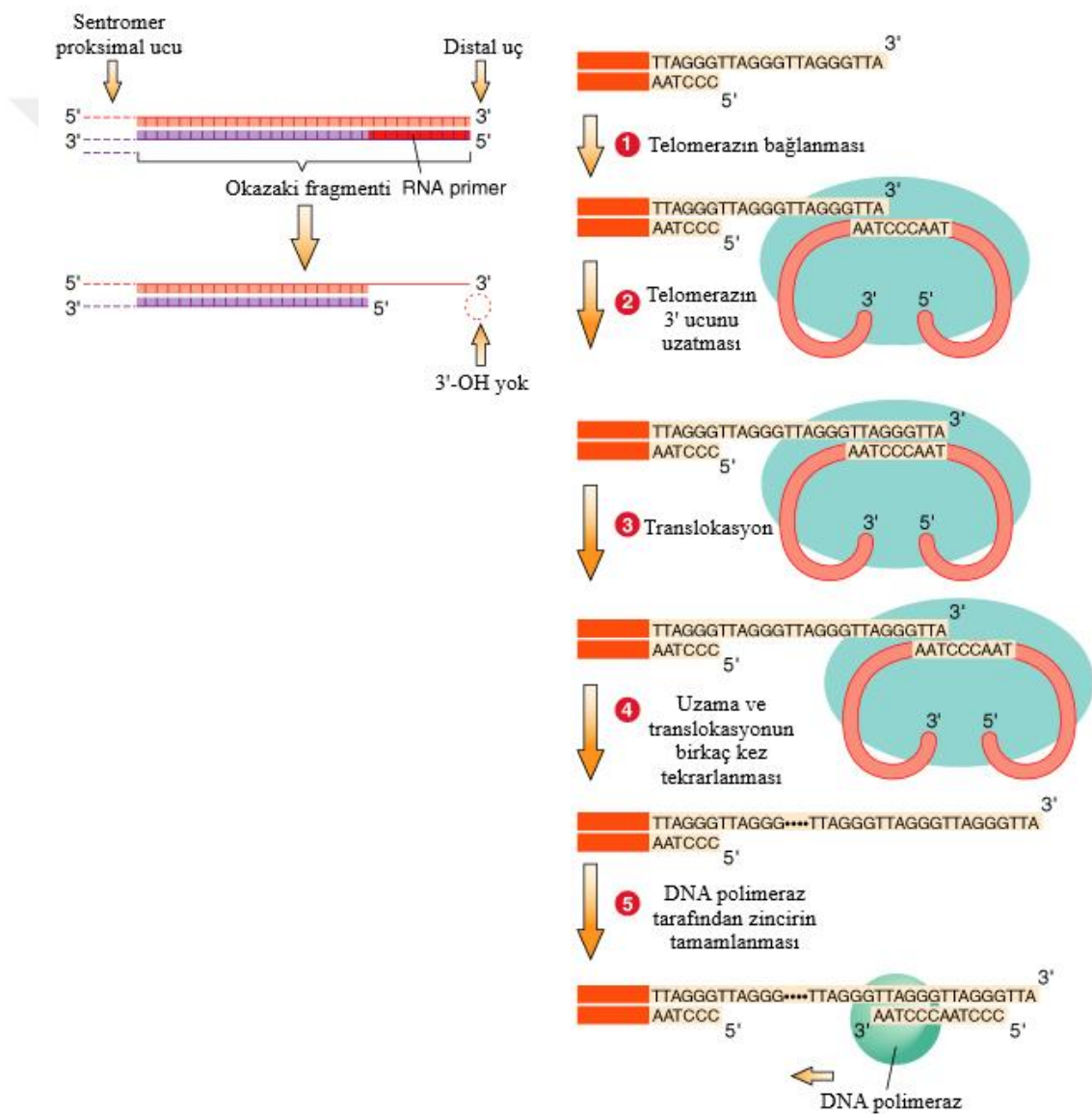
Daphnia magna'nın yaşadığı ortam olan su, tüm canlılar için majör ihtiyaçlardan biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, azaltılmış su alımının yaşlanmayla ilişkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca telomer uzunluğunun mikroçevresel pH değişimlerinden yüksek oranda etkilendiği bildirilmiştir. İnsan telomerazı, düşük pH'ye (6.8) maruz bırakıldığında seçici olarak kısa telomerleri uzatmaya yönlendirebilmektedir (Ge vd. 2016). Malign tümörlerin mikro çevresinin asidik olduğu iyi bilinmektedir ve tümör mikro çevresinin alkalileştirilmesi, tümör büyümesini ve ilerlemesini ciddi şekilde engelleyebilmektedir (Spugnini ve Fais 2017; Pillai vd. 2019). Telomerlerin kısalması, hücre apoptozisine veya yaşlanmasına yol açan kaçınılmaz bir DNA hasar yanıtını tetiklemektedir (Shay ve Wright 2007; Hemann vd. 2001). Telomerlerin kanser ve yaşlanmadaki kritik rolü açık gibi görünse de *in vivo* olarak telomerleri kısaltma veya uzatma mekanizmaları yeterince araştırılmamıştır (Shay ve Roninson 2004; Blasco 2005; Shammass 2011; Blasco 2007; Aubert 2008; Cawthon vd. 2003; Wentzensen 2011; Weischer 2013; Rode 2015; Aunan 2017). Bununla birlikte, alkalinize edilmiş suyun *in vivo* olarak farelerin yaşlanmasını geciktirdiği bildirilmiştir (Magro vd. 2016). Bu da alkalın suyun yaşlanma sürecini en azından yavaşlatmada önemli bir rol oynadığını desteklemektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, tamamlanan bu tez çalışmasında farklı pH değerlerindeki su ortamında yetiştirilen su pirelerin (*Daphnia magna*)'de telomeraz enzimini determine eden ekzonlar üzerine transkriptomik ve proteomik seviyede araştırmalar yapılmıştır.

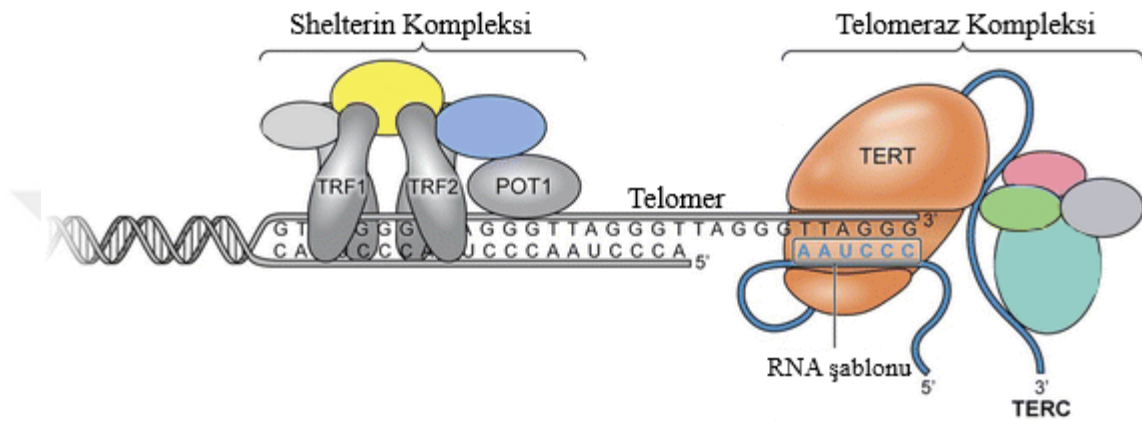
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Telomer

Tüm canlılarda hücre bölünmesi sırasında DNA'nın kendisini kopyalaması gerekmektedir. Hücrenin bölünme sonrasında oluşan yavru hücrelere aynı genetik bilgiyi aktarması olayına replikasyon denir. DNA replikasyonu sırasında lineer kromozomların uçlarında bir miktar kısalma meydana gelmektedir. Çünkü, lineer kromozomlarda ipliğin geride kalan uç DNA segmenti, DNA polimeraz tarafından replike edilememektedir. Bu durum, kesintili olarak replike edilen DNA'nın uç kısmında, Okazaki fragmentindeki RNA primer uzaklaştıktan sonra deoksiribonükleotidlerin polimerizasyonu için 3'-OH grubunun bulunmamasından kaynaklanmaktadır (Şekil 2.1).



İnsan telomeri “TTAGGG” tekrarlanan nükleotid sekanslarını içermektedir. Bu tekrarlanan sekans bölgesi, her hücre bölünmesinden sonra “replikasyon sonu problemi” nedeniyle oluşabilecek hasarlara karşı kromozomdaki önemli genetik bilgileri korumaktadır (de Lange 2002; Shay ve Wright 2000). Bu işlevinin yanı sıra, proteinlerle ilişkili olan ve guanin açısından zengin nükleotid dizilerinden oluşan telomerler, “Shelterin Kompleksi” adı verilen geniş protein dizileri için bağlanma bölgesi olarak da görev yapmaktadır (de Lange 2005). Shelterin kompleksi, telomerik tekrar dizilerine POT1, TRF1 ve TRF2 isimli DNA bağlayıcı proteinler sayesinde tutunmaktadır (Palm ve de Lange 2008) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Telomer uzaması ve Shelterin Kompleksinin yapısı (Townsend vd. 2014'ten uyarlanmıştır)

Telomerin işlevi bozulduğunda, ölümcül olabilecek bir DNA hasar yanıtı ortaya çıkabilmekte, DNA onarım aktiviteleri kromozom uçlarının bütünlüğünü tehdit etmekte ve geniş çapta genomik kararsızlık oluşabilmektedir. Ancak telomer uçlarının yapısının, DNA hasar bölgelerinden nasıl farklılaştığı ve telomerlerin DNA onarım aktivitelerinden kromozom uçlarını nasıl koruduğu tam olarak bilinmemektedir (Jin 2010; Cefalu 2011).

2.2. Telomeraz Enzimi

Replikasyon sonunda oluşan problemi çözecek özel bir enzime ihtiyaç duyulmaktadır. RNA içeren bu enzime “Telomeraz” denir. Telomeraz, DNA’da üretilen; telomer kısalmasını durdurma, yavaşlatma ve yeniden uzatma gibi etkileri olan telomer uzunluğunun belirlenmesinde rol oynayan önemli bir enzimdir. Şekil 2.2’de gösterildiği gibi telomeraz guanin bakımından zengin dizileri tanıyarak tekrarlama ünitesini 5’- 3’ yönünde uzatmaktadır. Telomeraz, birden fazla telomer tekrar ünitelerini ardışık olarak ekleyerek, DNA polimerazın tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlemesini katalizlemektedir. Telomeraz aktivitesinin olmaması durumunda her hücre bölünmesiyle birlikte lineer kromozomların sürekli kısalmaktadır ve kromozom uçlarındaki bu kısalma hayati öneme sahip bir geni kapsadığında ölümcül olması beklenmektedir.

Eşey hücrelerinin aksine çoğu somatik insan hücresinde telomeraz aktivitesi gözlenmemektedir (Shay ve Wright 2019; Liu 2016). Kültür ortamında yetişen insan

somatik hücreleri 20-70 hücre generasyonu olmak üzere sınırlı sayıda hücre bölünmesi geçirmektedir. Yaşlanma ve ölüm öncesindeki hücre bölünmesi ile telomer uzunluğu arasında bir korelasyon olduğu yapılan farklı hücre kültürü deneyleriyle saptanmıştır. Uzun telomerlere sahip hücreler kısa telomerlere sahip hücrelere kıyasla daha uzun süre yaşamıştır ve daha fazla hücre bölünmesi geçirmişlerdir. Telomeraz aktivitesi olmaması durumunda hücre bölünmesiyle birlikte hücrelerin yaşlanması ve telomer uzunluğunun kısılması beklenmektedir.

Telomeraz, yaşlanma süreci ve karsinogenez için de oldukça önemlidir (Artandi ve DePinho 2010). Telomeraz aktivitesi, gametlerde, kök hücrelerde ve tümör hücrelerinde gözlemlenmektedir. Yüksek ökaryotlarda somatik hücrelerin apoptoz geçirmeden önce çoğalma potansiyeli sınırlıdır ve yaklaşık 20-70 hücre bölünmesinin ardından yaşlanma başlamaktadır. Böylece patolojik genetik anomalilerin oluşması önlenmektedir. Buna karşın, çoğu tümör hücresinde replikasyon potansiyeli sınırsızdır. Anomalilere karşı savunmayı atlatabilen bu tümör hücreleri tipik olarak büyümeyi baskılayıcı ve apoptoz sinyallerinden kaçmaya yönelik gelişmiş proliferatif yetenekler sergilemektedirler. Bu özellikler, lokal bağışıklık ve anjiyojenik mikro çevrelerin manipülasyonunu yöneten mekanizmaların yanı sıra kanser hücrelerinin metastatik yayılımını teşvik edenleri de içeren kanserin ayırt edici özelliklerinden birkaçını oluşturmaktadır (Hanahan 2011). Kanser hücrelerinin kontrolsüz bölünmeleri sebebiyle, bilim insanları kanser hücrelerinde telomeraz aktivitesinin engellenmesinin kanseri yenmek için bir çözüm yolu olabileceğine inanmaktadır. Progeria adı verilen ve kalıtsal bir hastalık olan erken yaşlanma hastalığı üzerinde yapılan çalışmalar, telomer uzunluğu ile yaşlanma arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Hutchinsonson-Glifford Sendromu ileri düzeydeki bir progeria formudur ve semptomları doğumdan hemen sonra başlamaktadır. Bu sendromla doğan hastalar genellikle 10'lu yaşlarda ölmektedir. Daha hafif bir progeria formu olan Werner Sendromunda ise yaşlanma belirtileri ergenlik çağında başlamaktadır ve genellikle 40'lı yaşlarda ölüm görülmektedir. Progeria hastası olan insanlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda kültür ortamında çoğaltılan hücrelerin daha yavaş bölündüğünü ve daha kısa telomer uzunluğuna sahip olduğu gözlemlenmiştir.

2.3. Telomeraz Aktivitesi Üzerine Yapılan Çalışmalar

20. yüzyılın ilk yarısında Hermann Müller'in (Nobel Ödülü 1945) meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) üzerinde ve Barbara McClintock (Nobel Ödülü 1983) ise mısırda (*Zea mays*) çalışmalar yaparak kromozom uçlarında özel bir yapının olduğunu öne sürmüştür (Müller 1938; McClintock 1939). Telomerlerin keşfinin ardından telomeraz enzim aktivitesi ve telomer uzunluğu ile ilgili yapılan çalışmalar hızla artış göstermiştir. Carol W. Greider ve Elizabeth H. Blackburn 1987'de telomeraz ismini verdikleri yeni bir DNA polimeraz türü ve bu enzimin işlevini keşfetmişlerdir. Bu keşif sayesinde Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider ve Jack W. Szostak 2009 yılında Nobel Ödülü almışlardır (Varela ve Blasco 2009). Bu öncü çalışmalar sayesinde telomeraz aktivitesinin kanser biyolojisi, yaşlanma ve kök hücre biyolojisi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Telomer uzunluğunun ise biyobelirteç olarak kullanılması ve telomeraz aktivitesini hedefleyen tedavilerin geliştirilmesi üzerine birçok araştırma yapılmıştır.

Melandrium album (diğer adıyla *Silene latifolia*)'da telomer uzunluğu ve

telomerez aktivitesinin gelişimsel süreçlerde nasıl kontrol edildiğine ilişkin yapılan bir araştırmada telomer uzunluğunun bitkinin gelişimi boyunca sabit kaldığı, telomerez aktivitesinin en yüksek olduğu yerlerin ise aktif olarak bölünen dokular olduğu ve buna karşın olgun dokularda aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (Riha vd. 1998).

Arpa (*Hordeum vulgare*) ve mısır (*Zea mays*) bitkilerinde telomerez aktivitesinin gelişimsel değişimlerinin incelendiği başka bir çalışmada telomerez aktivitesinin embriyo gelişimiyle doğrudan ilişkili olduğu ve farklılaşma sürecinde ise baskılandığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, telomerezin kök apikal meristeminde bulunmaması sebebiyle, telomerez enzim aktivitesinin sadece belirli gelişim aşamalarında ve doku tiplerinde kritik bir rol oynadığı düşünülmektedir (Killan vd. 1998).

Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) karaciğer, deri, kalp, kas ve beyin gibi çeşitli dokularda telomerez aktivitesi incelenmiştir. İnsan hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında, balık dokularındaki telomerez seviyelerinin genellikle daha yüksek olduğu, özellikle böbrek ve karaciğerde 100 kata kadar arttığı bulunmuştur. Çalışmada ayrıca yaşlanma ile birlikte beyin ve kas dokularında telomerez aktivitesinin azaldığı gözlemlenmiştir (Klapper vd. 1998).

Lubna Nasir ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, köpeklerin insan telomer biyolojisi ve telomerez temelli kanser tedavileri için potansiyel bir model olup olmadığı araştırılmıştır. Telomerez aktivitesinin sadece belirli hücrelerde (tümör ve germ hücreleri) olması, köpeklerde telomer uzunluğunun insanlardaki gibi düzenlendiğini göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda köpeklerin telomer biyolojisinin insanlarınkine oldukça benzediği ve bu nedenle köpeklerin, telomerez ve telomer hedefli kanser tedavileri için uygun bir model olarak değerlendirilebileceği önerilmektedir (Nasir vd. 2001).

Henning Wege ve arkadaşları tarafından kısmi hepatektomi sonrası domuz karaciğerinde telomerez aktivitesinin nasıl değiştiğini incelemeyi amaçlayan bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada normal hepatositlerde telomerez aktivitesinin düşük seviyelerde olduğu, kısmi hepatektomi sonrası telomerez aktivitesinin 5 kat arttığı bulguları elde edilmiştir ve telomerez aktivitesinin mitotik hepatositlerin sayısı ile güçlü bir korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Karaciğer rejenerasyonu sırasında telomerez aktivitesinin artarak proliferatif hücrelerini telomer kısalmasına ve oksidatif strese karşı koruyabildiği sonucu elde edilmiştir (Wege vd. 2007).

Zebra balıklarında kalp rejenerasyonu sırasında telomerez aktivitesinin rolünün araştırıldığı bir başka çalışmada oluşan kalp hasarından sonra telomerez aktivitesinin hızla arttığı ve telomer uzunluğunun da geçici olarak uzadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda telomerezin kalp rejenerasyonu için kritik bir enzim olduğu ve telomerez eksikliğinin hücresel yaşlanmayı hızlandırarak rejenerasyonu engelleyebileceği gösterilmiştir (Bednarek vd. 2015).

2015 yılında bal arısı (*Apis mellifera*) türünde yapılan bir çalışmada sosyal kaslara göre telomerez aktivitesi ve telomer uzunluğu incelenmiştir. Kraliçe arılarda telomerez aktivitesi seviyesinin erkek ve işçi arıların somatik dokularındaki telomerez aktivitesinden daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kraliçelerin daha uzun ömürlü olmasının yüksek telomerez aktivitesi ile ilişkili olabileceği bu çalışma ile öne

sürülmüştür (Korandová ve Frydrychová 2016).

2.4. *Daphnia magna*'nın Sınıflandırılması

Su piresi (*Daphnia magna*), sistematik olarak hayvanlar aleminin (Animalia), eklembacaklılar (Arthropoda) şubesinin, bronşlular (Branchiopoda) sınıfının, Anomopoda takımında bulunan Daphnialar (Daphniidae) familyasında yer almaktadır. *Daphnia magna*'nın sınıflandırmasını ilk olarak 1820 yılında Straus yapmıştır (Çizelge 2.1). Daphniidae familyasına bağlı 6 cins bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla;

Daphnia O. F. Muller, 1785

Ceriodaphnia Dana, 1853

Scapholeberis Schoedler, 1858

Simocephalus Schoedler, 1858

Daphniopsis G. O. Sars, 1903

Megafenestra Dumont and Pensaert, 1983.

Daphnia cinsi, Daphniidae familyasında bulunan en yaygın cinstir. Bu cins, büyüklük, çeşitlilik ve yaygınlık açısından familyanın en geniş grubu olarak kabul edilmektedir. *Daphnia* cinsi, birçok farklı türü içerir ve tatlı su ekosistemlerinde küresel çapta geniş bir dağılıma sahiptir. *Daphnia* cinsi altında en yaygın görülen 4 tür bulunmaktadır (Şekil 2.3).

Çizelge 2.1. WoRMS (World Register of Marine Species) göre *Daphnia magna* (Straus, 1820)'nin taksonomideki yeri

Alem:	Animalia (Hayvanlar)
Şube:	Arthropoda (Eklembacaklılar)
Alt Şube:	Crustacea (Kabuklular)
Üst Sınıf:	Allotriocarida
Sınıf:	Branchiopoda (Bronşlular)
Alt Sınıf:	Pyhllopoda
Üst Takım:	Diplostraca
Takım:	Anomopoda
Familya:	Daphniidae (Daphnialar)
Cins:	<i>Daphnia</i>
Tür:	<i>Daphnia magna</i>



a)



b)



c)



d)

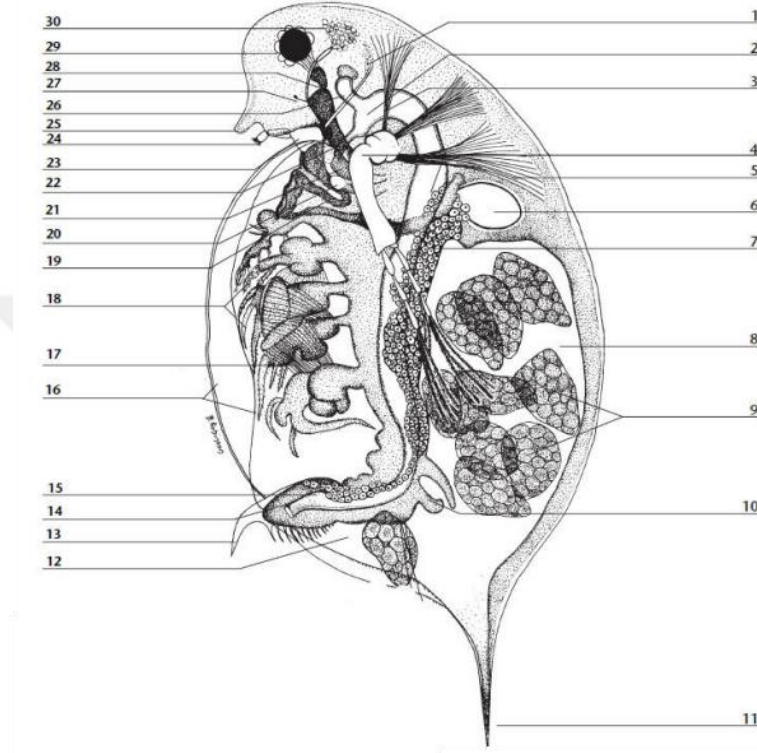
Şekil 2.3. *Daphnia* cinsi su pirelerinin en yaygın türler; **a)** *Daphnia magna* (Ebert 2006); **b)** *Daphnia cucullata* (Drabiniok 2021); **c)** *Daphnia pulex* (Ebert 2022); **d)** *Daphnia longispina* (Drew 2017)

2.5. *Daphnia magna* Biyolojisi

2.5.1. Fizyolojisi

Daphnia magna, Pyhllopoda alt sınıfına ait olan ve kalsifiye olmamış bir kabukla (karapaks) çevrelenmiş vücuda sahip küçük canlılardır. Karapaksın büyük bir kısmı polisakkarit yapıları bir bileşik olan kitinden oluşmaktadır. *Daphnia*, önden arkaya doğru sırasıyla antenüller, ikinci antenler (yüzme işlevi görmektedir), maksillalar ve mandibullarla birlikte toplam 10 çift uzva sahiptir. *Daphnia* türlerinin bazılarında 5, bazılarında ise 6 çift gövde uzvu mevcuttur. Bu uzuvlar genellikle beslenme ve solunum işlevleri için özelleşmişlerdir. Abdomende ise 1 çift kanca şeklinde yapı yer almaktadır. Vücut uzunlukları 0.5 mm ila 6 mm arasında değişiklik göstermektedir. Dişilerin vücut uzunluğu genellikle 6 mm'ye kadar, erkeklerin ise 2 mm'ye kadar ulaşmaktadır (Ebert

2005). Erkek *Daphnia* 'lar dişilere göre daha küçük boyutta olmalarına rağmen antenülleri daha büyüktür. Erkekler, modifiye olmuş post abdomen yapılarıyla ve çiftleşme sırasında dişiye kavrama işlevi gören kanca benzeri yapılara dönüşen birinci bacaklarıyla ayırt edilmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Dişi bir *Daphnia*'nın diagramatik anatomisi; 1) Frontal organ; 2) Özefagus; 3) Anten adüktör kası; 4) Anten; 5) Anten levatör kası; 6) Kalp; 7) Yumurtalık; 8) Kuluçka kesesi; 9) İnce kabuklu yumurtalar; 10) Abdominal çıkıntılar; 11) Apikal iğne; 12) Post abdomen; 13) Post abdominal kanca (çift); 14) Anüs; 15) Rektum; 16) Karapaks; 17) Filtre kılları; 18) 2. ve 3. torasik ekler; 19) Kabuk bezi; 20) Maksilla (körelmiş); 21) Mandibul; 22) Ağız; 23) Labrum; 24) Antenül; 25) Rostrum; 26) Hepatik çeka; 27) Osellus veya nauplius göz; 28) Optik gangliyon; 29) Optik sinirli bileşik göz; 30) Ense veya boyun organı (Ward's Science 2021)

2.5.2. Üremesi ve gelişmesi

Daphnia'nın üreme döngüsü eşeysiz ve eşeyli olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Eşeysiz üremede, erişkin dişiler her kabuk değiştirmenin ardından partenogenetik yumurtalar üretmektedir. Yumurtalar, dorsal kısımda konumlanmıştır ve kuluçka kesesi abdominal çıkıntılar tarafından kapatılmıştır. Embriyolar ortalama 1 günde yumurtadan çıkmaktadır. Yaklaşık 3 gün sonra ise yavru *Daphnia*'lar annenin post abdomenin ventral fleksiyonu ile serbest bırakılmaktadır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Eşaysız üreme ile oluşan yavru bireyleri serbest bırakan dişi *Daphnia*'nın renklendirilmiş görüntüsü (Miss 2019)

Doğan yavru bireyler morfolojik olarak erişkin *Daphnia*'ya benzemektedir. Erişkin bireyden farklı olarak yavru bireylerde henüz kuluçka kesesi gelişmemiştir. Çoğu *Daphnia* türünde 4-6 juvenil evreden sonra yumurta üretimi başlamaktadır. İlk yumurtalar kuluçka kesesine yaklaşık 5 ila 10 gün sonra bırakılmaktadır. Eğer beslenme koşulları yetersiz ise bu süre uzayabilmektedir.

Eşeyli üremeyle oluşan yumurtalar ise melaninle kaplanmış epifiyum (*ephippium*) adı verilen eyer benzeri koruyucu bir yapı içinde kapsüllenmektedir (Şekil 2.6). Bu kapsüllenmiş yumurtalar dinlenme (diyapoz) amacıyla üretilmektedir. Epifiyum genellikle 2 yumurta içermektedir fakat bazen tek yumurta içerdiği veya tamamen boş olduğu halleri de gözlenmiştir. Epifiyum kabuk değiştirme sırasında atılmaktadır.



a)

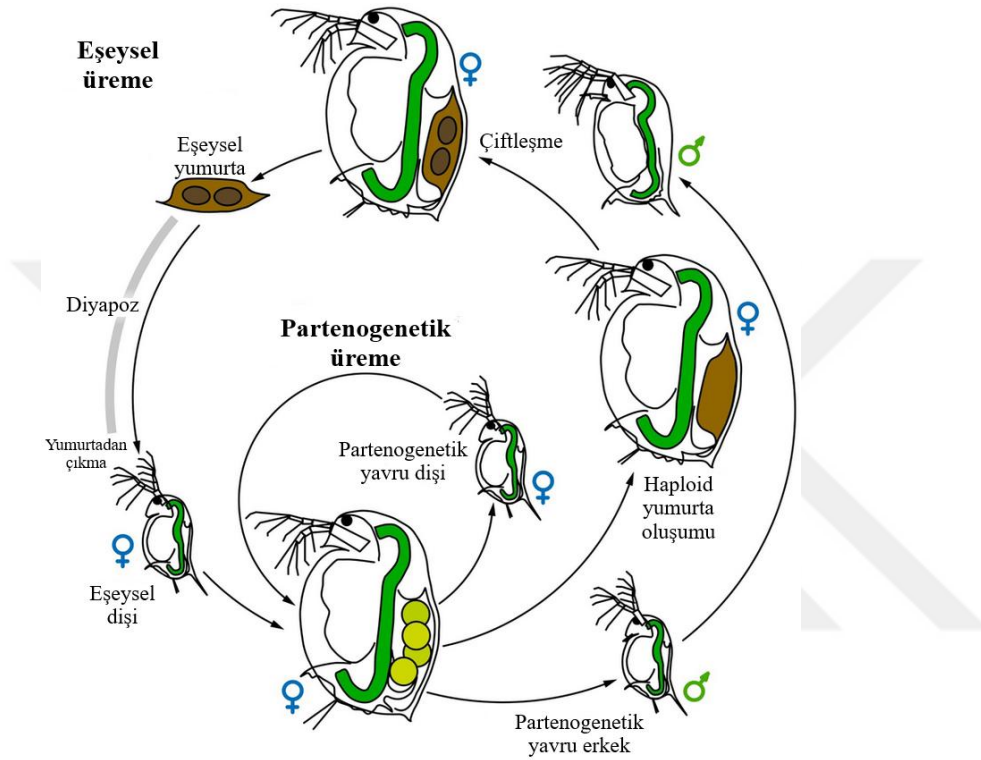


b)

Şekil 2.6. Eşeyli üreme sonucunda oluşan yumurtalar **a)** İki yumurta içeren diyapoz halindeki epifiyum (Lass 2023); **b)** Epifiyum taşıyan *Daphnia magna* (Ebert 2005)

Genellikle epifiyumlar Şekil 2.7’de gösterildiği gibi eşeyli üremeye üretilmektedir. Fakat bazı bölgelerde zorunlu partenogenetik *Daphnia* türleri, diploid epifiyumları eşeysiz olarak da üretebilmektedir.

Eşeyli üreyen bir dişi birey, hem erkek hem de dişi yavrular üretebilmektedir. Döllenme erkek bireylerin dişilerle çiftleşmesi yoluyla gerçekleşmektedir.



Şekil 2.7. *Daphnia magna*’nın eşeyli ve partenogenetik üreme döngüsü (Ebert 2005’ten uyarlanmıştır)

2.5.3. Beslenmesi

Yassı yaprak benzeri filopodlar (uzantılar) sayesinde göğüs apendiksleri tarafından bir filtreleme aparatı oluşturmaktadır. Kabuğun göğüs açıklığı içinde su akımı oluşturarak tek hücreli alglerin, bakterilerin ve detritusun (biyolojik kalıntıların) burada toplanmasını sağlamaktadır. Su akımının yönü anteriordan (önden) posteriora (arkaya) doğrudur. Böylece suda asılı kalan besinler oluşan bu filtre sistemi yardımıyla yutulmaktadır. Karında bulunan özel setalar yutulan parçacıkların yiyecek oluşuna aktarılmasını sağlamaktadır.

Daphnia’nın sindirim sistemi, özofagus, orta bağırsak ve arka bağırsak olmak üzere üç ana bölümden oluşan, büyük ölçüde tübüler bir yapıya sahiptir. Orta bağırsağın baş kısmında yer alan ve kolaylıkla gözlemlenebilen iki küçük sindirim çıkıntısı (diverticula) bulunmaktadır. Orta bağırsak, epitel doku ile kaplıdır ve mikrovilus yapıları

içermektedir. Bağırsak duvarının peristaltik kasılmaları, besini sindirim kanalında ilerletirken, peritrofik membran besini çevreleyerek sindirim çıkıntılarına girişini engellemektedir. Epitel hücreleri, partikülleri fagositoz yoluyla değil, molekülleri absorbe ederek sindirime katkıda bulunmaktadır. Orta bağırsağın ön kısmında pH 6-6.8 arasında, arka kısmında ise pH 6.6-7.2 arasında değişmektedir. Besin, arka bağırsaktan peristaltik hareketlerle dışarı atılmaktadır, ancak bu süreç, yeni alınan besin partiküllerinin oluşturduğu basınca da bağlıdır.

Daphnia'nın rengi, ağırlıklı olarak tükettiği besinlere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yeşil alglerle beslenen bireyler, şeffaf olup hafif yeşil veya sarı bir tona sahipken, bakterilerle beslenenler beyaz ya da somon-pembe renkte olabilmektedir. Beslenme düzeyi iyi olan bireyler, aç kalanlara kıyasla daha belirgin renklere sahiptir.

2.5.4. Dolaşım sistemi

Daphnia, açık dolaşım sistemine sahiptir. Kalp, dorsal bölgede, yumurta kesesinin ön kısmında yer alır. 20°C sıcaklıkta dakikada ortalama 200 kez atmakta olup, sıcaklık düştükçe kalp atım hızı da azalmaktadır. Kan hücreleri, şeffaf vücut yapısı sayesinde vücut boşluğunda hızlı bir şekilde hareket ederken kolaylıkla gözlemlenebilmektedir. Oksijen taşınımını desteklemek amacıyla, *Daphnia* çok alt birimli ve çok domeinli büyük bir makromolekül olan ekstraselüler solunum proteini hemoglobine (Hb) sahiptir. En az dört farklı hemoglobin geni bulunmaktadır. *Daphnia*, sudan oksijen alımını artırmak için daha fazla hemoglobin üretme eğilimindedir. Çevresel değişimlere (oksijen konsantrasyonu, sıcaklık) bağlı olarak hemoglobin konsantrasyonu yaklaşık 20 kat değişebilmektedir. Oksijenle yüklüoksi-hemoglobin kırmızı renkte olup, şeffaf vücut yapısına sahip organizmalara kırmızımsı bir görünüm kazandırmaktadır.

2.5.5. İmmün sistemi

Pek çok omurgasız türde olduğu gibi, iyi gelişmiş bir doğuştan gelen bağışıklık sistemine sahiptir. Bu sistem; profenoloksidaz (proPO) aktivasyon sistemi yoluyla melanizasyon, pıhtılaşma süreci, fagositoz, yabancı maddelerin kapsüllenmesi, antimikrobiyal aktivite ve hücre aglütinasyonu gibi mekanizmaları içermektedir (Söderhäll ve Cerenius 1992). *Daphnia*'da bu mekanizmalardan yalnızca proPO sistemi (Mucklow ve Ebert 2003) ve fagositoz (Metchnikoff 1884) doğrudan tanımlanmış olsa da diğer mekanizmaların da işlevsel olduğu düşünülmektedir. ProPO sistemi, yalnızca parazitlere karşı savunma sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda kutikulanın yara iyileşme sürecinde de rol oynamaktadır.

2.6. *Daphnia*'nın Model Organizma Olarak Kullanımı

Daphnia magna, ekolojik ve toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. Model organizma olarak seçilmesinin bazı temel nedenleri vardır. Bunlar çeşitli alt başlıklarda incelenmektedir.

2.6.1. Ekolojik ve çevresel önemi

Daphnia magna, tatlı su ekosistemlerinde anahtar bir türdür ve besin zincirinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, çevresel değişikliklerin biyolojik etkilerini incelemek için uygun bir organizmadır (Lampert 2011).

2.6.2. Toksikoloji ve ekotoksikoloji çalışmalarında kullanımı

Daphnia magna, çevresel toksikoloji testlerinde yaygın olarak kullanılır ve OECD (Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü) ve EPA (Çevre Koruma Kurumu) tarafından standart test organizması olarak kabul edilmiştir (OECD 2004). Çeşitli kimyasalların (pestisitler, ağır metaller, farmasötik atıklar vb.) sucul canlılar üzerindeki etkilerini incelemek için kullanılmaktadır (Guilhermino vd. 2000).

2.6.3. Genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında önemi

Daphnia magna'nın genomu tamamen dizilenmiştir ve çevresel stres faktörlerine nasıl tepki verdiği üzerine genetik çalışmalar yapılabilmektedir (Colbourne vd. 2011). Bu özellikleri sayesinde evrimsel biyoloji, adaptasyon ve gen-çevre etkileşimleri üzerine araştırmalarda kullanılmaktadır.

2.6.4. Yetiştirilme avantajı

Parthenogenetik üreme özelliği sayesinde genetik olarak homojen bireyler üretilebilmektedir (Ebert, 2005). Kısa yaşam döngüsü (yaklaşık 2 hafta içinde üreme) sayesinde deneylerin hızlı sonuç vermesini sağlamaktadır (Taylor vd. 1999). Küçük boyutları ve laboratuvar ortamında kolay bakımı, araştırmalarda kullanımını pratik hale getirmektedir.

Sonuç olarak *Daphnia magna*, ekotoksikoloji, genetik, evrimsel biyoloji ve çevre bilimleri gibi birçok farklı alanda önemli bir model organizma olarak kullanılmaktadır. Kısa nesil süresi, genom dizisinin tamamlanmış olması ve çevresel streslere duyarlılığı gibi özellikleri sayesinde bilimsel çalışmalarda yaygın olarak tercih edilmektedir.

2.7. Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

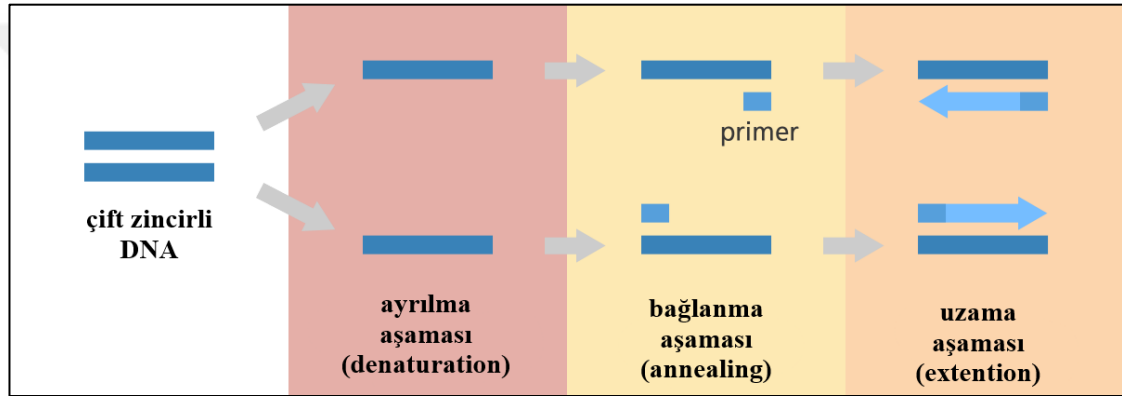
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), 1984 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir ve bilim dünyasında devrim niteliğinde bir buluş olarak kabul edilmiştir. Real Time PCR ya da diğer tanımıyla Kantitatif PCR (qPCR) olarak da adlandırılan teknikte ya doğrudan DNA'nın istenilen fragmenti amplifiye edilmektedir ya da önce RNA'dan komplementer DNA (cDNA) sentezlenmekte sonra amplifikasyon gerçekleştirilmektedir. Bu hassas moleküler yöntem hedef DNA fragmentlerini özgün primerler ve probalar yardımıyla sıcaklık döngüsü uygulanarak eş zamanlı olarak çoğaltılması ve kantitatif (sayısal) olarak izlenmesi prensibine dayanmaktadır (Heid vd. 1996; Bustin 2000).

RNA'dan cDNA'nın gerçek zamanlı olarak çoğaltılarak hedef genlerin ekspresyon düzeylerinin kantitatif olarak analiz edilmesi Ters Transkripsiyon Kantitatif

(Reverse Transcription Quantitative) PCR olarak tanımlanır (Nolan vd. 2006). Ters transkripsiyon işleminin gerçekleştirilme şekline göre iki farklı türü mevcuttur; PCR aynı tüpte yapılırsa tek adımlı RT-qPCR, ayrı tüplerde yapılırsa İki Adımlı RT-qPCR olarak adlandırılmaktadır (Zhao ve Wurst 2001).

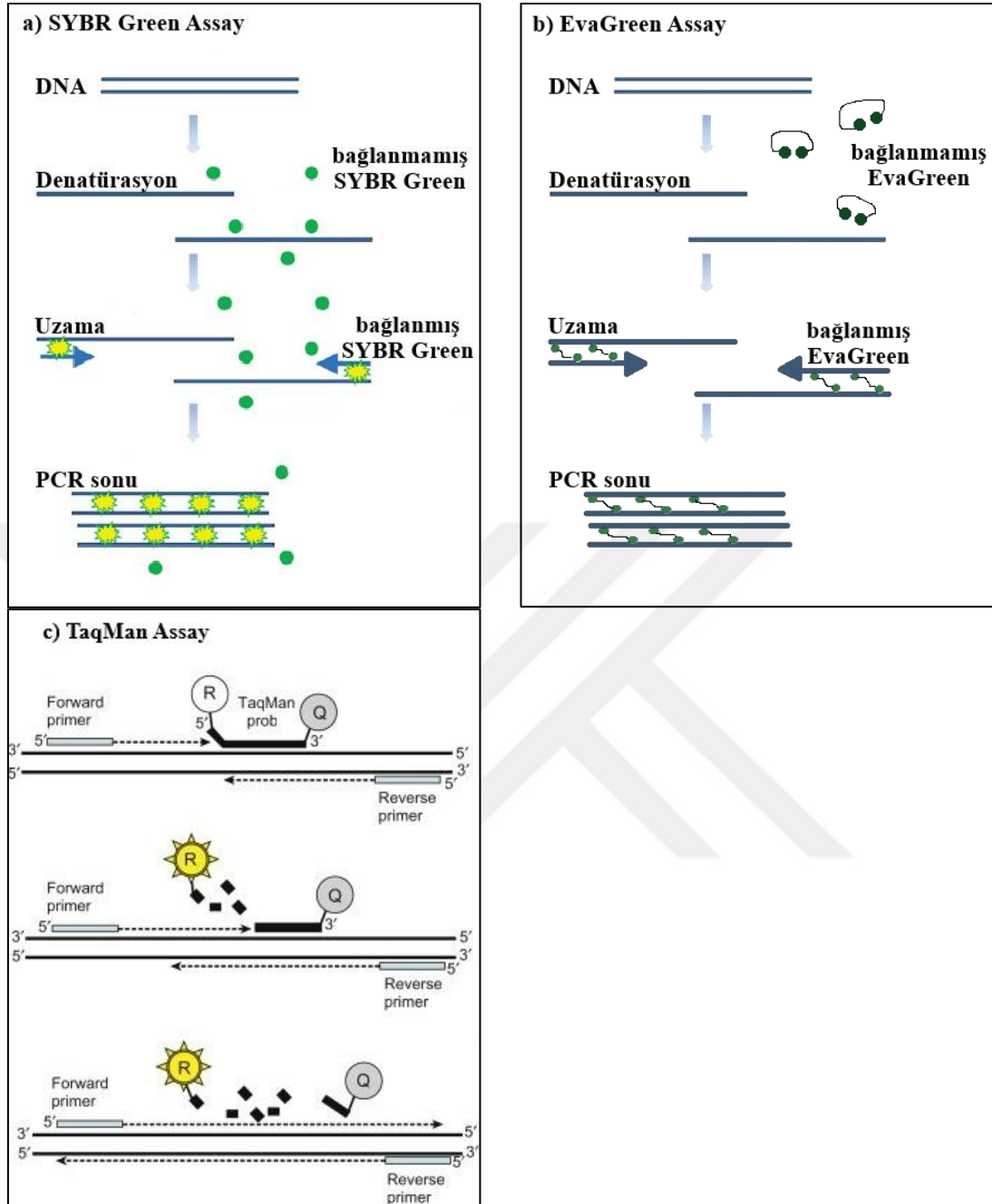
qPCR uygulamaları; SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ve Allel diskriminasyonu, DNA hasarının belirlenmesi, kopya kaybı/varyasyon analizi (CNV), mutasyon tespiti, metilasyon tespiti, kromozom bozukluklarının tespiti, patojen tespiti ve genotipleme gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

PCR süreci üç ana aşamadan oluşmaktadır: İlk olarak, DNA çift sarmalının yüksek sıcaklıkta denatürasyonu (denaturation), ardından primerlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing) ve son olarak, DNA polimeraz enzimi ile DNA zincirinin uzaması (extension) aşamaları yer almaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8.PCR döngüsel aşamaları (Mondal 2023'ten uyarlanmıştır)

qPCR, her DNA amplifikasyon döngüsünü, genellikle floresan ışık yayan boyalar veya diziye özgü sentetik oligonükleotidler kullanarak, bilgisayar ekranında eş zamanlı gözlemler yapılmasını sağlamaktadır. qPCR'da DNA'yı ölçmek için kullanılan bu iki ana yöntemin birbirinden farklı avantajları ve dezavantajları vardır. SYBR Green (Şekil 2.9a) ve EvaGreen (Şekil 2.9b) gibi interkalatör boyalar DNA dizisiyle bağımsız bir şekilde bağlandığı için sadece hedef gen değil, tüm çift sarmallı DNA'ya (dsDNA) bağlanmaktadır. Diğer yandan bir hidroliz probu olan TaqMan probu (Şekil 2.9c), hedef DNA dizisine spesifik olarak bağlanmaktadır. Böylece yan ürünlerin ve primer dimerlerinin floresan sinyal vermesini engellemektedir. Bu sayede çok daha hassas ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. SYBR Green/EvaGreen gibi floresan ışık yayan boyalar ve TaqMan prob gibi diziye özgü prob özellikleri bakımından Çizelge 2.2'de birbirleriyle karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.9. qPCR’da başlıca kullanılan floresan ışıma yapan boyalar ve TaqMan prob; **a)** SYBR Green boyasının diziden bağımsız olarak DNA amplikonlarına bağlandığında floresan miktarı artmaktadır (Fraga 2008’den uyarlanmıştır); **b)** EvaGreen boyası diziden bağımsız olarak çift sarmallı DNA’ya bağlanarak floresan ışıma vermektedir; **c)** TaqMan probda, 5’ ucunda floresan raporlayıcı boya (reporter dye), 3’ ucunda söndürücü molekül (quencher dye), ortasında ise hedef DNA dizisine özgü kısa bir oligonükleotid dizisi mevcuttur ve Taq polimeraz sentez sırasında 5’→3’ ekzonükleaz aktivitesi ile karşısına çıkan probu parçalayıp 5’ ucundaki floresan boyanın 3’ ucundaki söndürücüden uzaklaşmasını sağlayarak floresans sinyali vermektedir (Butler 2005’ten uyarlanmıştır)

Bu çalışma kapsamında, iki adımlı RT-qPCR yöntemi tercih edilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde SYBR Green floresan boyası kullanılmıştır. SYBR Green, diziye bağımlı olmaksızın dsDNA'nın minör oluşuna bağlanan bir floresan boyadır (Arya vd. 2005). Bu boya, DNA'ya bağlanmadığı zaman daha zayıf bir floresan sinyali üretirken, minör oluşa bağlandığında güçlü bir floresan sinyali üretmektedir (Tajadini vd. 2014). Sonuç olarak, reaksiyon tüpünde dsDNA miktarı arttıkça, SYBR Green'in bağlanma kapasitesi de artmaktadır ve floresan sinyalinin şiddeti yükselmektedir.

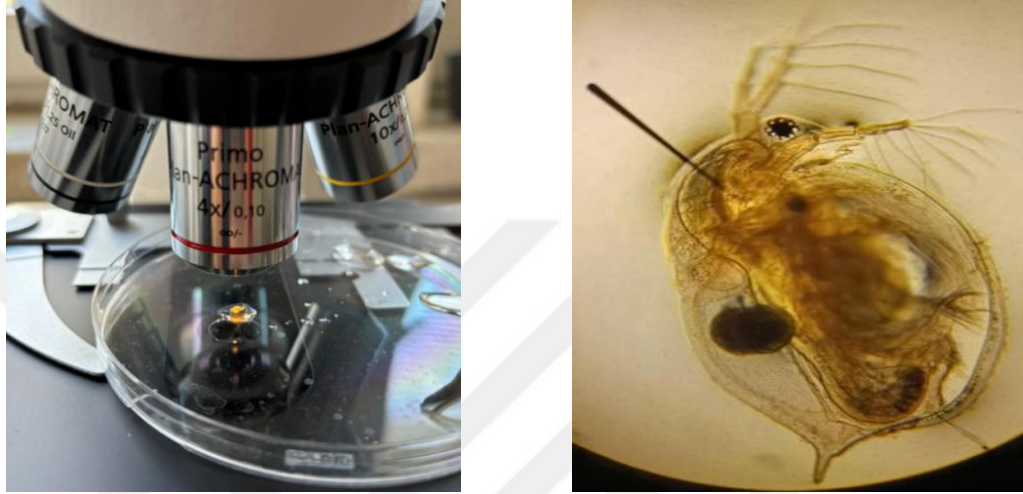
Çizelge 2.2. SYBR Green floresan boya, EvaGreen floresan boya ve TaqMan probun kıyaslaması

Özellik	EvaGreen	SYBR Green	TaqMan
Floresans bağlanma tipi	Çift sarmallı DNA'ya bağlanır	Çift sarmallı DNA'ya bağlanır	Hedef diziyi tanıyan prob parçalanınca sinyal verir
Spesifiklik	Orta	Düşük	Yüksek
Primer dimerlerinden etkilenme	Etkilenir	Etkilenir	Etkilenmez
Multiplex PCR uygunluğu	Zayıf (tek renk)	Zayıf (tek renk)	Uygun (farklı renkli problemlerle)
Erime eğrisi (Melt Curve)	Gerekli	Gerekli	Gerekli değil
Kullanım kolaylığı	Kolay	Kolay	Tasarım ve sentez gerektirir
HRM (High Resolution Melting)	Uygun (yüksek stabilite)	Orta düzey uyumlu	Kullanılamaz
Polimeraz enzimi	DNA polimeraz	DNA polimeraz	5'→3' ekzonükleaz aktivitesi olan Taq polimeraz gerekir
Maliyet	Düşük	Düşük	Yüksek
Kantifikasyon doğruluğu	Orta-Yüksek	Orta	Çok yüksek
Toksosite / PCR inhibisyonu	Düşük	Daha yüksek PCR inhibisyonu	Yok
Kullanım amacı	Genel qPCR, HRM	Genel qPCR	Hedefe özgü gen ekspresyon analizi, kantifikasyon

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında materyal olarak su pireleri (*Daphnia magna*) kullanılmıştır. Materyal temini Antalya’da balık yemi üretimi yapan bir çiftlik tarafından sağlanmıştır. Canlı olarak denemenin yapıldığı laboratuvara taşınan su pirelerinin mikroskop altında morfolojik özelliklerine göre tür tayini yapılmıştır ve *in vitro* ortamda stok akvaryuma transfer edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Mikroskop altında *Daphnia magna* tür tayini yapılması

3.1.1. Araştırma yeri

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümüne ait Hayvansal Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1.2. Tez çalışmasında kullanılan kitler

Tez çalışmasının moleküler çalışmaların ticari kitler kullanılmıştır ve kullanılan kitleri tanımlayan bilgiler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tez çalışmasında kullanılan hazır kitlere ait bilgiler

Hazır Kitin Adı	Markası	Kullanım Amacı
RNeasy Mini Kit	Qiagen	RNA eldesi
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen	cDNA sentezi
QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen	RT-PCR
Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit	ScienCell	Telomeraz enzim aktivitesinin kantitatif olarak ölçülmesi

3.1.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Tez çalışmasında kullanılan cihazlara ait bilgiler

Cihaz Adı	Markası	Kullanım Amacı
Real Time PCR	BioRad	RT-PCR çalışmaları
Thermal Cycler	Thermo Fisher	PCR amplifikasyonları
Soğutmalı Santrifuj	Hettich	Nükleik asit ekstraksiyonunda ısıya hassas örneklerin bozulmadan seperasyonu
Mini Santrifüj	Hettich	Çeşitli çözelti hazırlama ve separasyon
Laminar Kabin	ESCO	RNA ekstraksiyonu
-20 °C Dolap	Indesit	Doku ve RNA örneklerinin saklanması
-86 °C Derin dondurucu	New Brunswick	Doku ve RNA örneklerinin saklanması
Jel Görüntüleme	Syngene	PCR ürünlerinin jelde tespit edilmesi
Saf Su Cihazı		Nükleik asit ekstraksiyonu ve PCR tepkimeleri için tampon çözelti hazırlanması
Otoklav	TOMY	Sarf malzemelerin sterilizasyonu
Hassas Terazı	DESI	Hassas ölçümler
Yatay Elektroforez Sistemi	BioRad	DNA/RNA ekstraksiyon örnekleri, PCR ürünleri ve enzimatik kesim sonucu oluşan fragmentlerin ayırımının sağlanması ve görüntülenmesi
Elektroforez Güç Kaynağı	BioRad	Elektroforez işlemi için gerekli kesintisiz düzenli elektrik akımının sağlanması
Otomatik Pipetler	Eppendorf	Mikro seviyede likit karışımların hazırlanması
Mikro Dalga Fırın	Arçelik	Çözeltilerin hazırlanması ve jel hazırlama
Su Banyosu	Isolab	Enzimatik reaksiyonu durdurma
pH Metre	Isolab	Suların pH ölçümü
BioDrop	Biochrom	RNA ölçümü

3.2. Metot

3.2.1. *Daphnia magna* kültürü ve deneme dizaynı

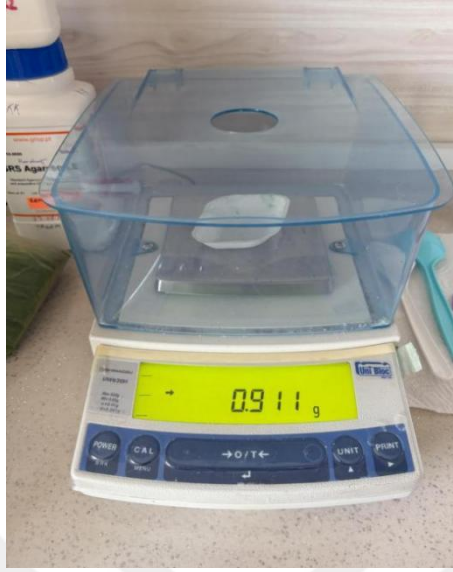
Deneme materyali olarak kullanılan su pireleri plastik torba içerisinde denemenin yürütüldüğü laboratuvara taşındıktan sonra içerisinde 15 litre su olan balık akvaryumuna bırakılmıştır. Bu şekilde 30 dakika bekletilen su pirelerinin yeni ortama adaptasyonu sağlanmıştır. Bu sürenin sonunda torbadaki su ile birlikte *Daphnia*'lar akvaryuma boşaltılmıştır. Akvaryumda ticari olarak satılan 8.84 pH değerinde içme suları kullanılmıştır (Şekil 3.2). Akvaryuma uyum sağlayan *Daphnia*'lar $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sıcaklık ve 16:8 saat aydınlık:karanlık fotoperiyot süresine maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.2. Denemede kullanılan *Daphnia*'ların akvaryuma alıştırma süreci

3.2.2. Akvaryumdaki ve beherdeki *Daphnia*'ların beslenmesi

Denemenin başlangıcında su pirelerinin beslenmesinde literatür bilgisine uygun olarak ticari bir firmadan temin edilen *Chlorella vulgaris* türü alg kullanılmıştır (Poirier vd. 1988). Haftada 2 kez olacak şekilde 250 ml içme suyuna 200 mg *Chlorella vulgaris* eklenmiştir ve hazırlanan algli su akvaryum suyuna ilave edilmiştir (Şekil 3.3). Ancak, muamele gruplarında pH değişimleri sebebiyle yüksek ölüm gerçekleşmiştir. Bu sorunu aşmak için yine literatürde önerildiği gibi deneme gruplarına ek besin maddesi olarak yaklaşık 100'er mg haşlanmış yumurta sarısı da verilmiştir.



a)



b)

Şekil 3.3. *Chlorella vulgaris*’in hassas terazide tartılması; **a)** Tartımdan önce kabın darasının alınması; **b)** 200 mg toz *Chlorella vulgaris*’in tartılması

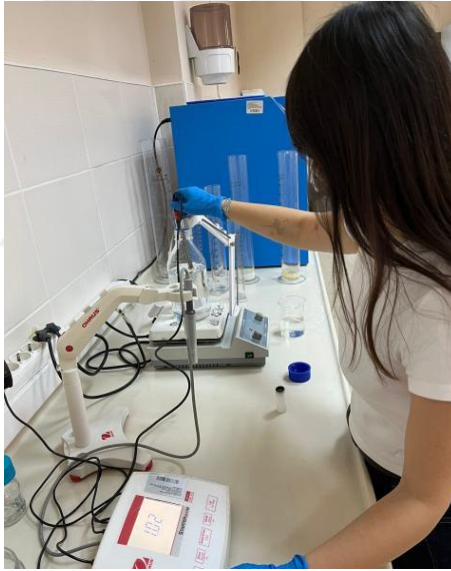
3.2.3. Deneme gruplarının hazırlanması

Tez projesinin asıl araştırma konusuna başlamadan önce ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, her muamele grubu için 100 ml seyreltme suyu, dijital pH-metre ile ayarlanıp elektrotlar 4.01, 7.01, 10.01 tamponlarla kalibre edilmiştir. Düşük pH değerleri (asidik) 1N HCl ve yüksek pH değerleri (bazik; alkali) ise 1N NaOH ile ayarlanmıştır.

Çalışmada oluşturulan üç farklı pH değerlerine sahip asidik, nötr ve bazik suların pH değerleri şu şekilde ayarlanmıştır; Kontrol grubu: pH=8.33, Muamele A: pH=4.55 ve Muamele B: pH=10.13. Deneye başlamadan önce her bir gruptan birer adet olacak şekilde asidik (A), kontrol (K) ve bazik (B) beherler olması gereken pH’larda ön deney düzeneği olarak hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Asit, kontrol ve baz grupları için 1L’lik şişelere stok sular hazırlanmıştır (Şekil 3.5). pH’lara göre hazırlanan sentetik sulardan 7 günlük ön demene boyunca beherlere aktarılmış ve canlılık takibi yapılmıştır. Bu canlılık takibine göre beherlerdeki su miktarı ve birey sayısı hesaplanmıştır.



Şekil 3.4. Asit (A), kontrol (K) ve baz (B) beherlerde 7 günlük ön deneme yapılması



Şekil 3.5. Deneme süresince kullanılan pH değerleri ayarlanmış stok sular

Deneyler, 200 ml sentetik tatlı su ortamı içeren 250 ml'lik cam beherlerde kontrol/muamele grupları için üçer tekerrürlü ve popülasyon yoğunluğu birey/2 ml (en az) su olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir behere ayrı hava vanalarına bağlanmış hava taşları ile oksijen verilmiştir (Şekil 3.6).

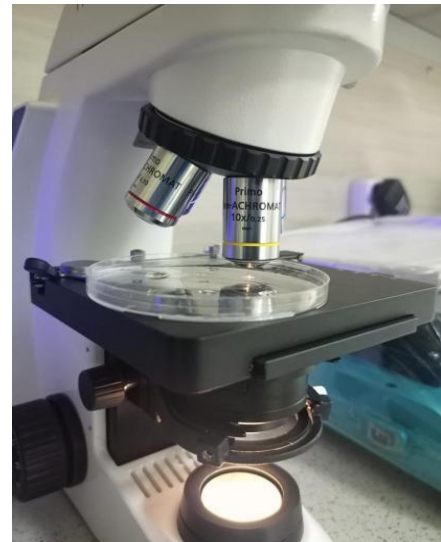


Şekil 3.6. Asit, kontrol ve baz olmak üzere üçer tekerrürlü hazırlanan deney grupları

3.2.4. *Daphnia magna*'nın kalp atım sayısının hesaplanması

Üç farklı pH değerine göre hazırlanmış beherlerde 7 gün süreyle ön denemeye tabi tutulan *Daphnia*'ların sağlık durumlarını değerlendirmek amacıyla, rastgele seçilen bireylerin kalp atımları mikroskop altında 1 dakika boyunca videoya kaydedilmiştir ve daha sonra sayılmıştır. Bu hesaplama yapılırken “Basit Gözlem Metodu” denilen bir yöntem kullanılmıştır. Yöntemin aşamaları şu şekildedir:

Preparasyon: Farklı pH gruplarındaki beherlerde bulunan *Daphnia magna*'lar stres yaratmamaya dikkat edilerek oda sıcaklığında küçük bir petriye alınmıştır. Mikroskop altında rahat görüntüleme yapmak için *Daphnia magna*'nın etrafındaki suyun bir kısmı mikropipet kullanılarak atılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. *Daphnia magna*'nın mikroskop altında görüntülemeye hazırlanması

Petriye alınan *Daphnia magna*'lar mikroskop altında incelenmiştir. Kalbinin net görüntüsü elde edilecek şekilde mikroskopta konumu ayarlanmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ön denemeler sonunda rastgele seçilen *Daphnia magna*'nın mikroskop altında kalp atımlarının belirlenmesi

Sayım: Üç farklı pH'ya göre hazırlanan beherlerden rastgele seçilen *Daphnia*'nın kalp atışlarını saymak için mikroskop altında 1 dk'lık bir video çekilmiştir. Bu video boyunca basitçe manuel olarak sayılmıştır. Örneğin 15 saniye boyunca manuel olarak sayıldığında kalp atışlarını 4 ile çarparak dakikadaki kalp atış hızı (bpm) elde edilmiştir. Manuel sayım haricinde el sayacı ve dijital sayaç kullanılarak doğrulama yapılmıştır.

Kayıt: *Daphnia magna*'nın kalp atış sayısı, suyun sıcaklığı ve *Daphnia*'nın davranışında veya kalp atış ritminde gözlemlenen değişiklikler gibi diğer ilgili veriler kaydedilmiştir.

3.2.5. Primerlerin tasarlanması

NCBI GenBank veri tabanında kayıtlı referans mRNA sekanslarına göre telomeraz geninin transkript dizileri (XM_032923518.2, XM_032923521.2, XM_032923519.2, XM_045169747.1, XM_032923522.2 ve XM_045169748.1) seçilmiştir. Primer tasarımı, NCBI Primer-BLAST aracı kullanılarak gerçekleştirilmiş olup, tasarım sürecinde her bir transkriptte özgüllük, benzer erime sıcaklığı (T_m), uygun GC içeriği ve ikincil yapı oluşumlarının (hairpin, dimer vb.) önlenmesi gibi kriterler dikkate alınmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizlerinde gen ekspresyon düzeylerinin normalize edilebilmesi amacıyla, evrensel ekspresyon profili sergileyen ve sıklıkla referans gen olarak kullanılan β -aktin geni iç kontrol olarak kullanılmıştır. Tasarlanan tüm primer çiftlerine ait diziler, hedef transkriptler, tahmini ürün boyları ve diğer temel özellikler Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3. Tez çalışması için tasarlanan *Daphnia magna* telomeraz transkriptlerine ait qPCR primer dizileri ve özellikleri

Primer Adı	T _m (°C)	Sekans (5'→3')	bç
x1- XM_032923518.2 F	59.69	ATCTCACGCTCATAGCCGTC	20
x1- XM_032923518.2 R	59.97	CGTACCAGTCCAGCTGTTGT	20
x2- XM_032923521.2 F	59.97	CGACCAAACCAACCAGCAAG	20
x2- XM_032923521.2 R	59.97	GCCAAACGATCAATCTCGCC	20
x3- XM_032923519.2 F	59.67	TCGAGTGGGAGGTGATGGTA	20
x3- XM_032923519.2 R	57.98	AGGAATTCTTTCCAATTCACCCT	23
x4- XM_045169747.1 F	59.97	CGACCAAACCAACCAGCAAG	20
x4- XM_045169747.1 R	59.97	GCCAAACGATCAATCTCGCC	20
x5- XM_032923522.2 F	58.35	GCTAGCCTCATCAATATCCATAACT	25
x5- XM_032923522.2 R	60.11	GACGCCAATTTCCCGAACAC	20
x6- XM_045169748.1 F	57.75	GCCGTCATGAAAAGAATCTAATGTA	25
x6- XM_045169748.1 R	60.04	TCAGGCGTCTGAACATGGAC	20
β-aktin F	66.00	GCCCTCTTCCAGCCCTCATTCT	22
β-aktin R	56.00	TGGGGCAAGGGCGGTGATTT	20

T_m: Thermal melting, bç: baz çifti (uzunluk), F: forward, R: Reverse

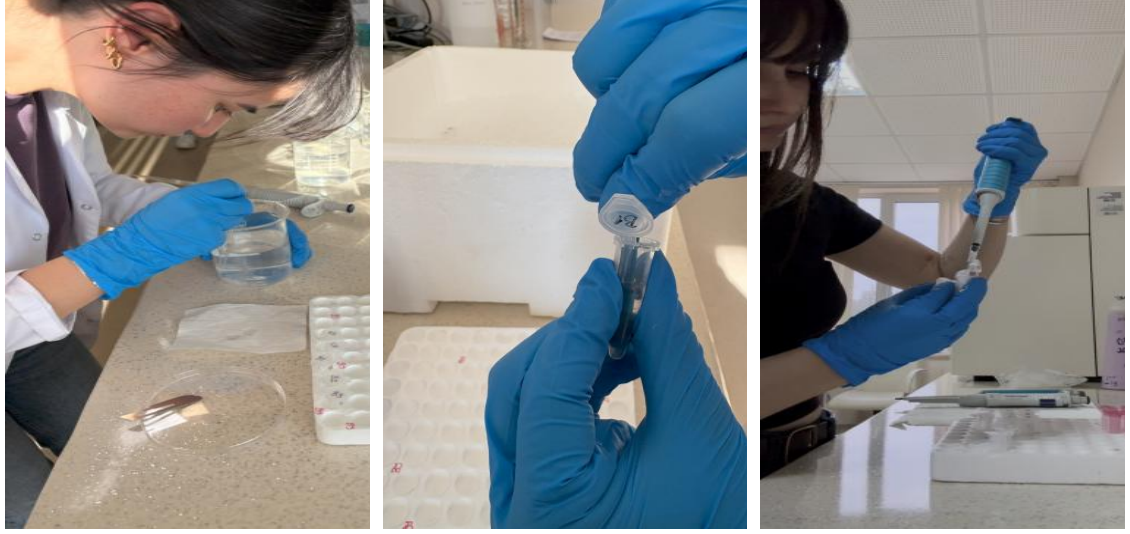
3.2.6. *Daphnia magna*'dan RNA izolasyonu

Hem enzim aktivitesi hem de gen ekspresyon çalışmaları tüm örnek üzerinde yapılmış olup RNA izolasyonu için Qiagen RNeasy Mini Kit protokolüne göre yapılmıştır (Şekil 3.9).

Stabilize edilmemiş taze veya dondurulmuş dokular için prosedür uygulanmıştır:

1. Kiti kullanmadan önce 1 ml tampon RLT başına 10 µl β-merkaptoetanol çeker ocakta eklenmiştir.
2. Tampon RPE üzerine şişede belirtildiği gibi 4 hacim etanol (%96-100) eklenmiştir.
3. Başlangıç materyali olarak yaklaşık 10 adet *Daphnia magna* hassas terazide ~20 mg olacak şekilde tartılmıştır. Her bir beherden alınan *Daphnia*'lar steril petri içine alınarak 3 kez saf su ile yıkanmıştır. Taze örnekler kit içinden çıkan 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır.
4. 20-30 mg tüm doku üzerine 600 µl RLT tampon eklenmiştir ve homojen hale gelene kadar doku parçalanmıştır.

5. Lizat 3 dakika tam hızda 20-25 °C’de santrifüjlenmiştir.
6. Süpernatant pipetleyerek çıkartılmış ve yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Sonraki adımlarda yalnızca bu süpernatant kullanılmıştır.
7. Temizlenmiş lizata 1 hacim %70 etanol eklenmiştir ve pipetleyerek karıştırılmıştır.
8. RNeasy spin kolonu, 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
9. Oluşmuş olabilecek herhangi bir çökelti dahil olmak üzere 700 µl’ye kadar numune RNeasy spin kolona aktarılmıştır.
10. $\geq 8000 \times g$ ’de (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir.
11. Dipte biriken suyu atılmıştır. Peçeteye vurarak kurutulmuş ve aynı 2 ml’lik toplama tüpüne aynı RNeasy spin kolonunu yerleştirilmiştir.
12. RNeasy spin kolon üzerine 700 µl tampon RW1 eklenmiştir.
13. Tüpler $\geq 8000 \times g$ ’de (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir.
14. Dipte biriken suyu atılmıştır. Peçeteye vurarak kurutulmuş ve aynı 2 ml’lik toplama tüpüne aynı RNeasy spin kolonunu yerleştirilmiştir.
15. RNeasy spin kolon üzerine 500 µl tampon RPE eklenmiştir.
16. Tüpler $\geq 8000 \times g$ ’de (≥ 10.000 rpm) 15 saniye santrifüjlenmiştir.
17. Dipte biriken suyu atılmıştır. Peçeteye vurarak kurutulmuş ve aynı 2 ml’lik toplama tüpüne aynı RNeasy spin kolonunu yerleştirilmiştir.
18. RNeasy spin kolon üzerine 500 µl tampon RPE eklenmiştir.
19. Tüpler $\geq 8000 \times g$ ’de (≥ 10.000 rpm) 2 dakika santrifüjlenmiştir.
20. RNeasy spin kolonu dikkatlice aldıktan sonra 2 ml’lik toplama tüpü atılmıştır.
21. RNeasy spin kolonu yeni bir 1.5 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
22. RNeasy spin kolon üzerine 30 - 50 µl RNase içermeyen su eklenmiştir.
23. RNA’yı elüye etmek için tüpler $\geq 8000 \times g$ ’de (≥ 10.000 rpm) 1 dakika santrifüjlenmiştir.
24. Elde edilen elüt hacmi not edildikten sonra RNA’lar RT-PCR işlemine kadar -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.9. *Daphnia magna*'dan RNA izolasyon çalışmaları

3.2.7. RNA'nın kantitatif tayini

İzole edilen RNA'ların kantitatif analizi BioDrop ile yapılmıştır (Şekil 3.10). RNA preparasyonlarının yaklaşık saflığı 260 ve 280 nm'deki absorbanların oranıyla (A_{260}/A_{280}) belirlenmiştir. Saf RNA için OD_{260}/OD_{280} oranı 2.0 olmalıdır (Çizelge 4.1).



Şekil 3.10. İzole edilen RNA'nın saflığının ölçülmesi

3.2.8. cDNA sentezi

Örneklerden izole edilen RNA'lar qPCR cihazında kullanılmak üzere Qiagen QuantiTect® Reverse Transcription Kit'i yardımıyla cDNA'ya çevrilmiştir.

1. Template RNA buz üzerinde çözülmüştür.
2. Kitin içinden çıkan gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript® RT Buffer, RT Primer Mix ve RNaz içermeyen su oda sıcaklığında çözülmüştür.
3. Tüpler hafifçe vurularak karıştırılmıştır.
4. Tüplerin etrafında kalan sıvının toplanabilmesi için, tüpler kısa süreli santrifüjlenmiş ve ardından buz üzerinde bekletilmiştir.
5. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu buz üzerinde Çizelge 3.4'e göre hazırlanmıştır.
6. 42°C'de 2 dakika inkübe edildikten sonra tüpler hemen buzun üzerine yerleştirilmiştir.
7. Reverse Transcription Master Mix'i Çizelge 3.5'e göre hazırlanmıştır.
8. Reverse Transcription Master Mix içeren her tüpe 5. adımda hazırlanan (14 µl) RNA Template eklenmiştir.
9. Tüpler 42 °C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
10. Quantiscript Reverse Transcriptase enziminin inaktif olması için 95 °C'de 3 dakika inkübe edilmiştir.
11. Reverse Transcription reaksiyonları buz üzerine yerleştirilmiş ve doğrudan qPCR ile devam edilmiştir.

Çizelge 3.4. Genomik DNA eliminasyon reaksiyonu bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl
Template RNA	5 µl
RNaz içermeyen su	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	14 µl

Çizelge 3.5. Reverse-transcription reaksiyon bileşenleri

Bileşen	Hacim/Reaksiyon
Reverse-transcription master mix	1 µl
Quantiscript Reverse Transcriptase	4 µl
Quantiscript RT Buffer, 5X	1 µl
RT Primer Mix	14 µl
Template RNA	(adım 5'te eklenmiştir)
Tüm genomik DNA uzaklaştırma reaksiyonu (adım 3)	
Toplam reaksiyon hacmi	14 µl

3.2.9. Gerçek zamanlı PCR (qPCR) çalışmaları

Deneme grupları 3 tekerrürlü olarak dizayn edilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerini belirleme çalışmaları her bir tekerrür için 2 defa yapılmıştır. İki aşamalı RT-PCR için Qiagen'in QuantiNova® SYBR® Green PCR Kit'in protokolü takip edilerek yapılmıştır (Şekil 3.11).

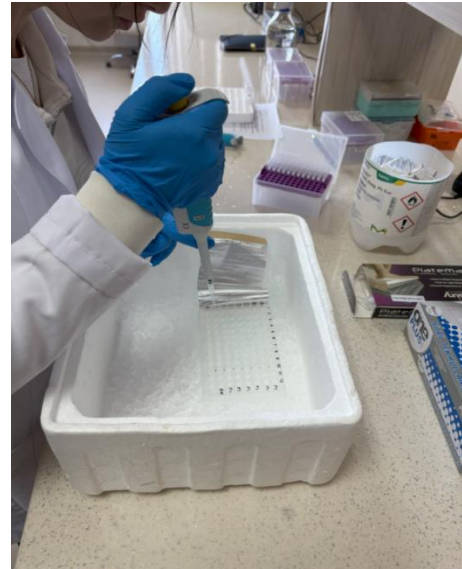
1. QuantiNova SYBR Green PCR Master Mix, QuantiNova Yellow Template Dilution Buffer, Template gDNA veya cDNA, primerler/problar ve RNaz içermeyen su çözölmüştür.
2. Çizelge 3.6'ya göre bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.
3. Reaksiyon karışımını iyice karıştırılmıştır ve 20 µl PCR plakasının kuyucuklarına dağıtılmıştır.
4. Reaksiyon karışımını içeren PCR kuyucuklarına 3 µl cDNA (≤ 100 ng/reaksiyon) eklenmiştir.
5. qPCR cihazı Çizelge 3.7'ye göre programlanmıştır.
6. PCR plakası BioRad CFX96 Real Time PCR cihazına yerleştirilerek döngü programı başlatılmıştır.
7. PCR ürün(ler)inin erime eğrisi analizini yapılmıştır.

Çizelge 3.6. SYBR Green qPCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Hacim/Reaksiyon
2x SYBR Green PCR Master Mix	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
RNaz içermeyen su	5 µl
Template gDNA veya cDNA (adım 4'te eklenmiştir)	3 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

Çizelge 3.7. qPCR cihaz protokolü

Adım	Zaman	Sıcaklık (°C)
PCR başlangıç ısı aktivasyonu	2 dk	95 °C
2 adımlı döngü		
Denatürasyon	5 sn	95 °C
Birleştirilmiş bağlanma/uzama adımları	10 sn	58 °C
Döngü sayısı		40
Erime eğrisi analizi		

**Şekil 3.11.** Gen ekspresyonu için qPCR hazırlığı

3.2.10. Proteomik analizler

Telomerase enzim aktivitesinin qPCR’da ölçülmesi için ScienCell Telomerase Activity Quantification qPCR Assay Kit kullanılmıştır. Kit prosedüründe 3 durma noktası mevcuttur ve bu durma noktalarına göre 3 aşamalı olarak çalışma gerçekleştirilmiştir.

Hücre Lizatının Hazırlanması:

1. ~50 mg doku (2-5 milyon hücre/~20 adet Daphnia) alınmıştır.
2. Steril tüpe alınan dokular 1 ml PBS ile bir kez yıkanmıştır.
3. Yıkama işleminden sonra PBS dikkatlice atılmıştır. (Durma noktası #1: hücre pelletleri -80 °C dondurucuda saklanabilmektedir).
4. Hücre pelletleri, hücre lizatları ve reaktifler 4 °C’de veya buz üzerinde tutulmuştur.
5. Kullanmadan hemen önce, 0.1 M PMSF izopropanol içinde 37 °C’de çözündürülmüştür. Kristaller kaybolana kadar bekletilmiştir ve karıştırılmıştır.
6. 20 µl/milyon hücrede kullanılacak liziz tamponu (Cat #8928a) alikotlanarak hazırlanmıştır:
7. 9×2.0 (milyon hücre) $\times 20 \mu\text{l} \times \%105 = 378 \mu\text{l}$ (toplam liziz tamponu)
8. Hazırlanan liziz tamponu önceden soğutulmuş yeni bir tüpe aktarılmıştır.
9. Her mililitre hücre liziz tamponu içine 1µl 0.1M PMSF ve 0.3 µl βmerkaptoetanol eklenmiştir. Eklenecek miktarlar hesaplanmıştır:
10. $378 \mu\text{l} \times 1 \mu\text{l}/1 \text{ ml} = 0,378 \mu\text{l} \text{ --- } 0.1 \text{ PMSF}$
11. $378 \mu\text{l} \times 0.3 \mu\text{l}/1 \text{ ml} = 0,1134 \mu\text{l} \text{ --- } \beta\text{-merkaptoetanol}$
12. Hazırlanan liziz tamponundan her bir hücre peleti üzerine $2.0 \times 20 \mu\text{l} = 40 \mu\text{l}$ eklenmiştir.
13. Kabarcık oluşturmada 1 ml’lik pipet ucuyla 20 kez yukarı ve aşağı dikkatlice hücre peleti pipetlenmiştir.
14. Homojenize edilmiş numuneler 4 °C’de 30 dakika bekletilmiştir.
15. Numuneler $12.000\text{-}16.000 \times g$ ’da 4 °C’de 20 dakika santrifüjlenmiştir.
16. 15 µl süpernatant/milyon hücre pelet bozmadan alınarak önceden soğutulmuş yeni bir tüpe aktarılmıştır. (Durma noktası #2: hücre lizatları kuru buzla dondurulabilmektedir veya -80 °C dondurucuda 1 aya kadar saklanabilmektedir).

Telomeraz Reaksiyon Kurulumu:

17. 5.5 µl telomeraz pozitif hücre lizatı (Cat #8928e) yeni bir tüpe aktarılmıştır.
18. Etkisiz hale getirmek için 85 °C'de 10 dakika ısıtılmıştır. Böylece telomeraz negatif hücre lizatı hazırlanmıştır.
19. Tüp 1,500x g'da 10 saniye boyunca santrifüjlenmiştir ve ardından buz üzerinde bırakılmıştır.
20. 5x telomeraz reaksiyon tamponu (Cat #8928b) çözöldükten sonra buz üzerinde bırakılmıştır.
21. Her bir örnek için telomeraz reaksiyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.8).
22. Pozitif kontrol olarak 0.5 µl telomeraz-pozitif hücre lizatı (Cat #8928e) kullanılmıştır.
23. Negatif kontrol olarak hazırlanan 0.5 µl telomeraz-negatif hücre lizatı kullanılmıştır.
24. Ayrı bir tüpe sadece su ve son hazırlanan liziz tamponundan 0.5 µl alınarak başka bir "lizat içermeyen" negatif kontrol reaksiyonu hazırlanmıştır.
25. Telomeraz pozitif ve negatif numuneleri kullanımdan hemen sonra -80 °C'de saklanmıştır.
26. Reaksiyonlar 37 ° C'de 3 saat inkübe edilmiştir.
27. Örnekler 85 °C'de 10 dakika ısıtılarak reaksiyonları durdurulmuştur.
28. Reaksiyon tüpleri 1,500x g'de 10 saniye santrifüjlenmiştir ve buz üzerinde bırakılmıştır. (Durma noktası #3: reaksiyon sonrası numuneler -20 °C dondurucuda 3 güne kadar veya -80 °C dondurucuda 1 aya kadar saklanabilmektedir.)
29. qPCR Kurulumu
30. Telomer primer seti (TPS), liyofilize, Cat #8928c) oda sıcaklığında ısınmaya bırakılmıştır.
31. TPS tüpleri 1.500x g'da 1 dakika santrifüjlenmiştir.
32. TPS stok çözeltisi yapmak için telomer primer setine (TPS) 200 µl nükleaz içermeyen su (Cat #8928d) eklenmiştir. Gerektiği gibi alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır.
33. Telomeraz sonrası reaksiyon örnekleri için TPS stok çözeltisi ile qPCR reaksiyonları Çizelge 3.9'a göre hazırlanmıştır.
34. qPCR reaksiyonu hazırlanan PCR plakasının üzeri seal ile kapatılmıştır.
35. Plate 1,500x g'da 15 saniye santrifüjlenmiştir.

36. qPCR Program kurulumu Çizelge 3.10'a göre yapılmıştır.

Çizelge 3.8. Telomeraz reaksiyon kurulumu

Hücre lizatı veya hücre liziz tamponu	0.5 µl
5x Telomeraz reaksiyon tamponu (Cat #8928b)	4 µl
Nükleaz İçermeyen Su (Cat #8928d)	15.5 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

Çizelge 3.9. Telomeraz enzim aktivitesi qPCR reaksiyon kurulumu

Telomeraz sonrası reaksiyon örneği veya Su	1 µl
Primer Stok Çözeltilisi	2 µl
2X GoldNStart TaqGreen qPCR master mix (Cat #MB6018a-1)	10 µl
Nükleaz içermeyen su (Cat #8928d)	7 µl
Toplam reaksiyon hacmi	20 µl

Çizelge 3.10. Telomeraz enzim aktivitesi qPCR program kurulumu

Adım	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
Denatürasyon başlangıcı	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	20 s	36
Bağlanma (annealing)	52 °C	20 s	
Uzama (extension)	72 °C	45 s	
Veri elde etme	Plate okuma		
İsteğe bağlı	Erime eğrisi analizi		1
Bekletme	20 °C	belirsiz	1

3.2.11. İstatistiksel analizler

Asit, baz ve kontrol olmak üzere üç ayrı deneme grubuna ait *Daphnia magna* örnekleri için gerçekleştirilen qPCR amplifikasyon sonuçları değerlendirilirken, β -aktin (housekeeping gen) referans alınmıştır. Gen ekspresyon düzeyleri, $\Delta\Delta Ct$ yöntemi ile hesaplanmıştır ve elde edilen veriler göreceli gen ekspresyon düzeyi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) cinsinden belirlenmiştir. Denemeler her bir pH grubu için 3 tekerrürlü ve 2 defa tekrarlanarak yapılmıştır. Bu sebeple ΔCt hesaplamaları tekerrür ve tekrarların ortalaması üzerinden yapılmıştır.

$$\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{hedef gen}} - \Delta Ct_{\text{referans gen (housekeeping)}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{deney grubu}} - \Delta Ct_{\text{kontrol grubu}}$$

$$\text{Göreceli Gen İfadesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Elde edilen qPCR verilerinin istatistiksel olarak analiz edilebilmesi için öncelikle dağılım özellikleri değerlendirilmiştir. Her grubun (asit, baz ve kontrol) gen ekspresyon verileri için Shapiro-Wilk testi uygulanarak normallik durumu test edilmiştir. Test sonuçlarına göre verilerin normal dağılım göstermemesi durumunda parametrik olmayan yöntemlere başvurulmuştur.

Gruplar arasında gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla, üç ve daha fazla bağımsız grubun medyan değerlerini karşılaştırmaya olanak sağlayan Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Bu analiz sonucunda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanması halinde, farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılmıştır.

Telomeraz gen bölgeleri için kullanılan primerler (P1–P6) arasında gen ekspresyonu bakımından farkları değerlendirmek amacıyla da Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. İstatistiksel olarak fark bulunan primerler için Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Bu sayede, gen ailesi içindeki bölgelerin pH stresine verdiği yanıtların ayırt edilmesi amaçlanmıştır.

pH grupları arasında zamana bağlı olarak hayatta kalma oranları simülasyon tabanlı Kaplan-Meier sağkalım eğrileri ile karşılaştırılmıştır.

Tüm istatistiksel analizlerde anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Veriler, ilgili grafik ve tablo destekleri ile birlikte değerlendirilmiş ve istatistiksel hesaplamalar uygun analiz yazılımı (SPSS v25) aracılığıyla gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, *Daphnia magna* (su piresi) bireylerinin üç farklı pH ortamında (asidik, bazik, nötr-kontrol) 21 gün boyunca yetiştirilmesi sonucunda, çevresel pH değişimleri, telomeraz gen ailesine ait altı genin (P1–P6) göreceli ifade düzeyleri ve hayatta kalma oranları belirlenmiştir. Böylece farklı pH muamelesinin telomeraz enzimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Elde edilen bulgular aşağıda alt başlıklar hâlinde sunulmuştur.

4.1. pH Koşullarına Bağlı Fizyolojik ve Çevresel Gözlem Bulguları

4.1.1. Deney ortamında *Daphnia magna* canlılık takibi

Deneyin ön deneme aşamasında asit (pH: 4.55), baz (pH:10.13) ve kontrol (pH: 8.33) olarak hazırlanan su ortamlarında *Daphnia magna* 'ların canlılık takibi 21 gün boyunca 3 günde bir yapılmıştır (Çizelge 4.1). Bu ön denemede pH 4.55 olarak ayarlanan su ortamında su pirlirinin kısa zamanda öldüğü görülmüştür (Şekil 4.1).

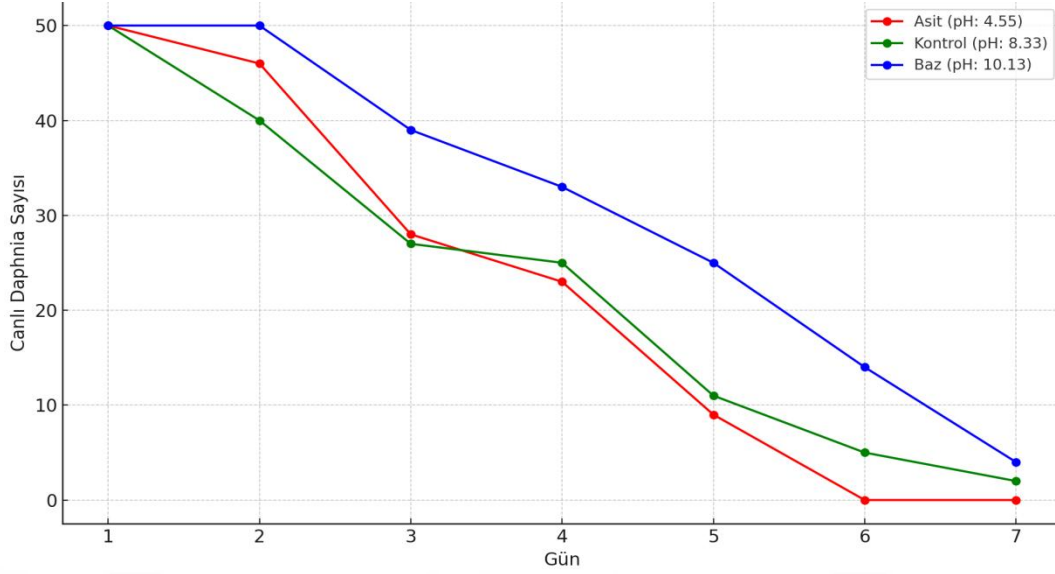
Denemenin sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için yapılan ön çalışmalarda Asidik ortamın pH değeri 4.55'e sabitlendiğinde ve kontrol grubunda (pH 8.33) çok hızlı bir şekilde ölümlerin gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Asidik ortamda 18. günde tüm bireyler ölmüştür. Bazik ortamda (pH 10.13) ise daha yavaş bir ölüm oranı gözlemlenmiştir. Bazik ortamda 21. gün sonunda birey sayısı 4'e düşmüştür.

Bu durum projenin sürdürülebilmesini imkansızlaştırdığı için asidik ortamın pH'sı kademeli olarak artırılmıştır ve ölen su pirlirinin sayısı günlük olarak kaydedilmiştir. Ön çalışma sonucunda denemenin sürdürülebilmesi için asidik grupta pH'ın 5.90'a çıkarılmasına karar verilmiştir (Çizelge 4.2).

Böylece deneme gruplarını oluşturmak için 250 ml su içeren beherlerde düzenekler hazırlanmıştır. Her bir behere 2 ml'ye 1 birey olacak şekilde *Daphnia magna* eklenmiştir. Her bir beher için (A1-A2-A3-B1-B2-B3-K1-K2-K3) ortalama canlı sayısı ± 3 değişmektedir. Çalışmada pH'lara göre stok su hazırlanmış olup her 24 saatte bir beherlerdeki su, stok su ile tazelenmiştir. Böylece 21 günlük deney süresince beherlerdeki canlı su piresi sayıları takip edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.1. Ön çalışmalarda farklı pH ortamlarında *Daphnia magna* 'nın sayımı sonuçları

Gün	Canlı <i>Daphnia</i> Sayısı		
	Asit (pH: 4.55)	Kontrol (pH: 8.33)	Baz (pH: 10.13)
1.	50	50	50
2.	46	40	50
3.	28	27	39
4.	23	25	33
5.	9	11	25
6.	0	5	14
7.	0	2	4



Şekil 4.1. Ön çalışmalarda farklı pH ortamlarında üçer gün arayla 21 süresince belirlenen canlı *Daphnia magna* sayıları

4.1.2. *Daphnia magna*'ların sağkalım eğrileri

Bu çalışmada, *Daphnia magna*'ların farklı pH koşullarındaki (asidik, bazik ve kontrol) hayatta kalma performansları 21 gün süresince izlenmiştir. Her deney grubunda başlangıçta pH değeri ayarlanmış ve içerisinde 250 ml bulunan beherlere aynı havuzdan aynı yaşta 125 adet su piresi aktarılmıştır. Deney süresince günlük olarak hayatta kalan *Daphnia* sayıları belirlenmiştir (Çizelge 4.2; Şekil 4.2).

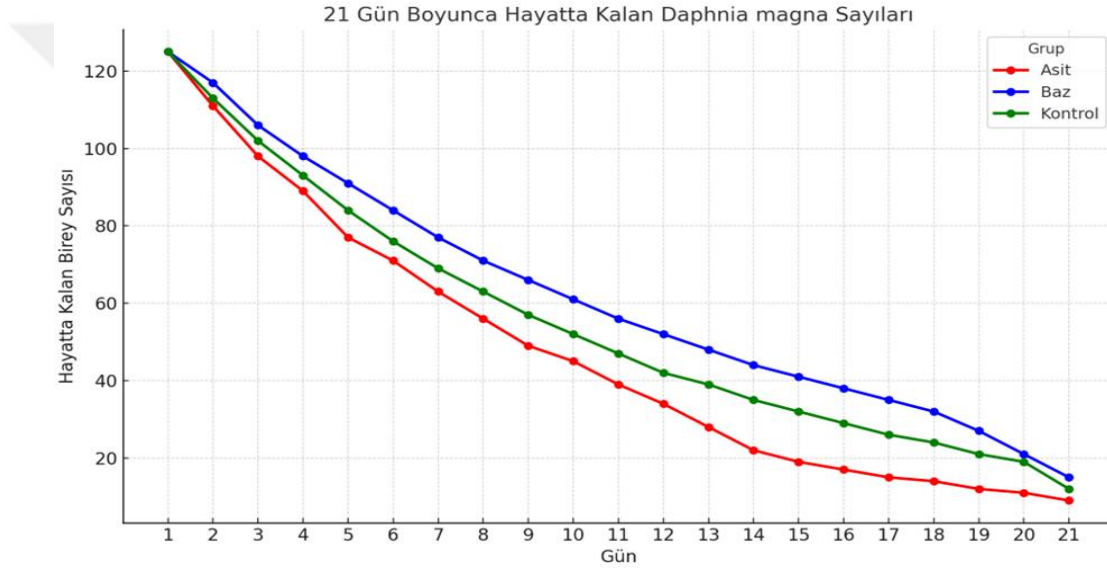
Çizelge 4.2. Deneme gruplarında *Daphnia magna*'nın 21 günlük canlılık takibi

Gün	Canlı <i>Daphnia</i> Sayısı		
	Asit (pH: 5.90)	Kontrol (pH: 8.33)	Baz (pH: 10.13)
1.	125	125	125
2.	111	113	117
3.	98	102	106
4.	89	93	98
5.	77	84	91
6.	71	76	84
7.	63	69	77
8.	56	63	71
9.	49	57	66
10.	45	52	61
11.	39	47	56
12.	34	42	52
13.	28	39	48

(Devamı arkada)

Çizelge 4.2.'nin devamı

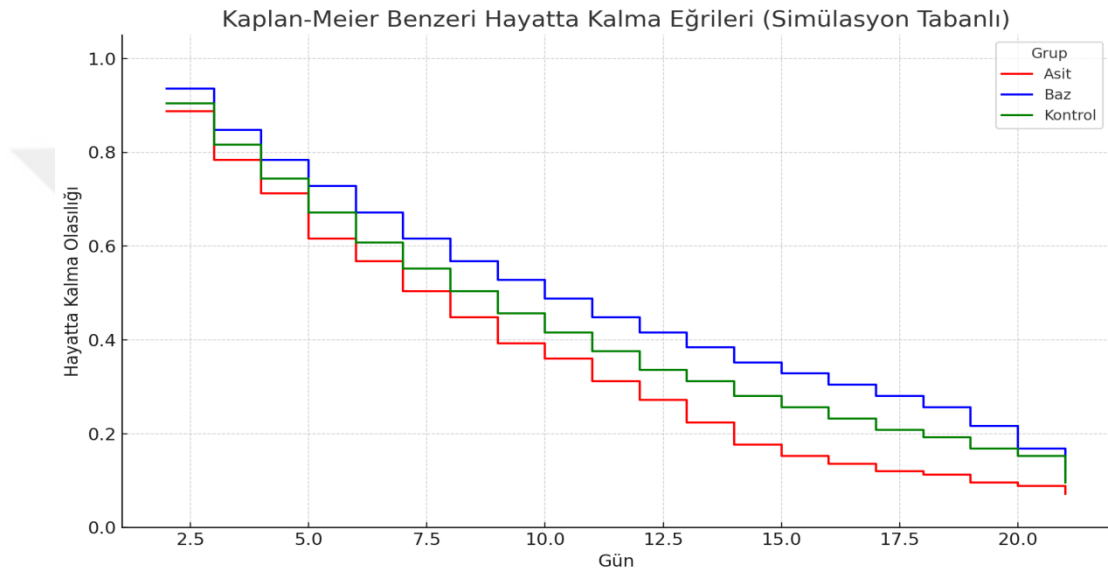
14.	22	35	44
15.	19	32	41
16.	17	29	38
17.	15	26	35
18.	14	24	32
19.	12	21	27
20.	11	19	21
21.	9	12	15

Şekil 4.2. Asit, baz ve kontrol gruplarında 21 gün boyunca hayatta kalan *Daphnia magna* bireylerinin sayıları

Simülasyon tabanlı Kaplan-Meier sağkalım eğrileri (Şekil 4.3), gruplar arasında zamana bağlı olarak hayatta kalma oranlarında belirgin farklılıklar bulunduğunu ortaya koymuştur. Hayatta kalma oranlarına ilişkin bu genel eğilimler değerlendirildiğinde, asidik grupta birey sayısında hızlı bir azalma meydana geldiği, bazik grupta ise daha yavaş fakat sürekli bir düşüş olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubunda ise en yüksek hayatta kalma oranları korunmuştur ve düşüş eğrisi diğer gruplara kıyasla daha yavaş gerçekleşmiştir. Bu gözlemler, Çizelge 4.3'te 5 günlük aralıklarla özetlenmiştir. Özellikle asidik pH koşullarında hayatta kalma oranı 21. gün sonunda %7.2'ye kadar düşerken, bu oran kontrol grubunda %9.6 ve bazik grupta %12.0 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Her grup için hayatta kalma oranlarının 5 günlük aralıklarla özetlenmesi

Gün	Asit	Baz	Kontrol
1	1.00	1.00	1.00
2	0.62	0.73	0.67
3	0.36	0.49	0.42
4	0.15	0.33	0.26
5	0.07	0.12	0.10



Şekil 4.3. Kaplan-Meier benzeri sağkalım eğrileri, grup düzeyindeki özet verilere dayanarak simülasyon temelli oluşturulmuş olup, farklı pH koşullarında (asidik, bazik ve kontrol) yetiştirilen *Daphnia magna* bireylerinin 21 günlük deney süreci boyunca hayatta kalma olasılıklarını göstermektedir. Bazik ortam (mavi) en yüksek hayatta kalma olasılığına sahiptir. Kontrol (yeşil) ikinci sıradadır. Asidik ortam (kırmızı) en düşük sağ kalım oranlarını göstermektedir

4.1.3. Ortam pH değişim analizi

Bu çalışmada, farklı pH değerlerinin telomeraz gen ekspresyonu ve dolayısıyla organizma üzerindeki etkisinin araştırılması için model hayvan olarak *Daphnia magna* kullanılmıştır. Proje amacına uygun olarak asidik, bazik ve nötr olmak üzere üç farklı pH ortamı oluşturulmuştur ve her gruba ait stok çözeltilerinden su pirelerinin bulunduğu deney kaplarındaki su tazelenerek pH değerleri sabit tutulmuştur. Her grup üç tekerrürlü olarak (A1–A3, B1–B3, K1–K3) 21 gün boyunca izlenmiştir. Deney süresince her beherin günlük pH ölçümleri alınarak Çizelge 4.4’te olduğu üzere toplam 189 pH ölçümü yapılmıştır.

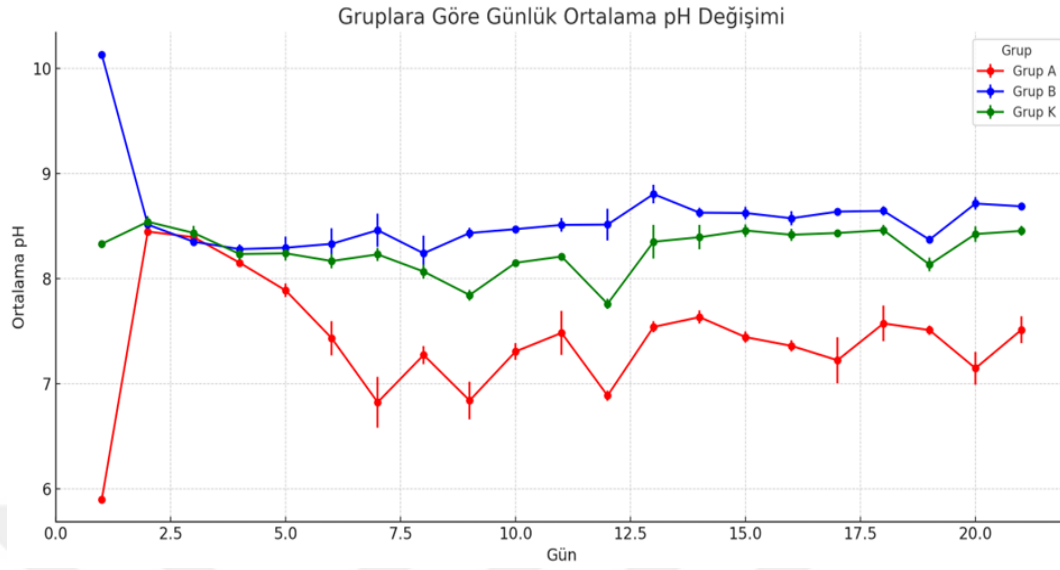
Çalışma genelinde su pirelerinin farklı pH koşullarında çevre pH'ını dengeleme yönünde etkide bulunduğu gözlemlenmiştir. Özellikle asidik ve bazik gruplarda, 21 gün boyunca ortamın pH'ını nötr değerlere yaklaştırma eğilimi istatistiksel ve grafiksel olarak desteklenmiştir. Bu durum, su pirelerinin çevre koşullarındaki homeostatik dengenin bir parçası olabileceğine işaret etmektedir.

Üç farklı pH grubunda 21 gün boyunca yapılan günlük ölçümler sonucunda, *Daphnia magna*'ların bulunduğu ortamların pH değerlerinde dikkate değer değişiklikler meydana gelmiştir ve bu değişim eğilimleri Şekil 4.4'te görsel olarak sunulmuştur. Asidik grupta, başlangıçta düşük olan pH değeri zamanla artmıştır ve yaklaşık 8 seviyesine ulaşarak nötrleşme eğilimi göstermiştir. Bazik grupta, başlangıçta yüksek olan pH değeri deney süresi boyunca azalarak nötr seviyelere yaklaşmıştır. Kontrol grubunda ise pH değerlerinde yalnızca minimal düzeyde dalgalanma gözlenmiştir, genel olarak çevresel istikrar korunmuştur.

pH değerlerindeki bu değişim, *Daphnia*'ların çevre pH'ını dengeleme yönünde aktif bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Yapılan Kruskal-Wallis testi sonuçlarına göre özellikle deneyin ilk gününde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu durum, deneyin ilk gününde pH grupları arasında su pirelerinin pH'ı nötrleştirme etkisinin belirgin farklılıklar gösterdiğini, ancak ilerleyen günlerde bu farklılıkların istatistiksel olarak anlamlılığını yitirerek zamanla azaldığını ya da ortadan kalktığını göstermektedir. Bu durum su pirelerin bulundukları ortamın pH değerini kendilerine göre en uygun değere ulaştırabildiklerini göstermiştir (Şekil 4.4).

Çizelge 4.4. Asit, kontrol ve baz beherlerde 21 gün boyunca ölçülen 24 saatlik pH değişimler

Gün	Asit				Baz				Kontrol				°C
	pH Stok	pH A1	pH A2	pH A3	pH Stok	pH B1	pH B2	pH B3	pH Stok	pH K1	pH K2	pH K3	
1	5.90	5.90	5.90	5.90	10.13	10.13	10.13	10.13	8.33	8.33	8.33	8.33	22.1
2	5.90	8.40	8.48	8.46	10.13	8.45	8.54	8.55	8.33	8.48	8.58	8.56	22.0
3	5.90	8.35	8.41	8.42	10.13	8.33	8.37	8.35	8.33	8.36	8.50	8.44	21.5
4	5.90	8.14	8.16	8.15	11.13	8.23	8.32	8.29	8.33	8.16	8.29	8.25	20.6
5	5.90	7.95	7.82	7.89	10.13	8.20	8.41	8.27	8.33	8.24	8.31	8.17	22.1
6	5.90	7.61	7.29	7.40	10.13	8.22	8.50	8.27	8.33	8.10	8.24	8.16	21.3
7	5.90	6.55	6.91	7.01	10.13	8.35	8.64	8.39	8.33	8.28	8.25	8.16	21.8
8	5.90	7.27	7.36	7.19	10.13	8.22	8.42	8.08	8.33	8.11	8.10	7.99	22.0
9	5.90	6.98	6.64	6.90	10.13	8.42	8.49	8.39	8.33	7.90	7.83	7.80	22.0
10	5.90	7.33	7.22	7.37	10.13	8.46	8.50	8.45	8.33	8.14	8.13	8.18	22.0
11	5.90	7.65	7.25	7.55	10.13	8.45	8.58	8.50	8.33	8.21	8.18	8.24	22.1
12	5.90	6.83	6.91	6.92	10.13	8.50	8.67	8.37	8.33	7.71	7.81	7.76	22.2
13	5.90	7.50	7.52	7.60	10.13	8.90	8.78	8.73	8.33	8.53	8.22	8.30	22.1
14	5.90	7.67	7.56	7.67	10.13	8.68	8.60	8.60	8.33	8.46	8.46	8.26	22.1
15	5.90	7.38	7.47	7.48	10.13	8.63	8.68	8.56	8.33	8.40	8.45	8.52	22.2
16	5.90	7.40	7.38	7.30	10.13	8.65	8.55	8.52	8.33	8.35	8.46	8.44	22.2
17	5.90	6.98	7.29	7.40	10.13	8.67	8.63	8.61	8.33	8.41	8.46	8.43	22.1
18	5.90	7.43	7.76	7.53	10.13	8.67	8.67	8.59	8.33	8.48	8.50	8.40	21.6
19	5.90	7.49	7.56	7.48	10.13	8.37	8.36	8.38	8.33	8.16	8.18	8.06	23.1
20	5.90	6.98	7.17	7.29	10.13	8.65	8.77	8.72	8.33	8.34	8.48	8.45	23.1
21	5.90	7.37	7.56	7.61	10.13	8.68	8.71	8.67	8.33	8.48	8.48	8.40	22.6



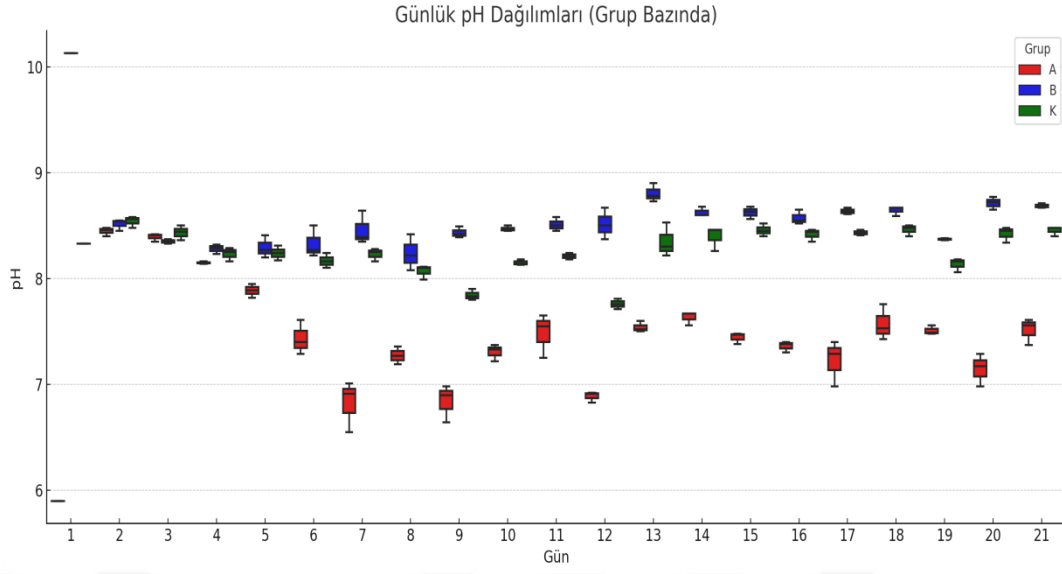
Şekil 4.4. 21 gün boyunca Asidik (A), Bazik (B) ve Kontrol (K) gruplarındaki su pirelerinin bulundukları ortamda pH değerlerinin değişim grafiği

4.1.4. pH değişim miktarları (1. Gün – 21. Gün)

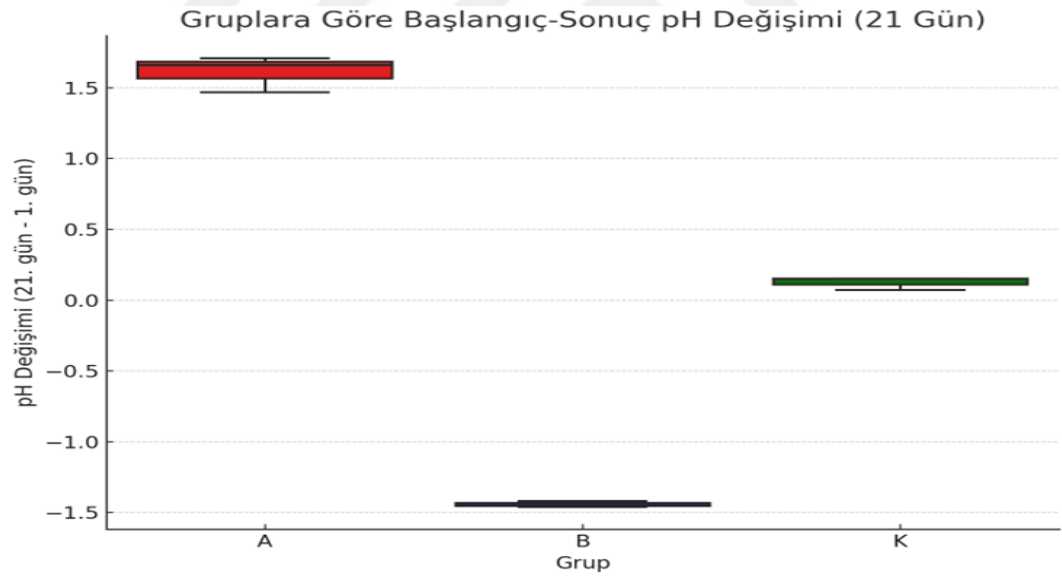
Deney boyunca yapılan günlük pH ölçümleri, *Daphnia magna* bireylerinin bulundukları su ortamının kimyasal özellikleri üzerinde düzenleyici bir etkisinin olabileceğini ortaya koymuştur. Bu bağlamda, her grubun başlangıç (1. gün) ve bitiş (21. gün) pH değerleri karşılaştırılarak ortamda meydana gelen toplam pH değişim miktarları analiz edilmiştir. Şekil 4.5'te sunulan boxplot, deney süresi boyunca her gün için üç farklı pH grubunun ortam pH dağılımını göstermektedir. Deneyin ilk günlerinde gruplar arasında pH değerleri açısından belirgin farklılıklar gözlenirken, ilerleyen günlerde bu dağılımların giderek örtüşmeye başladığı görülmektedir. Bu durum, *Daphnia magna* bireylerinin ortam pH'ını nötrleştirme yönündeki etkisinin zamanla dengeye ulaştığını düşündürmektedir.

Asidik grupta (A), başlangıçta düşük olan pH değeri, ortalama $\sim +1.5$ – 1.7 birimlik bir artış göstererek nötr değerlere yaklaşmıştır. Bazik grupta (B) ise başlangıçta yüksek olan pH seviyesi, ortalama ~ -1.4 birimlik bir düşüşle yine nötr seviyelere doğru gerilemiştir. Buna karşın, kontrol grubunda (K) pH değişimi oldukça sınırlı kalmıştır ve $\sim \pm 0.2$ birimlik dalgalanma ile çevresel istikrar büyük ölçüde korunmuştur. Gruplar arasında başlangıç pH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmasına rağmen, zamanın (günlerin) etkisi ve grupların zaman içerisinde pH'ı değiştirme hızları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Söz konusu pH değişim eğilimleri, Şekil 4.6'da grafiksel olarak sunulmaktadır ve her grubun deney süresince oluşturduğu ortalama pH değişim miktarları karşılaştırmalı biçimde görselleştirilmektedir.



Şekil 4.5. Her gün için üç grubun pH dağılımını gösteren boxplot



Şekil 4.6. Asit, baz ve kontrol grubunda 21 günlük deney sonunda ortalama pH değerleri

Bu sonuçlar, *Daphnia magna* bireylerinin hem asidik hem de bazik ortamlarda pH'ı nötrleştirme yönünde etkili olduğunu ve bu organizmaların çevresel homeostazı sağlama potansiyeline sahip olabileceğini desteklemektedir.

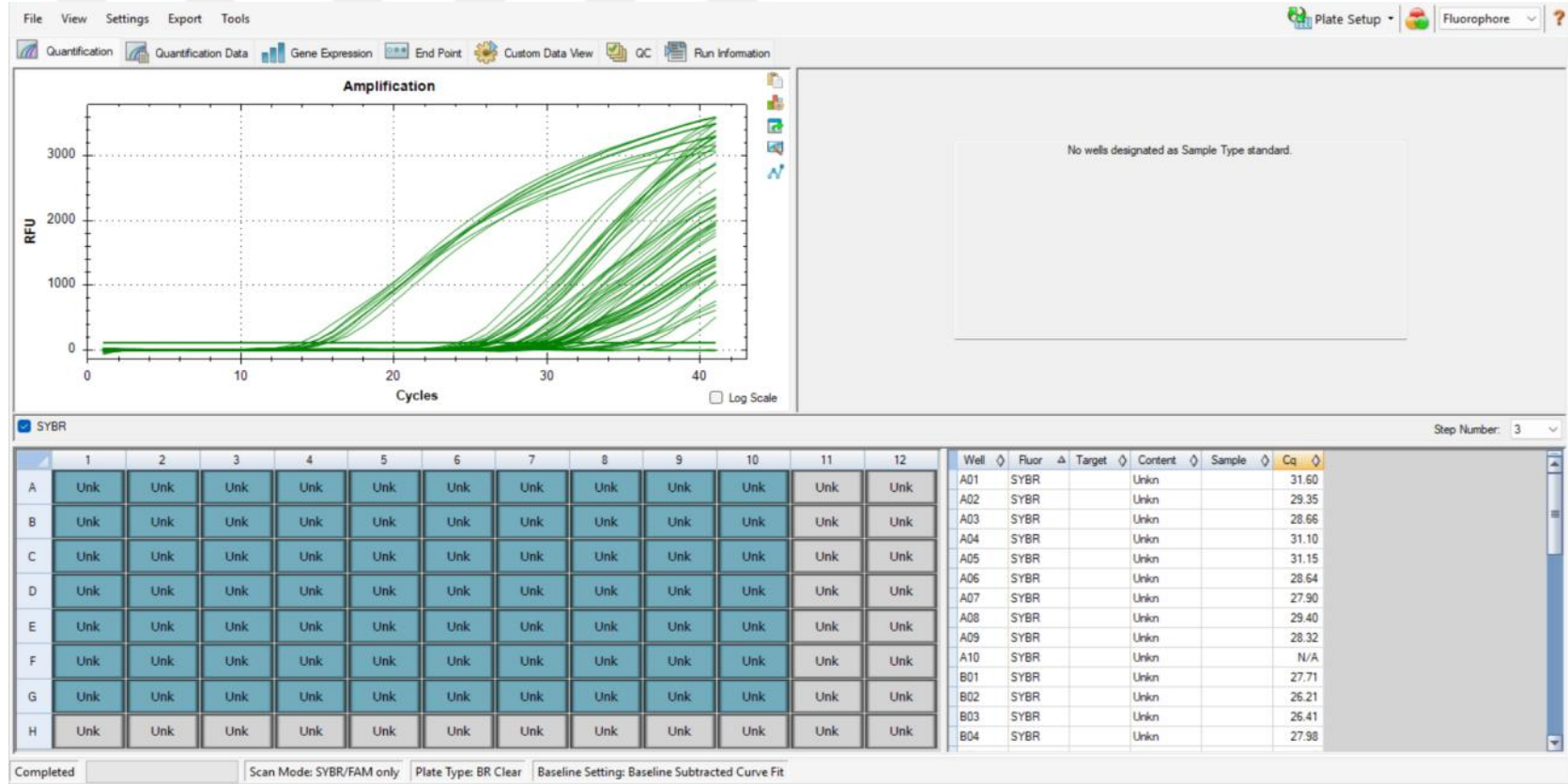
4.2. Moleküler Analiz Bulguları

Telomeraz gen ekspresyonu analizlerine (RT-qPCR) başlamadan önce izole edilen RNA örneklerinin kalitesi ve konsantrasyonları Biodrop cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.10). Elde edilen RNA ölçüm sonuçları Çizelge 4.5'te sunulmuştur. DNA ve RNA'nın saflık düzeyinin değerlendirilmesinde, 260 nm ve 280 nm dalga boylarında ölçülen absorbans oranı kullanılmakta olup, 2.00 oranı genellikle saf RNA varlığına işaret etmektedir.

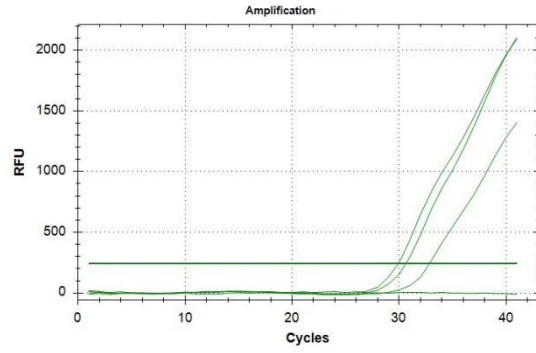
Çizelge 4.5. Farklı pH gruplarına ait *Daphnia magna* 'larda ölçülen absorbans değerleri

Beherler	A260/230	A260/280	Konsantrasyon (ng/μl)
A1	2.243	2.211	125.60
A2	0.888	2.221	120.80
A3	2.204	2.204	86.40
K1	1.786	2.174	40.00
K2	2.070	2.226	94.40
K3	1.556	2.211	100.80
B1	0.583	2.231	92.80
B2	2.164	2.194	126.40
B3	2.145	2.209	118.40

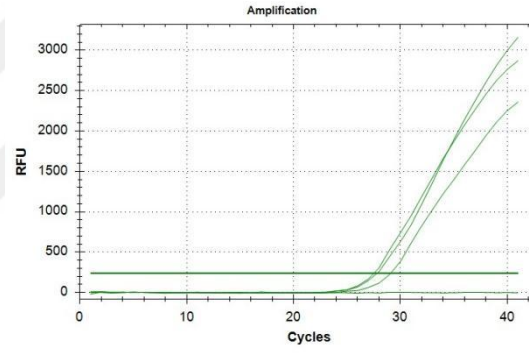
RNA'ların kalite ve konsantrasyonları belirlendikten sonra, izole edilen RNA örnekleri, Çizelge 3.7'de belirtilen protokol doğrultusunda thermal cycler cihazı kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Elde edilen cDNA'lar, tez kapsamında incelenen aday genlerin kantitatif RT-qPCR analizlerinde kullanılmıştır. Seçilen transkript bölgelerinin RT-qPCR ile belirlenen kantitasyon sonuçları Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Her bir primerin qPCR cihazı ile elde edilmiş amplifikasyon görüntüleri de Şekil 4.8 - 4.11'de sunulmuştur.



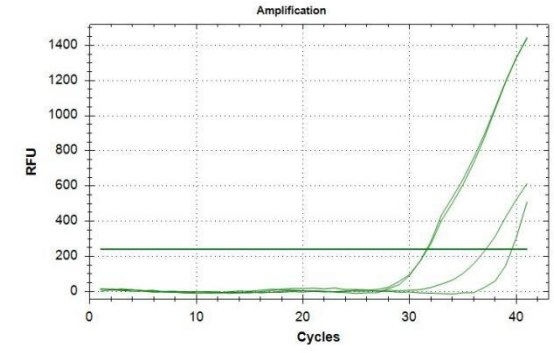
Şekil 4.7. *Daphnia magna* telomراز transkriptlerinin RT-qPCR sonuçları



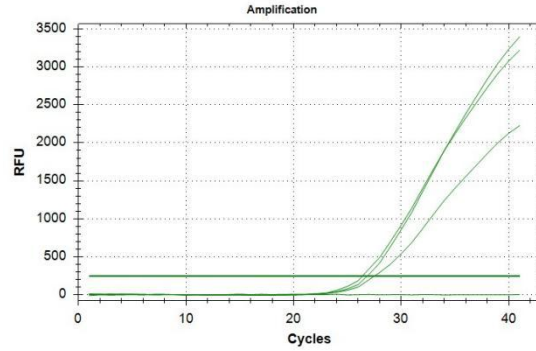
a)



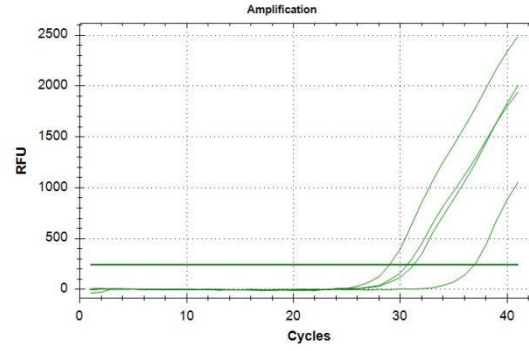
b)



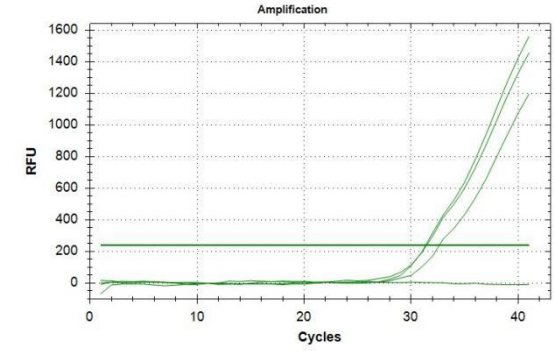
c)



d)

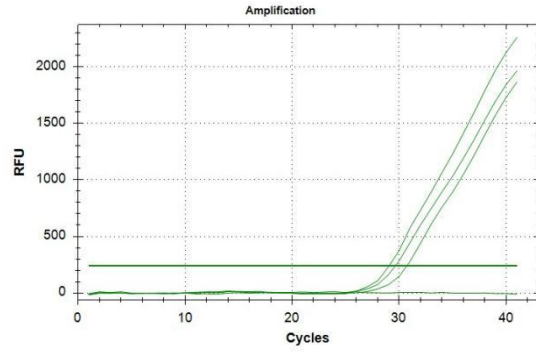


e)

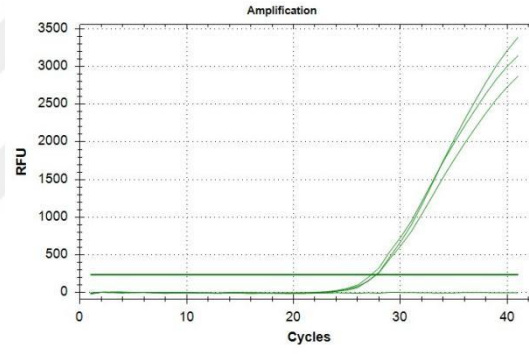


f)

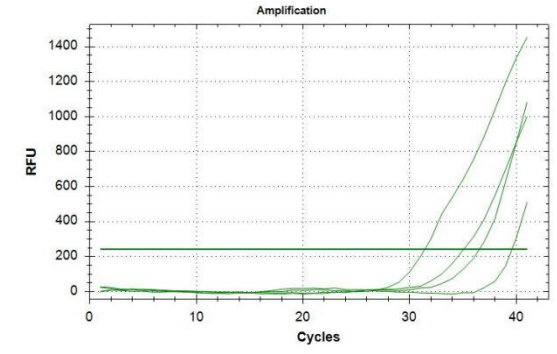
Şekil 4.8. Asit beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; **a)** Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; **b)** Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; **c)** Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; **d)** Primer x4- XM_045169747.1 amplifikasyonu; **e)** Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; **f)** Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu



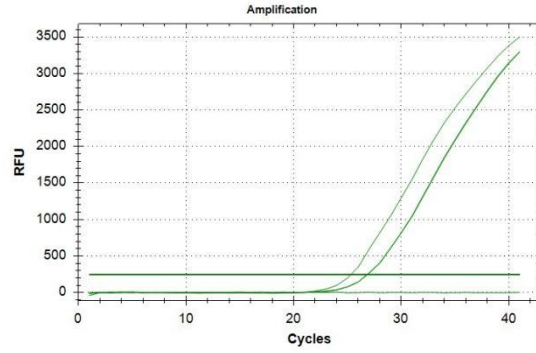
a)



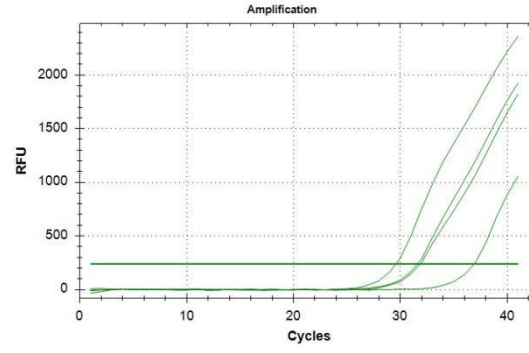
b)



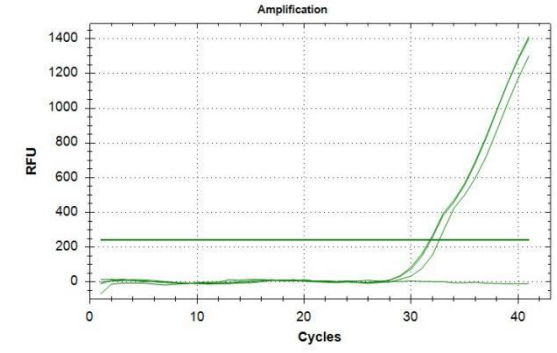
c)



d)

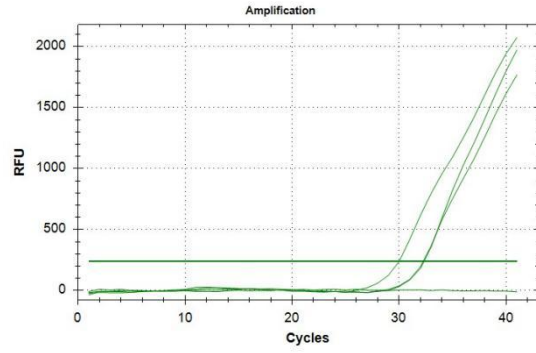


e)

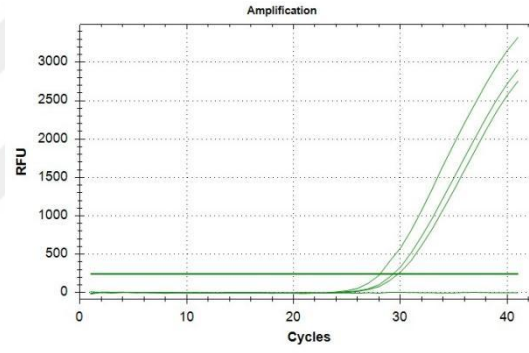


f)

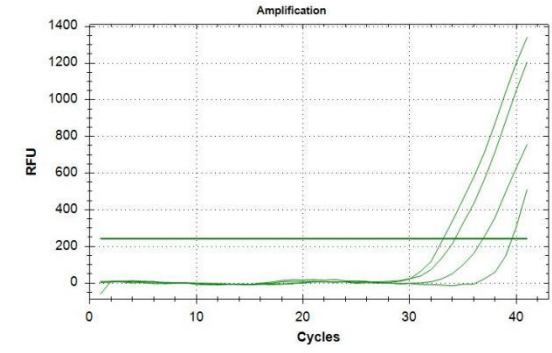
Şekil 4.9. Baz beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; **a)** Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; **b)** Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; **c)** Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; **d)** Primer x4- XM_045169747.1 amplifikasyonu; **e)** Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; **f)** Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu



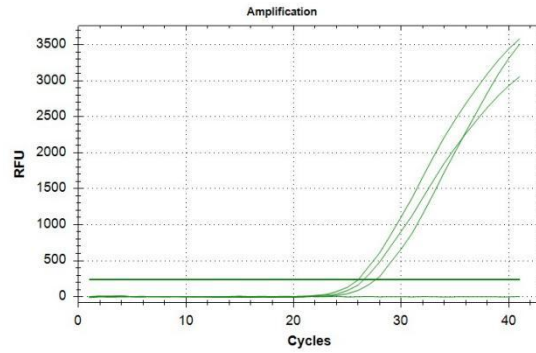
a)



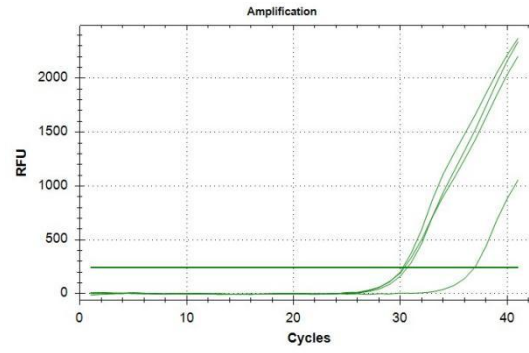
b)



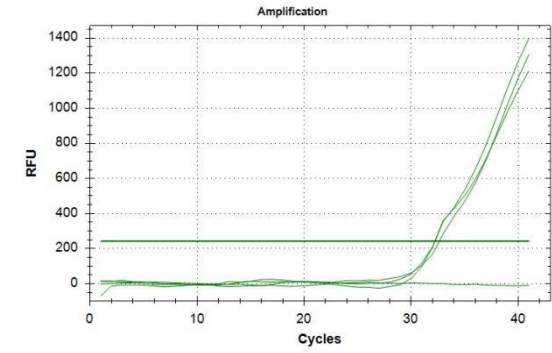
c)



d)

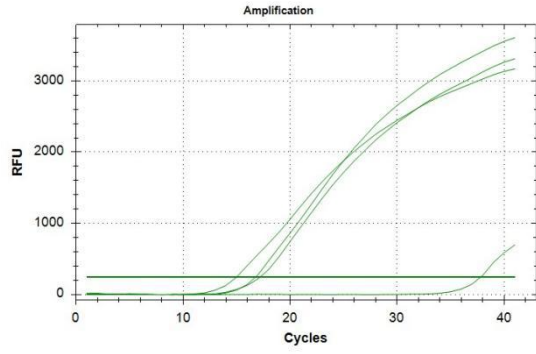
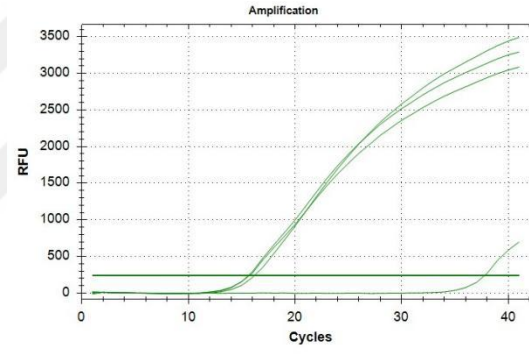
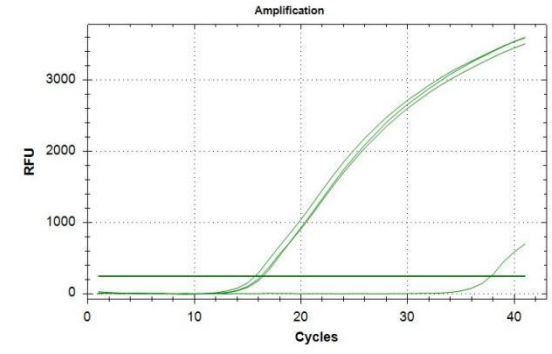


e)



f)

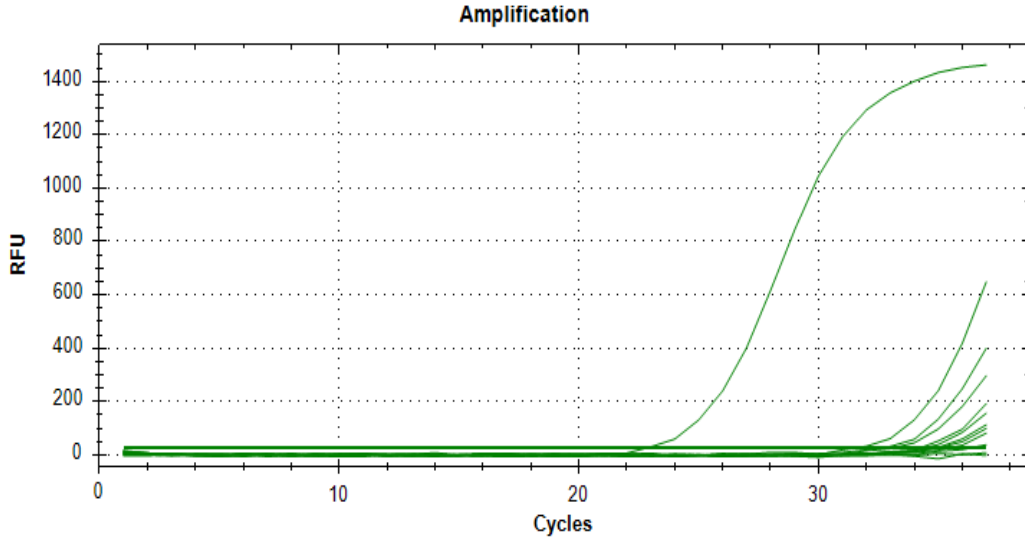
Şekil 4.10. Kontrol beherden alınan örneklerde transkriptlerin (1-6) RT-qPCR sonuçları; **a)** Primer x1- XM_032923518.2 amplifikasyonu; **b)** Primer x2- XM_032923521.2 amplifikasyonu; **c)** Primer x3- XM_032923519.2 amplifikasyonu; **d)** Primer x4- XM_045169747.1 amplifikasyonu; **e)** Primer x5- XM_032923522.2 amplifikasyonu; **f)** Primer x6- XM_045169748.1 amplifikasyonu

**a)****b)****c)**

Şekil 4.11. β -aktin RT-qPCR sonuçları; **a)** Asit beherdeki β -aktin amplifikasyonu; **b)** Baz beherdeki β -aktin amplifikasyonu; **c)** Kontrol beherdeki β -aktin amplifikasyonu

4.2.1. Telomerazın proteomik seviyede analizi

Proteomik seviyede telomeraz enzim aktivitesini ölçmek için RT-qPCR yöntemi kullanılmıştır. Uygulama Çizelge 3.10’da belirtildiği üzere kit protokolüne göre qPCR gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.12’de sunulmuştur. Beklenen amplifikasyon eğrisini sadece pozitif kontrol olarak kullanılan pozitif hücre lizatı vermiş olup asit, baz ve kontrol beherlerin alınan örneklerde pozitif amplifikasyon görülmemiştir. Bütçeden kaynaklı olarak uygulama tekrarlanamamıştır. Bu nedenle proteomik düzeyde analiz sonuçları alınamamıştır.



Şekil 4.12. Telomeraz enziminin proteomik seviyede analizi

4.2.2. Telomeraz gen ifade düzeyleri

Bu çalışmada, üç farklı pH ortamında yetiştirilen su pirelerinde telomeraz geninin 6 ekzon bölgesinin (P1–P6) göreceli ifade düzeyleri qPCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Çizelge 4.6’da verilen Ct değerlerinden hesaplanan $\Delta\Delta C_t$ yöntemiyle her bir gen için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ hesaplaması yapılmıştır ve gen ifadeleri değerlendirilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.6. Üç farklı pH derecesinde 21 gün yetiştirilen *Daphnia*'larda telomeraz geninin 6 ekzon bölgesine ait qPCR sonuçları

Gruplar	Ct_P1	Ct_P2	Ct_P3	Ct_P4	Ct_P5	Ct_P6	Ct_ref
A1	30.95	29.1	37.15	27.47	31.52	32.66	16.68
A1	32.82	29.10	37.15	27.47	30.62	32.66	17.17
A2	29.42	27.53	31.68	26.37	30.99	31.56	16.33
A2	30.62	27.53	31.68	26.37	28.98	31.47	14.99
A3	29.11	27.84	31.59	26.81	31.34	33.15	16.79
A3	29.93	27.84	31.59	26.81	31.22	31.38	16.74
B1	27.32	26.36	32.04	25.73	29.93	32.14	16.99
B1	29.08	27.29	35.06	25.29	31.89	31.76	15.73
B2	30.61	27.15	31.32	25.82	29.28	31.55	15.76
B2	30.73	27.73	36.53	26.78	29.59	31.86	16.20
B3	27.46	25.46	29.87	24.35	28.23	29.86	15.03
B3	29.66	27.78	31.41	26.83	31.60	32.63	15.63
K1	28.92	31.23	39.52	30.86	28.96	31.46	15.67
K1	32.26	29.29	33.14	26.54	30.22	32.21	16.23
K2	29.26	27.89	35.84	27.75	29.31	30.79	15.98
K2	32.34	29.76	34.25	27.65	30.63	32.63	15.65
K3	27.53	25.4	31.62	24.64	27.83	31.08	12.95
K3	30.01	28.08	36.87	26.04	30.36	32.21	16.39

Not: Çalışmalar üç tekerrürlü ve iki defa yapılmıştır. Bu sebeple her bir grup iki defa yazılmıştır. Ct: threshold cycle (döngü eşiği)

Çizelge 4.7. Üç farklı pH ortamında yetiştirilen *Daphnia magna* 'ların telomeraz geni için hesaplanan $\Delta\Delta Ct$ değerleri

	P1_2^- $\Delta\Delta Ct$	P2_2^- $\Delta\Delta Ct$	P3_2^- $\Delta\Delta Ct$	P4_2^- $\Delta\Delta Ct$	P5_2^- $\Delta\Delta Ct$	P6_2^- $\Delta\Delta Ct$
K1	0.96	0.44	0.64	0.51	1.35	1.29
K2	0.75	1.09	1.41	0.92	0.94	1.28
K3	1.39	2.08	1.11	2.14	0.79	0.61
A1	0.76	1.94	0.71	2.34	0.95	1.43
A2	1.16	2.4	13.05	2.08	0.84	1.32
A3	3.53	4.16	29.91	3.31	0.74	1.69
B1	6.65	6.34	5.8	6.14	0.72	1.58
B2	0.92	3.18	3.44	2.73	1.53	1.44
B3	2.54	3.59	21.35	2.84	0.7	1.26

4.2.3. Gen bölgesi bazında ekspresyon farklılıkları

Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde telomerez gen ifadesi bakımından 6 gen bölgesini tanımlayıcı istatistikler Çizelge 4.8’de özetlenmiştir. Burada da görüldüğü gibi, üçüncü ekzon bölgesi (Primer 3) en yüksek (8.60) gen ifadesi ortalama değerine sahipken beşinci ekzon bölgesi (Primer 5) en düşük (0.95) ortalama değeri göstermiştir.

Çizelge 4.8. pH grupları birlikte değerlendirildiğinde hesaplanan tanımlayıcı istatistikler

Primer	Ortalama	Std. Sapma	Std. hata	En düşük	En yüksek
Primer 1	2.073	1.957	0.652	0.75	6.65
Primer 2	2.802	1.770	0.590	0.44	6.34
Primer 3	8.602	10.632	3.544	0.64	29.91
Primer 4	2.557	1.614	0.538	0.51	6.14
Primer 5	0.951	0.295	0.098	0.70	1.53
Primer 6	1.322	0.304	0.102	0.61	1.69

P1–P6 primerlerine ait gen ifade düzeylerinin normallik testi sonucunda (Çizelge 4.9) 6 primerin 4’ünün normal dağılmadığı belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Çizelge 4.9. Bölge bazında gen ifadelerinin normal dağılım testi sonuçları

Normalite Testi							
	Genler	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
Gen İfade	Primer 1	.303	9	.017	.731	9	.003
	Primer 2	.145	9	.200*	.958	9	.779
	Primer 3	.271	9	.056	.789	9	.015
	Primer 4	.209	9	.200*	.886	9	.181
	Primer 5	.279	9	.041	.808	9	.025
	Primer 6	.308	9	.014	.830	9	.045

Bu sebepten dolayı 6 genin ekspresiyon seviyelerini karşılaştırmak için non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis H testi yapılmıştır. Her bir pH gurubu 3 tekerrürlü çalışıldığı için her bir gen bölgesinde 9 RT-qPCR sonucunun ortalama değeri hesaplanmıştır (Çizelge 4.10).

Kruskal-Wallis H testi sonucuna göre kullanılan primerlerin en az birinde telomerez gen ifade düzeyinin istatistiksel olarak anlamlı biçimde farklı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.045$).

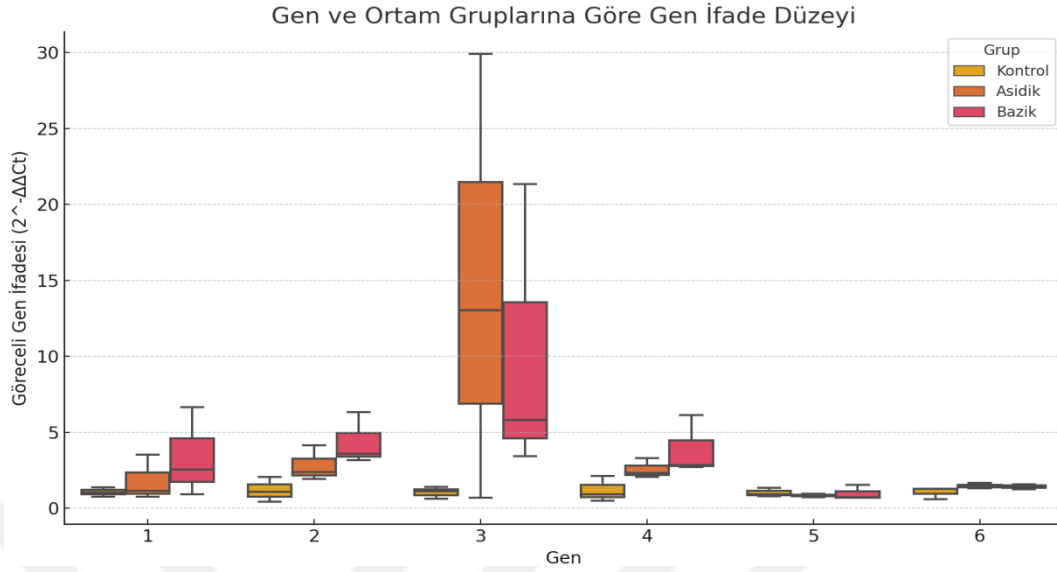
Birden fazla grup arasında gözlenen farklılıkların hangi gruplar arasında anlamlı olduğunu belirlemek amacıyla Tukey çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Bu test, telomeraz gen ailesine ait farklı primerlerin gen ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak birbirine benzer olup olmadığını ortaya koymak için kullanılmıştır. Elde edilen test sonuçları, gen bölgeleri arasındaki farklılıkların derecesini ve anlamlılığını değerlendirmeye olanak sağlamaktadır.

Buna göre, gen ekspresyon düzeyinin ortalama değeri en düşük Primer 5 (0.951) olduğu hesaplanmıştır. Bu durum, Primer 5'in diğer primerlerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük gen ekspresyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Primer 6, Primer 1, Primer 4 ve Primer 2, sırasıyla artan ortalamalarla (1.322 – 2.802 arası) iki farklı alt grupta yer almaktadır. Bu gruplar kısmen birbirine benzerlik göstermekle birlikte, Primer 5 ile açık şekilde ayrılmaktadır. Primer 3'ün ise ortalama 8.602 değeri ile diğer tüm primerlerden farklı olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı şekilde en yüksek gen ekspresyon düzeyine sahip primer olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.10). Bu bulgu, telomeraz genine ait ekzon bölgelerinin pH değişimlerine verdiği yanıtların farklılaşabileceğini göstermektedir. Özellikle P3 bölgesinin bazik ortamda diğer gruplara göre çarpıcı şekilde daha yüksek ifade düzeyine sahip olduğu, asidik grupta ise bu artışın daha da belirginleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.13). Bu durum, P3'ün pH stresine karşı duyarlı bir gen bölgesi olabileceğini düşündürmektedir.

Kruskal-Wallis testi sonucunda primerler arasında saptanan anlamlı farklılıklar ($p = 0.045$) telomeraz gen ailesinin tüm üyelerinin çevresel değişimlere aynı tepkiyi vermediğini, bazı bölgelerin özellikle çevresel strese direncin sağlanmasında daha aktif rol oynayabileceğini göstermektedir (Şekil 4.13).

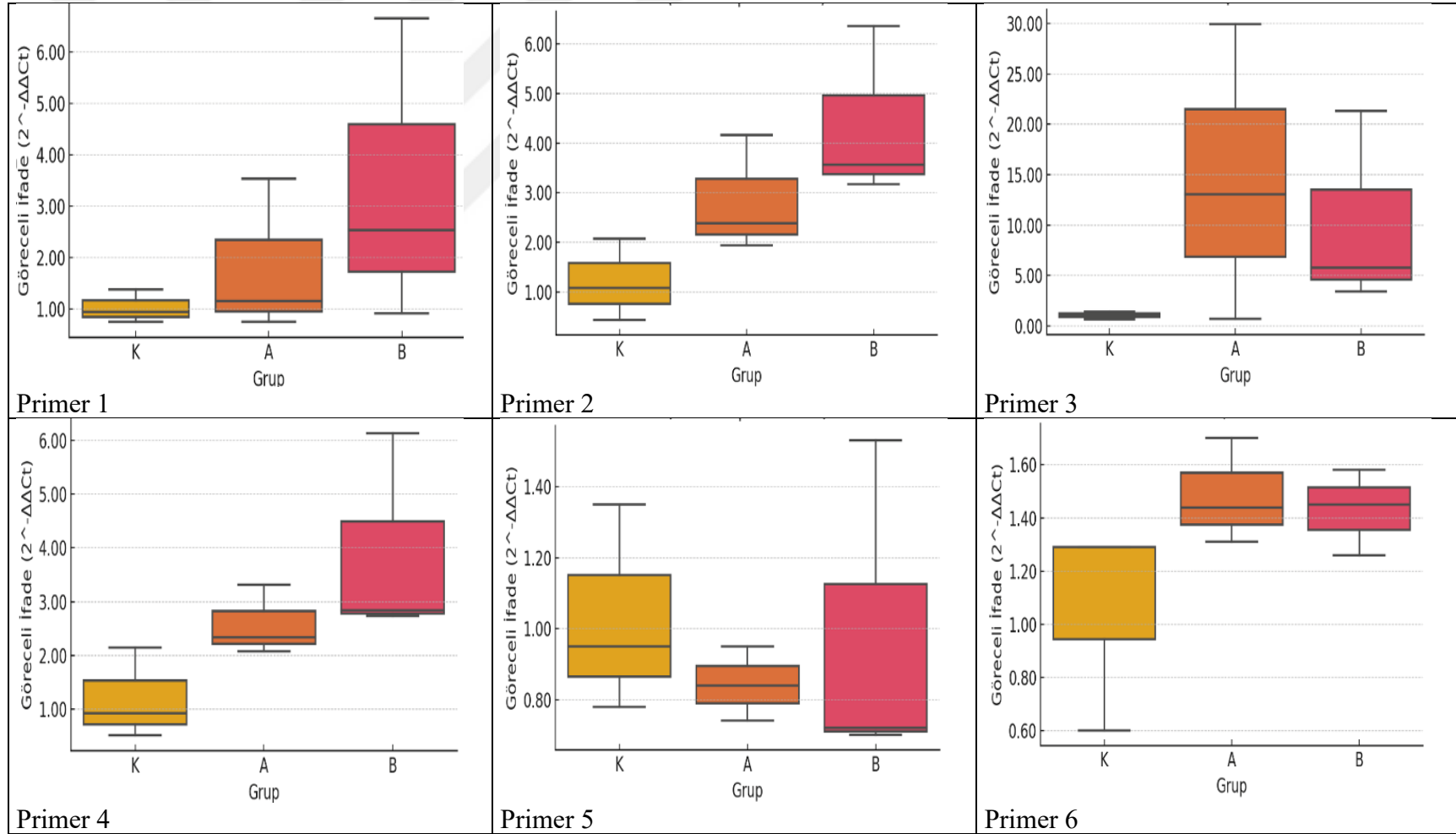
Çizelge 4.10. Telomeraz gen ifade ortalamalarının çoklu karşılaştırma testi

		Gen İfade		
		0.05 önem seviyesinde alt gruplar		
Tukey B ^a	Genler	N	1	3
	Primer 5	9	0.951	
	Primer 6	9	1.322	
	Primer 1	9	2.073	
	Primer 4	9	2.557	
	Primer 2	9	2.802	
	Primer 3	9		8.602



Şekil 4.13. Gen ve ortam etkileşimleri açısından telomeraz geninin 6 ekzon bölgesinin 3 farklı pH derecesine sahip su ortamında qPCR analizlerine göre hesaplanan gen ifade düzeyleri

Her gen bölgesi ile pH ortamı arasındaki etkileşim Şekil 4.14'te daha detaylı biçimde görselleştirilmiştir. Her genin üç farklı pH ortamındaki ifade düzeyleri karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Bu görsel, genetik tepkilerin sadece ortam koşullarına değil, aynı zamanda spesifik gen dizilerine göre farklılaştığını açıkça ortaya koymaktadır. Özellikle P3'ün hem asidik hem de bazik ortamlarda kontrol grubuna göre daha yüksek düzeyde ekspresyon göstermiştir. Buna karşın P5 ve P6 bölgelerinin daha düşük düzeylerde kaldığı görülmektedir. Bu durum, farklı telomeraz gen bölgelerinin pH kaynaklı çevresel strese karşı değişen düzeylerde yanıt verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Telomeraz geninin 6 ekzon bölgesinin (P1–P6) her biri için gen ifade düzeyleri

4.2.4. pH grupları arası gen ekspresyon farklılıkları

Bu tez çalışmasında farklı pH koşullarının telomeraz gen ifade düzeyi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla üç farklı pH grubunda gen ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Gen ifade verilerinin normallik dağılımı Shapiro-Wilk testi ile ölçülmüştür (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. pH grupları arası gen ifade verilerinin normal dağılım testi

		Normalite Testi					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	pH Grupları	İstatistik	df	Sig.	İstatistik	df	Sig.
Gen İfade	Kontrol	.143	18	.200*	.923	18	.148
	Asit	.381	18	<.001	.489	18	<.001
	Baz	.260	18	.002	.626	18	<.001

Test sonuçlarına göre yalnızca kontrol grubunda gen ifade düzeyleri normal dağılım gösterirken asit ve baz verilerinin normal dağılmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle gruplar arası karşılaştırmalar için non-parametrik testler tercih edilmiştir.

pH grupları arasında gen ifade düzeyleri açısından anlamlı fark olup olmadığını belirlemek üzere Kruskal-Wallis H testi uygulanmış ve test sonucu istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p = 0.0014$). Bu sonuç, en az bir pH grubunun diğerlerinden farklılaştığını göstermektedir.

Çizelge 4.12. Farklı pH gruplarında telomeraz gen ifadesi tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırmalar

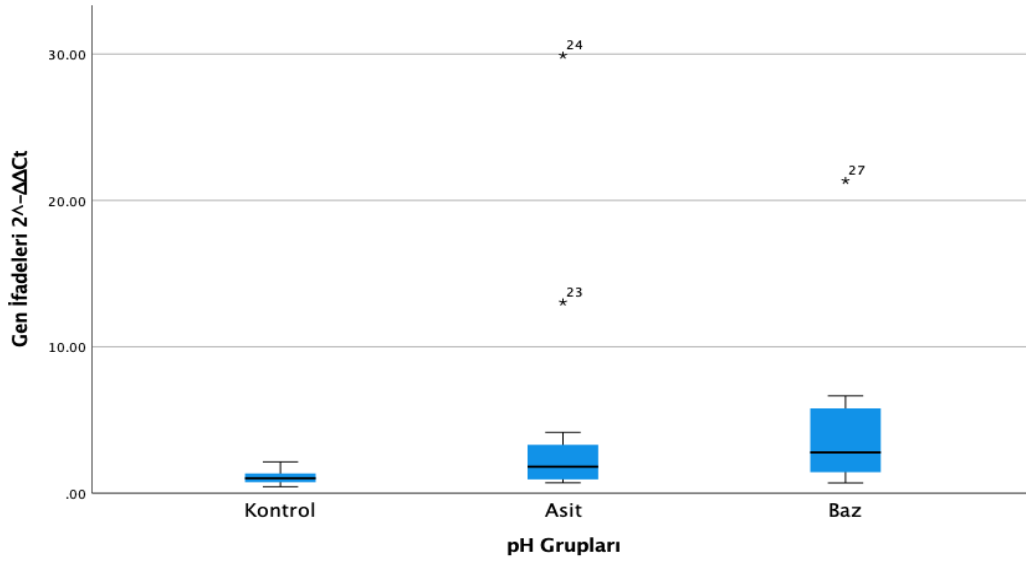
Grup	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata	En Düşük	En Yüksek
Kontrol	1.094 ^a	0.478	0.113	0.44	2.14
Asit	4.018 ^b	7.053	1.662	0.71	29.91
Baz	4.042 ^b	4.757	1.121	0.70	21.35

^a ve ^b ortalamaların birbirinden farklı olduğunu göstermektedir.

Kontrol grubunda tespit edilen ortalama gen ekspresyon düzeyi (1.094), diğer iki gruba kıyasla anlamlı derecede daha düşük olduğu ve bu nötr pH ortamının telomeraz gen aktivasyonunu sınırlı düzeyde etkilediğini belirlenmiştir. Buna karşın, asidik grup ortalama değeri (4.018) ve bazik grup ortalama (4.042) değerlerinin birbirinden istatistiksel olarak farklı olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.12). Gruplar arasında gözlemlenen farklılıkların hangi pH koşullarından kaynaklandığını belirlemek amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalarda, Bonferroni düzeltmesi uygulanarak gerçekleştirilen Mann-Whitney U testi sonuçlarına göre gen ekspresyon düzeyleri bakımından istatistiksel olarak kontrol ile asidik grup ($p = 0.037$) ve bazik grup arasındaki önemli

derecede ($p = 0.002$) fark olduğu saptanmıştır. Buna karşılık, asidik ve bazik gruplar arasında gen ekspresyon düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p = 0.825$).

Her pH grubu için ortalama gen ekspresyon düzeylerinin karşılaştırmalı analizi Şekil 4.15'te görselleştirilmiştir. Bu görselde pH grupları arası telomeraz gen ifadesi farklılığı açıkça görülmektedir. Kontrol grubunda genel gen ekspresyon düzeyleri daha düşük seyretmekte iken, asidik ve bazik gruplarda anlamlı artışlar mevcuttur. Bu da pH koşullarının genetik düzeyde önemli biyolojik tepkiler oluşturduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.15. Üç farklı pH derecesinde yetiştirilen *Daphnia*'larda telomeraz gen ifade değerleri

Bu bulgular, çevresel pH koşullarının telomeraz gen ekspresyonunu anlamlı düzeyde etkileyebileceğini ve özellikle ekstrem pH koşullarının genetik düzeyde benzer yanıtlar oluşturabileceğini ortaya koymaktadır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Daphnia magna* bireylerinin farklı pH koşullarına (asidik, bazik ve kontrol) maruz bırakılması sonucunda hem genetik düzeyde (telomeraz gen ekspresyonu) hem de fizyolojik düzeyde (hayatta kalma oranı ve ortam pH'ına etkisi) verdikleri yanıtlar değerlendirilmiştir. Bulgular, çevresel pH değişiminin organizma üzerinde çok düzeyli biyolojik etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur.

Telomeraz gen ailesine ait 6 farklı gen bölgesinin ekspresyon düzeyleri, deneysel pH koşullarına göre anlamlı şekilde değişiklik göstermiştir. Özellikle Primer 3, hem asidik hem de bazik ortamlarda istatistiksel olarak anlamlı biçimde yüksek düzeyde determine olmuştur. Bu bulgu, telomerazın bazı alt bölgelerinin çevresel strese karşı daha duyarlı olduğunu ve potansiyel olarak genetik yanıtın modülasyonunda kritik rol oynadığını göstermektedir.

Bu sonuçlar, Schumpert ve arkadaşlarının (2015) *Daphnia pulex* ve *Daphnia pulicaria* türleri üzerinde yaptığı çalışmayla örtüşmektedir. Söz konusu çalışmada, telomeraz ekspresyonunun yaşam süresi ve çevresel stresle ilişkili olarak farklılık gösterdiği, özellikle uzun ömürlü türlerde yaşa bağlı ekspresyon düşüşü olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada ise çevresel stresin (pH değişimi) telomeraz genlerinin ekspresyonunu artırdığı ve bu artışın yaş faktöründen bağımsız olarak hızlı geliştiği görülmüştür.

Benzer şekilde, Yampolsky vd. (2014)'nin yaptığı çalışmada, *Daphnia* türlerinin çeşitli çevresel stresörlere karşı transkriptom düzeyinde verdiği yanıtlar analiz edilmiştir ve pH dahil olmak üzere fizikokimyasal parametrelerin, genetik profilleri önemli ölçüde etkilediği ortaya konmuştur. Bu çalışmayla paralel olarak, bizim bulgularımız da çevresel stresin telomeraz gen ailesi üzerinde güçlü bir regülasyon etkisi yarattığını göstermektedir.

Çalışmamızda 21 gün boyunca günlük olarak ölçülen pH değerleri, *Daphnia magna* bireylerinin ortam pH'ını dengeleme eğiliminde olduğunu ortaya koymuştur. Asidik grupta pH zamanla artarken, bazik grupta düşüş eğilimi göstermiştir; bu eğilim, bireylerin metabolik faaliyetlerinin suyun iyonik dengesini etkileyebileceğini göstermektedir. Alibone vd. (1981) benzer şekilde, *Daphnia magna*'nın vücut yüzeyinden amonyum ve karbonat salınımı yoluyla ortam pH'ını etkileyebildiğini modellemiştir. Mevcut bulgular, bu modelin deneysel düzeyde karşılığını sunmaktadır ve *Daphnia*'nın çevresel tamponlama kapasitesine işaret etmektedir.

Ayrıca, Weber 2009'da yaptığı çalışmasında, düşük pH koşullarının yalnızca gen düzeyinde değil, aynı zamanda enzimatik aktivitelerde de bozulmalara yol açtığı ve fizyolojik stres yükünü artırdığını rapor etmiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında ekstrem pH derecelerinde gözlemlenen yüksek gen ekspresyon düzeyleri, çevresel stresin erken biyomoleküler yanıt göstergesi olarak değerlendirilebilmesine olanak sağlamaktadır.

Kaplan-Meier analizleri, farklı pH ortamlarının hayatta kalma oranları üzerinde önemli etkiler oluşturduğunu göstermiştir. Asidik ortamda hayatta kalma oranı %7.2'ye kadar düşerken, bazik ortamda bu oran %12.0 olarak belirlenmiştir. Bu veriler, Ghazy'nin

2011’de yaptığı çalışmada bildirilen eğilimlerle tutarlılık göstermektedir. Söz konusu çalışmada, nötr pH değerine yakın ortamlarda sağkalımın ve üremenin daha yüksek olduğu, asidik pH’ların ise toksik etki yarattığı ifade edilmiştir.

Mevcut çalışmada elde edilen bulgular, bu eğilimi moleküler düzeyde de desteklemektedir. Elde edilen sonuçlara göre *Daphnia magna*’larda hayatta kalma oranlarının düşmesi sadece fiziksel bir stres sonucu değil, aynı zamanda genetik stresin bir sonucu olarak da değerlendirilebilmektedir. Bu, Van Aggelen’in (2010) çalışmasında vurgulanan “çok düzeyli biyolojik yanıt modeli” ile de örtüşmektedir. Dolayısıyla çevresel stres, hem genomik hem de organizmal düzeyde etkili olmaktadır.

Tamamlanan bu tez çalışmasındaki bulgular, yukarıda özetlenen literatürlerle genel olarak tutarlı olmakla birlikte, özellikle telomeraz gen aktivasyonu bakımından yapılan bilimsel tartışmaya önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir. Bu alanda yapılan az sayıda çalışma genel olarak çevresel stresin genel etkilerine odaklanılmışken, bu çalışmada telomeraz gen bölgeleri düzeyinde farklılaştırılmış yanıt profilleri ortaya konulmuştur. Özellikle Primer 3’ün stres yanıtında öne çıkması, telomeraz kompleksinin bazı alt birimlerinin çevresel sinyallere daha duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, gelecek çalışmalarda gen bölgeleri düzeyinde daha özgün hedeflemelerin yapılmasının önemini vurgulamaktadır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, tatlı su ekosistemlerinin önemli bir üyesi olan *Daphnia magna* kullanılarak, çevresel pH değişikliklerinin telomeraz gen ekspresyonu ve sağkalım üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Elde edilen bulgular hem temel biyolojik bilgiye katkı sağlamakta hem de çevre ve biyoteknoloji temelli pek çok uygulama açısından değerlidir. Bu çalışmanın sonuçları, telomer biyolojisi, gen ekspresyon regülasyonu, çevresel stres yanıtları ve model organizma araştırmaları gibi pek çok disiplini ilgilendiren konulara katkı sunmaktadır.

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel düzenek, hem organizmanın çevresel streslere verdiği moleküler yanıtları ortaya koymak hem de canlı performansı üzerindeki etkileri gözlemlemek üzere çift odaklı bir araştırma tasarımı içermektedir. Bu yönüyle çalışma, sadece moleküler biyoloji düzeyinde değil, aynı zamanda ekofizyolojik düzeyde de bilgi üretmiştir. Bu çok katmanlı yaklaşım, çalışmanın bilimsel özgünlüğünü ve metodolojik derinliğini artıran önemli bir unsurdur.

En dikkat çekici bulgulardan biri, *Daphnia magna*'nın yaşadığı ortamın pH'ını zamanla dengeleme eğilimidir. Bu bulgu, bu organizmanın yalnızca pasif bir stres alıcısı olmadığını, aynı zamanda çevresel homeostazın bir parçası olarak aktif rol alabileceğini ortaya koymuştur. Asidik ve bazik koşullarda zamanla nötr pH değerlerine yaklaşılması, canlıların ortama doğrudan etkide bulunduğu işaret etmektedir. Bu durum, tatlı su ekosistemlerinin kendi kendini düzenleyici doğası hakkında önemli ipuçları barındırmaktadır.

Hayatta kalma analizleri açısından değerlendirildiğinde, asidik ortamın *Daphnia magna* bireyleri için ciddi bir stres kaynağı olduğu görülmüştür. Asidik gruptaki bireylerin %7.2'ye kadar düşen sağkalım oranları, düşük pH koşullarının canlılar üzerinde ne denli ölümcül olabileceğini ortaya koymaktadır. Bazik ortamda bu oranın %12.0 ve nötr-kontrol grubunda %9.6 olarak gözlemlenmiş olması, pH'ın hem yönü hem şiddetiyle etkili olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, tatlı su kaynaklarının asidifikasyonu gibi çevresel problemlerin ekosistem düzeyinde yaratabileceği tehditlerin moleküler düzeydeki yansımalarını da gözler önüne sermektedir.

Moleküler düzeyde elde edilen bulgular ise çalışmanın özgün katkılarından bir diğeridir. Telomeraz gen ailesine ait altı farklı ekzon bölgesi (P1–P6) için yapılan RT-qPCR analizleri sonucunda gen ekspresyon düzeylerinin pH koşullarına göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Özellikle üçüncü ekzon bölgesini temsil eden Primer 3'ün hem asidik hem bazik ortamlarda belirgin şekilde daha yüksek düzeyde ifade edilmesi, bu bölgenin çevresel strese duyarlı bir yanıt birimi olabileceğini göstermektedir. Buna karşılık Primer 5 bölgesinin düşük düzeyde ekspresyon göstermesi, gen ailesi içinde farklı bölümlerin farklı stres duyarlılıklarına sahip olabileceğine işaret etmektedir. Bu durum, telomeraz gen ailesi içindeki dizisel veya yapısal motiflerin çevresel uyaranlara verdiği farklı yanıtların araştırılmasına yönelik yeni hipotezlerin doğmasına olanak sağlayabilir.

Ayrıca gen ekspresyon düzeyleri açısından kontrol grubunda daha düşük değerlerin gözlenmesi, ekstrem pH koşullarının genetik düzeyde bir stres yanıtını tetiklediğini göstermektedir. Bu bulgu, çevresel değişkenliklerin organizmalarda genetik aktiviteyi nasıl şekillendirdiğine dair temel biyolojiye doğrudan katkı sunmaktadır. Bu

bağlamda elde edilen veriler yalnızca *Daphnia magna* ile sınırlı kalmayıp, diğer sucul omurgasızlar ve model organizmalara yönelik genetik stres çalışmaları için de önemli bir referans noktası teşkil edebilir.

Çalışmanın özgün yönlerinden biri de telomeraz enzimine yönelik hem transkriptomik hem de proteomik analiz düzeylerini bir araya getirmesidir. Her ne kadar proteomik düzeyde teknik sınırlılıklar (örneğin düşük örnek amplifikasyonu ve bütçe kısıtları) nedeniyle istenilen düzeyde sonuçlar alınamamış olsa da bu girişim, ileride yapılacak çalışmalar için güçlü bir metodolojik zemin sunmaktadır. Bu bağlamda tez, yüksek lisans düzeyinde sadece sonuç değil, aynı zamanda gelecekteki araştırmalara yönelik güçlü bir araştırma stratejisi ve yaklaşımı önermesiyle de dikkat çekicidir.

Bu çalışmanın yaygın etkileri yalnızca temel biyoloji ile sınırlı değildir. Ekosistem modellemeleri, çevresel risk değerlendirmeleri, su kalitesi göstergelerinin geliştirilmesi ve hatta biyolojik erken uyarı sistemlerinin oluşturulması gibi birçok uygulama alanında kullanılabilecek veriler sağlamaktadır. *Daphnia magna*'nın çevresel pH dengesine olan etkisinin gösterilmesi, bu organizmanın çevresel dengeleyici rolünü destekleyen kanıtlar üretmiş ve potansiyel “bioindicator” (biyobelirteç) özelliğini güçlendirmiştir.

Bilimsel katkı açısından bakıldığında, bu tez çalışması telomer biyolojisi alanında özellikle çevresel stres faktörlerinin gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini açıklamaya yönelik nadir örneklerden biridir. Telomer kısalmasının yaşlanma ve hücrel bozulmayla doğrudan ilişkili olduğu düşünülürse, bu enzimin çevresel koşullarla nasıl etkileşime girdiği sorusu oldukça değerlidir. Dolayısıyla bu tez, sadece çevresel biyoteknoloji ya da ekotoksikoloji değil, aynı zamanda yaşlanma biyolojisi, genomik regülasyon ve moleküler adaptasyon gibi disiplinler açısından da ilgi çekici sonuçlar içermektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışması; *Daphnia magna* gibi basit yapılı ama biyolojik açıdan yüksek hassasiyete sahip bir organizmayı kullanarak, çevresel pH değişikliklerinin genetik, fizyolojik ve yaşamsal sonuçlarını bütünsel bir şekilde ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular hem temel bilimsel bilgiye katkı sunmuş, hem de çevresel stresin biyolojik etkilerini anlamaya yönelik uygulamalı yaklaşımlara öncülük edebilecek nitelikte veriler üretmiştir. Bu yönüyle tez, literatüre değerli bir katkı sağlamanın yanı sıra, gelecekte yapılacak daha kapsamlı ve disiplinler arası araştırmalara da ışık tutmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Alibone, M.R., Fair, P. The effects of low pH on the respiration of *Daphnia magna* Straus. *Hydrobiologia* 85, 185–188 (1981).
- Artandi, S. E., & DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9–18.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209–219.
- Aubert, G., & Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiological reviews*, 88(2), 557–579.
- Aunan, J. R., Cho, W. C., & Søreide, K. (2017). The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging and disease*, 8(5), 628–642.
- Barata, C., Varo, I., Navarro, J. C., Arun, S., & Porte, C. (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(2), 175–186.
- Bednarek, D., González-Rosa, J. M., Guzmán-Martínez, G., Gutiérrez-Gutiérrez, Ó., Aguado, T., Sánchez-Ferrer, C., Marques, I. J., Galardi-Castilla, M., de Diego, I., Gómez, M. J., Cortés, A., Zapata, A., Jiménez-Borreguero, L. J., Mercader, N., & Flores, I. (2015). Telomerase Is Essential for Zebrafish Heart Regeneration. *Cell reports*, 12(10), 1691–1703.
- Blasco M. A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 6(8), 611–622.
- Blasco M. A. (2007). Telomere length, stem cells and aging. *Nature Chemical Biology*, 3(10), 640–649.
- Bownik A. (2017). *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. *The Science of the Total Environment*, 601-602, 194–205.
- Brezonik, P. L., King, S. O., & Mach, C. E. (2020). The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. In *Metal ecotoxicology: Concepts and applications* (pp. 1–31). CRC Press.
- Buffenstein R. (2005). The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(11), 1369–1377.
- Bustin S. A. (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25(2), 169–193.

- Butler, J. M. (2005). *Forensic DNA typing: Biology, technology, and genetics of STR markers* (2nd ed.). Elsevier Academic Press.
- Campisi, J., & d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 729–740.
- Cawthon, R. M., Smith, K. R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., & Kerber, R. A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet (London, England)*, 361(9355), 393–395.
- Cefalu C. A. (2011). Theories and mechanisms of aging. *Clinics in Geriatric Medicine*, 27(4), 491–506.
- Chen, Q. M., Prowse, K. R., Tu, V. C., Purdom, S., & Linskens, M. H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Experimental Cell Research*, 265(2), 294–303.
- Choi, Y., Oh, H. J., Lee, D. H., Jang, M. H., Lee, K. L., Chang, K. H., & Kim, H. W. (2023). Current utilization and further application of zooplankton indices for ecosystem health assessment of lake ecosystems. *Sustainability*, 15(14), 10950.
- Chowdhury, S., & Saikia, S. K. (2020). Oxidative stress in fish: A review. *Journal of Scientific Research*, 12(1).
- Colbourne, J. K., Pfrender, M. E., Gilbert, D., Thomas, W. K., Tucker, A., Oakley, T. H., Tokishita, S., Aerts, A., Arnold, G. J., Basu, M. K., Bauer, D. J., Cáceres, C. E., Carmel, L., Casola, C., Choi, J. H., Detter, J. C., Dong, Q., Dusheyko, S., Eads, B. D., Fröhlich, T., ... Boore, J. L. (2011). The ecoresponsive genome of *Daphnia pulex*. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6017), 555–561.
- Constantinou, C. P., Nicolaou, C. T., & Papaevripidou, M. (2014). A framework for modeling-based learning, teaching, and assessment. In A. Upmeyer zu Belzen, D. Krüger, & J. van Driel (Eds.), *Towards a competence-based view on models and modeling in science education* (Vol. 12, pp. 33-50). Springer.
- Dasheiff, B. D., & Dasheiff, R. M. (2002). Photonegative response in brown planaria (*Dugesia tigrina*) following regeneration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53(2), 196–199.
- Dodson, S. I., Ryan, S., Tollrian, R. & Lampert, W. (1997). Individual swimming behavior of *Daphnia*: effects of food, light and container size in four clones. *Journal of Plankton Research*, 19(10), 1537–1552.
- de Lange T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, 21(4), 532–540.
- de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 19(18), 2100–2110.

- Dietrich, S., Ploessl, F., Bracher, F., & Laforsch, C. (2010). Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* - A multigenerational study. *Chemosphere*, 79(1), 60–66.
- Drabiniok, U. (2021). *Hooded waterflea* [Fotoğraf]. <https://observation.org/observation/224033801/> [Son erişim tarihi: 03.05.2025].
- Drew, D.J. (2017). *IZ.099087: Daphnia longispina* [Fotoğraf]. <https://collections.peabody.yale.edu/search/Record/YPM-IZ-099087> [Son erişim tarihi: 03.05.2025].
- Ebert, D. (2005). Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia*. *National Center for Biotechnology Information (US)*.
- Ebert, D. (2006). *Female Daphnia magna with a clutch of asexual eggs* [Fotoğraf]. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_magna_asexual.jpg [Son erişim tarihi: 03.05.2025].
- Ebert, D. (2022). *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. *EvoDevo*, 13, Article 16.
- Evans, S. E., Davies, C., & DiLillo, D. (2008). Exposure to domestic violence: A meta-analysis of child and adolescent outcomes. *Aggression and Violent Behavior*, 13(2), 131–140.
- Fabbri, E., Zoli, M., Gonzalez-Freire, M., Salive, M. E., Studenski, S. A., & Ferrucci, L. (2015). Aging and Multimorbidity: New Tasks, Priorities, and Frontiers for Integrated Gerontological and Clinical Research. *Journal of the American Medical Directors Association*, 16(8), 640–647.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2008). *Current protocols essential laboratory techniques* (pp. 10.3.1–10.3.34). Wiley.
- Galloway, A. (1993). The evolutionary biology of aging (Review of the book *The evolutionary biology of aging* by M. R. Rose). *American Journal of Physical Anthropology*, 91(2), 260–262.
- Ge, Y., Wu, S., Xue, Y., Tao, J., Li, F., Chen, Y., Liu, H., Ma, W., Huang, J., & Zhao, Y. (2016). Preferential extension of short telomeres induced by low extracellular pH. *Nucleic Acids Research*, 44(17), 8086–8096.
- Gensler, H. L., & Bernstein, H. (1981). DNA damage as the primary cause of aging. *The Quarterly Review of Biology*, 56(3), 279–303.
- Ghazy, M. M. E.-D., Habashy, M. M., & Mohammady, E. Y. (2011). Effects of pH on survival, growth and reproduction rates of the crustacean, *Daphnia magna*. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 1–10.

- Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 125, 1–40.
- Greider CW, Blackburn EH. (1987). The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51: 887–898.
- Guilhermino, L., Diamantino, T., Silva, M. C., & Soares, A. M. (2000). Acute toxicity test with *Daphnia magna*: An alternative to mammals in the prescreening of chemical toxicity? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46(3), 357–362.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
- Harel, I., Benayoun, B. A., Machado, B., Singh, P. P., Hu, C. K., Pech, M. F., Valenzano, D. R., Zhang, E., Sharp, S. C., Artandi, S. E., & Brunet, A. (2015). A platform for rapid exploration of aging and diseases in a naturally short-lived vertebrate. *Cell*, 160(5), 1013–1026.
- Harman D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300.
- He, Y., & Jasper, H. (2014). Studying aging in *Drosophila*. *Methods (San Diego, Calif.)*, 68(1), 129–133.
- Hearn, J., Chow, F. W., Barton, H., Tung, M., Wilson, P. J., Blaxter, M., Buck, A., & Little, T. J. (2018). *Daphnia magna* microRNAs respond to nutritional stress and ageing but are not transgenerational. *Molecular Ecology*, 27(6), 1402–1412.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994.
- Hemann, M. T., Rudolph, K. L., Strong, M. A., DePinho, R. A., Chin, L., & Greider, C. W. (2001). Telomere dysfunction triggers developmentally regulated germ cell apoptosis. *Molecular Biology of the Cell*, 12(7), 2023–2030.
- Hofer, A. C., Tran, R. T., Aziz, O. Z., Wright, W., Novelli, G., Shay, J., & Lewis, M. (2005). Shared phenotypes among segmental progeroid syndromes suggest underlying pathways of aging. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 60(1), 10–20.
- Jin K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 72–74.
- Kagzi, K., Hechler, R. M., Fussmann, G. F., & Cristescu, M. E. (2022). Environmental RNA degrades more rapidly than environmental DNA across a broad range of pH conditions. *Molecular Ecology Resources*, 22(7), 2640–2650.
- Killan, A., Heller, K., & Kleinhofs, A. (1998). Development patterns of telomerase activity in barley and maize. *Plant Molecular Biology*, 37(4), 621–628.

- Klapper, W., Heidorn, K., Kühne, K., Parwaresch, R., & Krupp, G. (1998). Telomerase activity in 'immortal' fish. *FEBS Letters*, 434(3), 409–412.
- Koivisto S. (1995). Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests?. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 90(2), 263–267.
- Korandová, M., & Frydrychová, R. Č. (2016). Activity of telomerase and telomeric length in *Apis mellifera*. *Chromosoma*, 125(3), 405–411.
- Korovchinsky, N. M. (1997). On the history of studies on cladoceran taxonomy and morphology, with emphasis on early work and causes of insufficient knowledge of the diversity of the group. *Hydrobiologia*, 360, 1–11.
- Lampert, W. (2011). *Daphnia: Development of a model organism in ecology and evolution. International Ecology Institute.*
- Lass, J. (2023). *Ephippia (singular: ephippium) are winter or dry-season eggs of the various species of small crustacean in the order Cladocera.* [Fotoğraf]. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Daphnia_Ephippia.jpg [Son erişim tarihi: 03.05.2025].
- Liu, T., Yuan, X., & Xu, D. (2016). Cancer-Specific Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) Promoter Mutations: Biological and Clinical Implications. *Genes*, 7(7), 38.
- Magro, M., Corain, L., Ferro, S., Baratella, D., Bonaiuto, E., Terzo, M., Corraducci, V., Salmaso, L., & Vianello, F. (2016). Alkaline Water and Longevity: A Murine Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, 2016, 3084126.
- McClintock B. (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 25(8), 405–416.
- Mergeay, J., Declerck, S., Verschuren, D., & de Meester, L. (2006). *Daphnia* community analysis in shallow Kenyan lakes and ponds using dormant eggs in surface sediments. *Freshwater Biology*, 51(3), 399–411.
- Metchnikoff, E. (1884). Ueber eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien. Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagozyten gegen Krankheitserreger. *Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 96(2), 177–195. (pasteur-00738395)
- Miss, M. (2019). *A cladocera giving birth (100x magnification).* [Fotoğraf]. https://en.wikipedia.org/wiki/Diplostraca#/media/File:Rodz%C4%85ca_dafnia.jpg [Son erişim tarihi: 03.05.2025].

- Mondal, D. D., Chakraborty, U., Bera, M., Ghosh, S., & Kar, D. (2023). An overview of nutritional profiling in foods: Bioanalytical techniques and useful protocols. *Frontiers in Nutrition*, 10, 1124409.
- Mucklow, P. T., & Ebert, D. (2003). Physiology of immunity in the water flea *Daphnia magna*: environmental and genetic aspects of phenoloxidase activity. *Physiological and Biochemical Zoology* : PBZ, 76(6), 836–842.
- Muller HJ. (1938). Bar duplication. *Collecting Net (Woods Hole)* 13: 181–198.
- Müller, O. F. (1785). *Entomostraca seu insecta testacea*. Sumtibus J. G. Mülleriani.
- Nasir, L., Devlin, P., Mckevitt, T., Rutteman, G., & Argyle, D. J. (2001). Telomere lengths and telomerase activity in dog tissues: a potential model system to study human telomere and telomerase biology. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 3(4), 351–359.
- Ndah, A. B., Meunier, C. L., Kirstein, I. V., Göbel, J., Rönn, L., & Boersma, M. (2022). A systematic study of zooplankton-based indices of marine ecological change and water quality: Application to the European marine strategy framework directive (MSFD). *Ecological Indicators*, 135, 108587.
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–1582.
- OECD (2004). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Daphnia sp., Acute Immobilisation Test*.
- Palm, W., & de Lange, T. (2008). How shelterin protects mammalian telomeres. *Annual Review of Genetics*, 42, 301–334.
- Partridge, L., & Barton, N. H. (1993). Optimality, mutation and the evolution of ageing. *Nature*, 362(6418), 305–311.
- Partridge, L., & Gems, D. (2002). Mechanisms of ageing: public or private?. *Nature Reviews Genetics*, 3(3), 165–175.
- Partridge, L., Gems, D., & Charlesworth, B. (2002). The evolution of longevity primarily by the work of Bill. *Current Biology*, 12(7), 544–546.
- Pillai, S. R., Damaghi, M., Marunaka, Y., Spugnini, E. P., Fais, S., & Gillies, R. J. (2019). Causes, consequences, and therapy of tumors acidosis. *Cancer Metastasis Reviews*, 38(1-2), 205–222.
- Poirier, D. G., Westlake, G. F., & Abernethy, S. G. (1988). *Daphnia magna* Acute lethality Toxicity Test Protocol. Ontario Ministry of the Environment, Aquatic Toxicity Unit, Aquatic Biology Section, *Water Resources Branch*.
- Praticò D. (2002). Lipid peroxidation and the aging process. *Science of Aging Knowledge Environment: SAGE KE*, 2002(50), re5.

- Quesada, M., Lópezaraiza-Mikel, M., Álvarez-Añorve, M., Ávila-Cabadilla, L., Martén-Rodríguez, S., Calvo-Alvarado, J., do Espírito-Santo, M. M., Fernandes, G. W., Sánchez-Azofeifa, A., Aguilar-Aguilar, M. J., Balvino-Olvera, F., Brandão, D., Contreras-Sánchez, J. M., Correa-Santos, J., Pérez, J. C., Fernández, P., Hilje, B., Jacobi, C., Fonseca-Pezzini, F., Rosas, F., Rosas-Guerrero, V., Sánchez-Montoya, G., Sáyago, R., & Vázquez-Ramírez, A. (2019). Phenological patterns of tropical dry forests along latitudinal and successional gradients in the Neotropics. *In Tropical Dry Forests in the Americas* (pp. 28–54). CRC Press.
- Riha, K., Fajkus, J., Siroky, J., & Vyskot, B. (1998). Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *The Plant Cell*, 10(10), 1691–1698.
- Rode, L., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E. (2015). Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64,637 individuals from the general population. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(6), djv074.
- Ruby, J. G., Smith, M., & Buffenstein, R. (2018). Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age. *eLife*, 7, e31157.
- Sergieiev, P. V., Dontsova, O. A., & Berezkin, G. V. (2015). Theories of aging: an ever-evolving field. *Acta Naturae*, 7(1), 9–18.
- Schumpert, C., Nelson, J., Kim, E., Dudycha, J. L., & Patel, R. C. (2015). Telomerase activity and telomere length in *Daphnia*. *PloS One*, 10(5), e0127196.
- Shammas M. A. (2011). Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 14(1), 28–34.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2000). Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1), 72–76.
- Shay, J. W., & Roninson, I. B. (2004). Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*, 23(16), 2919–2933.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2007). Hallmarks of telomeres in ageing research. *The Journal of Pathology*, 211(2), 114–123.
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nature reviews. Genetics*, 20(5), 299–309.
- Snustad, D. P., & Simmons, M. J. (2003). *Principles of genetics (3rd ed.)*. John Wiley & Sons.
- Söderhäll, K., & Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 3–23.
- Spugnini, E., & Fais, S. (2017). Proton pump inhibition and cancer therapeutics: A specific tumor targeting or it is a phenomenon secondary to a systemic buffering?. *Seminars in Cancer Biology*, 43, 111–118.

- Swammerdam, J. (1669). *Historia insectorum generalis, of te algemeene verhandeling van de bloedeloose dierkens*. t'Utrecht.
- Swammerdam, J., Hennin, H. C. de, & Luchtman, J. (1685). *Historia insectorum generalis: Cum figuris et indicibus necessariis*. Apud Jordanum Luchtman.
- Swammerdam, J. (1758). *The book of nature; or, The history of insects: Reduced to distinct classes, confirmed by particular instances, displayed in the anatomical analysis of many species and illustrated with copperplates*. John Hill.
- Tajadini, M., Panjehpour, M., & Javanmard, S. H. (2014). Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes. *Advanced Biomedical Research*, 3, 85.
- Tatarazako, N., & Oda, S. (2007). The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemicals with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology (London, England)*, 16(1), 197–203.
- Taylor, D. J., Hebert, P. D. N., & Colbourne, J. K. (1999). Phylogenetics and evolution of cyclic parthenogenesis in *Daphnia* (Crustacea: Anomopoda). *Evolution*, 53(6), 1744–1756.
- Thomas, A., Ramkumar, A., & Shanmugam, A. (2022). CO₂ acidification and its differential responses on aquatic biota: A review. *Environmental Advances*, 8, 100219.
- Tinetti, M. E., Fried, T. R., & Boyd, C. M. (2012). Designing health care for the most common chronic condition--multimorbidity. *JAMA*, 307(23), 2493–2494.
- Tissenbaum, H. A., & Guarente, L. (2002). Model organisms as a guide to mammalian aging. *Developmental Cell*, 2(1), 9–19.
- Tkaczyk, A., Bownik, A., Dudka, J., Kowal, K., & Ślaska, B. (2021). *Daphnia magna* model in the toxicity assessment of pharmaceuticals: A review. *The Science of the Total Environment*, 763, 143038.
- Townsley, D. M., Dumitriu, B., & Young, N. S. (2014). Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*, 124(18), 2775–2783.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2017). *World Population Ageing 2017* (ST/ESA/SER.A/408). United Nations.
- Valenzano, D. R., Aboobaker, A., Seluanov, A., & Gorbunova, V. (2017). Non-canonical aging model systems and why we need them. *The EMBO Journal*, 36(8), 959–963.
- Van Aggelen, G., Ankley, G. T., Baldwin, W. S., Bearden, D. W., Benson, W. H., Chipman, J. K., Collette, T. W., Craft, J. A., Denslow, N. D., Embry, M. R.,

- Falciani, F., George, S. G., Helbing, C. C., Hoekstra, P. F., Iguchi, T., Kagami, Y., Katsiadaki, I., Kille, P., Liu, L., Lord, P. G., ... Yu, L. (2010). Integrating omic technologies into aquatic ecological risk assessment and environmental monitoring: hurdles, achievements, and future outlook. *Environmental health perspectives*, 118(1), 1–5.
- Varela, E., & Blasco, M. A. (2010). 2009 nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase. *Oncogene*, 29(11), 1561–1565.
- Viña, J., Borrás, C., & Miquel, J. (2007). Theories of ageing. *IUBMB Life*, 59(4-5), 249–254.
- Ward's Science. (2021). *Working with Daphnia* [PDF]. https://www.wardsci.com/www.wardsci.com/images/Working_with_Daphnia2021.pdf [Son erişim tarihi: 03.05.2025].
- Weber, A.K., Pirow, R. Physiological responses of *Daphnia pulex* to acid stress. *BMC Physiol* 9, 9 (2009).
- Wege, H., Müller, A., Müller, L., Petri, S., Petersen, J., & Hillert, C. (2007). Regeneration in pig livers by compensatory hyperplasia induces high levels of telomerase activity. *Comparative Hepatology*, 6, 6.
- Weischer, M., Nordestgaard, B. G., Cawthon, R. M., Freiberg, J. J., Tybjærg-Hansen, A., & Bojesen, S. E. (2013). Short telomere length, cancer survival, and cancer risk in 47102 individuals. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(7), 459–468.
- Weismann, A. (1882). *Ueber die Dauer des Lebens*. Jena: Fischer.
- Wentzensen, I. M., Mirabello, L., Pfeiffer, R. M., & Savage, S. A. (2011). The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 20(6), 1238–1250.
- Yampolsky, L. Y., Zeng, E., Lopez, J., Williams, P. J., Dick, K. B., Colbourne, J. K., & Pfrender, M. E. (2014). Functional genomics of acclimation and adaptation in response to thermal stress in *Daphnia*. *BMC Genomics*, 15(1), 859.
- Zhao, N., & Wurst, H. (2001). *U.S. Patent No. 6,300,073*. U.S. Patent and Trademark Office.
- Ziarek, J. J., Nihongi, A., Nagai, T., Uttieri, M., & Strickler, J. R. (2011). Seasonal adaptations of *Daphnia pulicaria* swimming behaviour: The effect of water temperature. *Hydrobiologia*, 661, 317–327.

ÖZGEÇMİŞ

Aslı ÇETİN

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2022-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2017-2021	Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Ankara