



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



Yüksek Lisans Tezi

***Gibbula rarilineata* (SINIF: GASTROPODA) AKTİN GENİNİN cDNA
KLONLAMASI ve FİLOGENETİK ANALİZİ**

Şeyma EREN

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

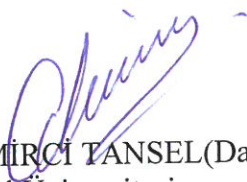
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL**

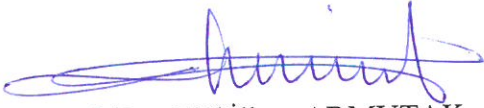
Ağustos, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 6.08.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Zooloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi


Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi


Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi


Dr. Öğr. Üyesi Vahap ELDEM
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 58481 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Lisans öğrencisi olduğum günlerde tanıştığımdan bu yana, bilimsel olanı üstün tutma cesaretini örnek aldığım ve bu tutumuyla bana nitelikli bir bakış açısı kazandıran, karşılaşılabileceğimiz olumsuzlukları öngörebildiği halde, yüksek lisans tez çalışmamın tasarımı, deney ve yazım aşamalarında fikir ve isteklerime değer vererek, “mevcut” olanın yanında “yeni” olana yer açmanın zorluğunu göze alan, sendelediğim anlarda desteğini ve güvenini hissettirmekten kaçınmayan ve gösterdiği sevgiyle hayatımdaki yeri akademik ilişkilerin çok daha ötesine geçen değerli danışman hocam Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL’e;

Bilgi birikimini ve laboratuvar imkânlarını benimle paylaşmaktan hiçbir zaman çekinmeyen, düşünsel katkısıyla tezime ait uzun deney sürecinde karşılaştığım engellerin üstesinden gelmemi sağlayan, çalışmamla ilgili olarak umutsuzluğa düştüğüm anlarda yaklaşımındaki gerçekçi iyimserlikle beni devam etmeye teşvik eden ve en önemlisi, “bir yerden başlamak” gerekliliğini aklıma kazıyan, bu çalışmadaki emeğini ancak bir danışmanınkiyle karşılaştırılabileceğim değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Çağatay TARHAN’a;

Yüksek lisans sürecimin başladığı günden itibaren maddi-manevi tüm imkânlarıyla bana destek olmasının yanında, tezimin şu an basılı bir formatta var olmasını mümkün kılan sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Aslı KANDİL’e;

Tez çalışmamda kullandığım canlı türünün seçimini ve arazi çalışmalarında örneklemesini yardımıyla gerçekleştirebildiğim ve her iletişimimizde çalışma motivasyonumu yükselttiğini hissettiğim sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Senem ÇAĞLAR’a teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimi tamamlamamda hayati öneme sahip malzemeler tükendiğinde kendi laboratuvarlarındaki imkânları benimle paylaşmaktan çekinmeyen, ayrıca değerli katkılarıyla deneylerde karşılaştığım çeşitli sorunların üstesinden gelmeme yardımcı olan Doç. Dr. Özgür ÇAKIR’a ve Doç. Dr. Neslihan TURGUT KARA’ya ayrıca teşekkür ederim.

Başta Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Laboratuvarı’ndaki hocalarıma ve arkadaşlarıma olmak üzere, laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne ve İstanbul Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Fizyoloji Araştırma Laboratuvarı’nda birlikte çalıştığım tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma yüksek lisans sürecim boyunca sağladıkları tüm katkılardan dolayı teşekkür ederim.

Anneme ve ablama, tüm fedakârlıkları için minnettarım. Salt varlığıyla yükümün hafiflemesini sağlayan sevgili dostum Uzm. Bio. Murat BAKIRDÖVEN’e müteşekkirim.

Ağustos 2019

Şeyma EREN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
3.1. <i>Gibbula rarilineata</i> ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI.....	13
3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU	13
3.2.1. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için cDNA Sentezi Öncesinde RNA'ların Hazırlanması.....	14
3.2.1.1. <i>RNA'nın Defosforilasyonu</i>	15
3.2.1.2. <i>mRNA Başlık Yapısının Uzaklaştırılması</i>	16
3.2.1.3. <i>Başlıksız mRNA'nın RNA Oligo ile Ligasyonu</i>	16
3.3. cDNA SENTEZİ.....	17
3.3.1. 5' RACE PZR için RNA Oligo Ligasyonu Yapılmış RNA'dan cDNA Sentezi.....	18
3.4. PRİMERLER	19
3.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)	21
3.5.1. Tasarlanan Primerlerle Seçilen Bölgenin Çoğaltılması.....	21
3.5.2. 5'RACE PZR.....	22
3.5.2.1. <i>Touchdown PZR</i>	23
3.5.2.2. <i>PZR ürünlerinin saflaştırılması</i>	25
3.5.2.3. <i>Saflaştırılan PZR ürünlerinin PZR ile tekrar çoğaltılması</i>	25
3.5.3. 3'RACE PZR.....	26
3.5.3.1. <i>Nested PZR</i>	27

3.6. PZR ÜRÜNLERİNİN <i>Escherichia coli</i> TRANSFORMASYONUyla KLONLANMASI.....	28
3.6.1. Plazmid Vektörün Transformasyona Hazırlanması.....	28
3.6.2. Transformasyon.....	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. <i>Gibbula rarilineata</i> 'DAN ELDE EDİLEN TOTAL RNA.....	31
4.2. <i>Gibbula rarilineata</i> AKTİNİNDEN ÇOĞALTILAN PZR ÜRÜNLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	31
4.2.1. Tasarlanan Primerlerle Seçilen Bölgeden Çoğaltılan PZR Ürünü	31
4.2.2. 5' RACE PZR ile Elde Edilen Ürün.....	32
4.2.3. 3' RACE PZR ile Elde Edilen Ürün.....	33
4.3. <i>Gibbula rarilineata</i> 'NİN AKTİN NÜKLEOTİD DİZİSİ.....	34
4.3.1. <i>Gibbula rarilineata</i> Aktininin Diğer Aktinlerle Hizalanması	36
4.4. FİLOGENETİK ANALİZLER.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ	48

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan organizma <i>G. rarilineata</i> 'nın kabuklarının görünümü.	11
Şekil 3.6.1.1: <i>G. rarilineata</i> aktininin klonlanması için <i>E. coli</i> transformasyonu yapılan plazmid vektör pCR4-TOPO'nun replikasyon başlangıç noktasını (pUC ori), promotor bölgesini (P _{lac}) ve belirteç genlerini (ampisilin, kanamisin, LacZ α -ccdB) gösteren harita. İnsersiyon bölgesi ve dizilemede kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeler ile restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri (Spe I, Pst I, Pme I, EcoR I, Not I) dizi üzerinde işaretlidir.	29
Şekil 4.1.1: <i>G. rarilineata</i> 'dan izole edilen RNA'nın jel görüntüsü.....	31
Şekil 4.2.1.1: Acfw ve Acrv primerleri kullanılarak çoğaltılan aktin bölgesine ait jel görüntüsü.	31
Şekil 4.2.2.1: 5' ucundan çoğaltılan aktin bölgesine ait jel görüntüsü.	33
Şekil 4.2.3.1: 3' ucundan GrAcSqFw primeri ile çoğaltılan ilk PZR ürünü (a), 3Nstd primeri kullanılarak Nested PZR ile çoğaltılan spesifik PZR ürünü (b).	34
Şekil 4.3.1: 5' ucundan elde edilen bölgenin nükleotid ve amino asit dizisi.	34
Şekil 4.3.2: Veri bankasından elde edilmiş bölgesel aktin dizisi (koyu gri) ile klonlanan bölgenin (açık gri) konsensüs dizisi (örtüşen bölge sarı ile işaretlenmiştir). Nükleotid dizisi ve kodonların karşılığı olan amino asit dizisi birlikte verilmiştir.	35
Şekil 4.4.1: İnsan aktin izoformları dış grup olarak kullanılan sitoplazmik ve kas tipi aktinlerin ayrışmasını gösteren filogenetik ağaç.	41

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.2.1.1.1: RNA'nın defosforilasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.	15
Tablo 3.2.1.2.1: mRNA başlık yapısının uzaklaştırılması için kullanılan bileşenler ve miktarları.	16
Tablo 3.2.1.3.1: RNA Oligo ligasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.	17
Tablo 3.2.1.3.2: RNA ile ligasyonu gerçekleştirilen adaptörün dizisi.	17
Tablo 3.3.1: cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve sentez koşulları.	18
Tablo 3.3.1.1: RNA Oligo ile ligasyonu yapılmış RNA kalıbından ilk zincir cDNA sentezinde kullanılan kit bileşenleri ve kullanım koşulları.	19
Tablo 3.4.1: Çalışmada kullanılan tüm primerler ve dizileri.	20
Tablo 3.5.1.1: <i>H. diversicolor</i> 'un aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlanan primerlerle gerçekleştirilen PZR'de kullanılan bileşenler.	21
Tablo 3.5.1.2: <i>H. diversicolor</i> 'un aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlanan primerlerin kullanıldığı PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.	22
Tablo 3.5.2.1: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv351 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen ilk PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.	23
Tablo 3.5.2.2: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv351 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltımında kullanılan PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.	23
Tablo 3.5.2.1.1: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv247 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen Touchdown PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.	24
Tablo 3.5.2.1.2: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv247 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan Touchdown PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar.	24
Tablo 3.5.3.1: GrAcSqFw ve GeneRacer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.	26
Tablo 3.5.3.2: GrAcSqFw ve GeneRacer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltıldığı PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.	27
Tablo 3.5.3.1.1: 3Nstd ve GeneRacer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltıldığı Nested PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.	28

Tablo 3.6.1.1: PZR ürünlerinin pCR4-TOPO TA vektörüne aktarılmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.	29
Tablo 4.3.1.1: Aktinlerin sınıflandırmasında insan aktin izoformlarında diagnostik olarak kullanılan amino asitler ve pozisyonları ile <i>G. rarilineata</i> 'nın belirlenen aktin amino asit dizi pozisyonlarının karşılaştırması.	36
Tablo 4.3.1.2: <i>G. rarilineata</i> aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. <i>G. rarilineata</i> 'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.	37
Tablo 4.3.1.2 (devam): <i>G. rarilineata</i> aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. <i>G. rarilineata</i> 'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.	38
Tablo 4.3.1.2 (devam): <i>G. rarilineata</i> aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. <i>G. rarilineata</i> 'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.	39
Tablo 4.3.1.2 (devam): <i>G. rarilineata</i> aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. <i>G. rarilineata</i> 'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.	40

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
C	: Santigrat
M	: Molar
mm	: Milimetre
mV	: Milivolt
nmol	: Nanomol
α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
kDa	: Kilodalton

Kısaltmalar	Açıklama
Hsp-70	: Isı şok proteini-70
ATP	: Adenozin trifosfat
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EF-1a	: Elongasyon faktörü-1a
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
COI I/II	: Sitokrom oksidaz I/II
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
RNA	: Ribonükleik asit
RNaz	: Ribonükleaz
cDNA	: Komplementer DNA
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
T_m	: Erime sıcaklığı
DEPC	: Dietilpirokarbonat (diethylpyrocarbonate)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Gibbula rarilineata* (SINIF: GASTROPODA) AKTİN GENİNİN cDNA KLONLAMASI ve FİLOGENETİK ANALİZİ**

Şeyma EREN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Aktin, tüm ökaryotik hücrelerde en fazla miktarda bulunan proteinlerden biridir ve tek hücrelilerden insana kadar pek çok canlı grubunda yüksek korunmuşluk gösterir. Aktin, hücre iskeletinde ve kas kasılmasındaki geniş dağılımlı başlıca rolleri gereği en çok çalışılmış proteinlerden biridir. Bunun yanında, aktinlerin, kökeninin çok eski olduğu düşünüldüğünden, aktinin farklı taksonomik sınıflarda değişken sayıdaki izoformlarının sınıflandırılmasının ökaryotik hücrelerin evrimi hakkında öngörü sağlayacağı düşünülmektedir.

Omurgalı aktinleri iyi çalışılmıştır ve iki sınıflandırması mevcuttur. Ancak omurgasız aktinleriyle ilgili çalışmalar kısıtlıdır. Yetersiz genetik veri sebebiyle, omurgasız aktinlerine özel bir sınıflandırma mevcut değildir. Çalışmamızda *Gibbula rarilineata* aktinini klonlayarak mevcut protein veri bankasının içeriğine katkıda bulunmayı amaçladık.

Çalışmamızda *G. rarilineata* örnekleri Marmara Denizi'nden toplandı. Örneklerin ayak dokusundan total RNA izolasyonu yapıldı ve izolatlar cDNA sentezi için kullanıldı. *G. rarilineata* aktini, tasarlanan gen spesifik primerlerin PZR'de kullanımıyla çoğaltıldı. Elde edilen PZR ürünleri klonlandı ve *G. rarilineata* aktin nükleotid dizisi bölgesel olarak dizilendi. Nükleotid dizileri, amino asit dizilerine translasyonu yapıldı ve insan aktin izoformları ile GenBank'ten elde edilen diğer gastropod aktin amino asit dizileriyle hizalandı. Filogenetik analiz, *G. rarilineata* aktininin sınıflandırılması için kullanıldı.

Ağustos 2019, 63. sayfa.

Anahtar kelimeler: Aktin, cDNA, *Gibbula rarilineata*, filogenetik analiz, sınıflandırma.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

cDNA CLONING and PHYLOGENETIC ANALYSIS of *Gibbula rarilineata* (CLASS: GASTROPODA) ACTIN GENE

Şeyma EREN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ TANSEL

Actin is one of the most abundant proteins found in eukaryotes and highly conserved in many taxa from prokaryotes to human. Actin is, also, one of the most studied proteins due to its primary roles in cytoskeleton, and muscle contraction. In addition, because of its so called ancient origins, classification of variable number of actin isoforms in different taxa is considered to have potential of being informative about evolution of eukaryotic cells.

Although vertebrate actins are well studied and there are two accepted classifications for vertebrate actins, the studies about invertebrate actins are very limited. Because of the lack of genetic data, there is not a specific classification for invertebrate actins. In our study, we aimed to extend the existing protein database of invertebrates by cloning *Gibbula rarilineata* actin gene.

In our study, *G. rarilineata* specimen were collected from Marmara Sea. Total RNA was isolated from foot tissue of specimen and total RNA isolates were used for cDNA synthesis. PCR amplification of *G. rarilineata* was performed by using of designed gene specific primers. Obtained PCR products were cloned and sequenced. Partial nucleotide sequences were translated to amino acid sequences and aligned with human actin isoforms and other amino acid sequences of gastropoda collected from GenBank. Phylogenetic analysis was used for classification of *G. rarilineata* actin.

August 2019, 63 pages.

Keywords: Actin, cDNA, *Gibbula rarilineata*, phylogenetic analysis, classification.



1. GİRİŞ

Aktinler, çok sayıdaki önemli biyolojik rolleri sebebiyle en fazla çalışılmış proteinlerdendir (Perrin ve Ervasti, 2010). Aktinlerin bu biyolojik rollerini, farklı taksonomik gruplardaki canlılarda bulunan değişken sayıdaki birbirinden ayrı rolleri üstlenen izoformlarıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Perrin ve Ervasti, 2010; Simiczyjew ve diğ., 2017). Aktin izoformları aktin multigen ailesini oluşturur. Aktinlerin tek hücrelilerden insana dek korunmuşluk göstermesi sebebiyle, aktinlerin sınıflandırılması ve çeşitli taksonomik seviyelerdeki filogenetik ilişkileri çözümleme potansiyelinin sınanmasıyla ökaryotik hücrelerin evrimiyle ilgili öngörü sağlayabileceği düşünülmektedir. Aktinin omurgalıları ile omurgasızlardaki izoformlarının farklı evrimsel hikâyelere sahip olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmanın “Genel Kısımlar” bölümünde; aktinlerin yapısal, işlevsel ve moleküler özellikleri ve çeşitli taksonomik gruplarda yapılan aktinle ilgili çalışmalar, bu bilgiler doğrultusunda incelenmiştir.

cDNA, kalıp olarak kullanılan RNA’dan revers transkripsiyon enzimleri kullanılarak elde edilen DNA’dır. Böylece elde edilen cDNA dizisi, RNA dizisinin komplementeridir. DNA çift zincirli olduğundan, bir vektöre aktararak RNA’dan daha kolay klonlanabilmesi ve dizi analizinin yapılabilmesi, RNA ile ilgili araştırmaların cDNA formu üzerinden gerçekleştirilmesini gerekli kılmıştır. Protein kodlayan genlerin mRNA’larına ait cDNA’lar ile çalışılması, mRNA’nın yalnızca ekzon bölgelerini içermesi sebebiyle, proteinlerin amino asit dizilerinin elde edilmesini mümkün kılar. cDNA eldesinde kalıp olarak kullanılacak RNA, canlı dokularının kimyasal ve mekanik homojenizasyonu yapıldıktan sonra izole edilir. RNA izolasyonunda kullanılacak doku, eldesi hedeflenen RNA’nın doku spesifikliğine göre değişkenlik gösterir. Kalıp RNA’dan cDNA sentezi revers transkriptaz enzimleriyle gerçekleştirilir. mRNA’lardan revers transkripsiyon ile cDNA eldesinde, mRNA’nın poli(A) kuyruğuna bağlanan oligo (dT) primerler kullanılır. Böylece tek zincirli RNA’ya komplementer olarak sentezlenen yeni zincir sayesinde, çift zincirli ilk cDNA sentezi gerçekleştirilir. PZR ile kalıp ilk zincir cDNA’ların çoğaltılması ve dizilenmesi sonrasında, nükleotid dizisinin *in silico* translasyonu ile protein kodlayan bölgenin amino asit dizisi elde edilmiş olur. Yalnızca bölgesel dizisi bilinen genlerde ise, cDNA’nın 5’ ucuna bağlanan adaptörler ve 3’ uçlarına bağlanan oligo (dT) primer türevleri sayesinde, tam boyutlu dizisi bilinmeyen genlerin dizi bilgisinin elde

edilmesi mümkün hale gelir. Çalışılacak organizmadan izole edilen RNA'nın 5' ucuna adaptörlerin eklenmesi ve cDNA'nın ilk zincir sentezinin oligo (dT) primer türevleri ile gerçekleştirilmesi sayesinde, ilgili genin bilinen bölgesel dizisi üzerinden tasarlanan gen spesifik primerlerin kullanmasıyla gerçekleştirilen Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) PZR ile tam boyutlu cDNA'lar çoğaltılır. Dizilemeler sırasında ürünlerin özellikle uç bölgelerinin okumaları genellikle güvenilir veri sağlamadığından, özellikle genlerin tam boyutlu dizilerinin elde edilmesiyle ilgili çalışmalarda, PZR ürünlerinin klonlanması önemlidir. Klon vektörüne bağlanan primerlerle yapılan dizilemeler sayesinde, elde edilen PZR ürünlerinin tam boyutlu dizilemesi sağlanır. Bu bilgiler çerçevesinde tasarlanan deney süreci ve kullanılan malzemeler, "Malzeme ve Yöntem" bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Bu bölümde, çalışmada kullanılan canlı olan *Gibbula rarilineata*'nın örneklenmesi ve muhafazasıyla ilgili bilgi verilmiş ve bu örneklerden alınan doku parçalarından total RNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi, ardından RNA izolatının kalıp olarak kullanılmasıyla ilk zincir cDNA'nın sentezlenmesi ve cDNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen PZR ile canlıya ait aktin geninin çoğaltılmasına yönelik çalışmalar belirtilmiştir.

"Bulgular" bölümünde; laboratuvarında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen tüm veriler bir araya getirilmiş ve biyoinformatik ve filogenetik analiz sonuçları gösterilmiştir. Bu analizlerde elde edilen bölgesel *G. rarilineata* aktininin sınıflandırılması hedeflenmiştir.

"Tartışma ve Sonuç" bölümünde ise, bulgular şimdiye kadar yapılan diğer çalışmalardan elde edilen verilerle karşılaştırılarak tartışılmıştır. *G. rarilineata* aktini tam boyutlu olarak elde edilemediğinden, ileri çalışmaların gerekliliği belirtilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

Aktin, tüm ökaryotik hücrelerde en fazla miktarda bulunan proteinlerden biridir ve tek hücrelilerden insana kadar pek çok canlı grubunda yüksek korunmuşluk gösterir (Vedula ve Kashina, 2018). Ökaryotlarda 42 kDa boyutunda, küresel bir protein olan aktin, kas filamentlerini oluşturarak kas kasılmasını sağlar ve hücre iskeletinin temel bileşenlerinden biri olarak hücre hareketi, endositoz, ekzositoz, fagositoz, organel hareketi, madde taşınması, hücre bölünmesi, transkripsiyonun ve hücre şeklinin düzenlenmesi gibi yapısal ve işlevsel yönden önemli hücre faaliyetlerinde rol alır (Bryant ve diğ., 2006; Ma ve diğ., 2007; Perrin ve Ervasti, 2010). Aktinin üstlendiği geniş dağılım gösteren bu biyolojik roller, aktinin farklı canlı türlerinde değişken sayıda üyesi bulunan bir multigen ailesi tarafından kodlanan hücre içindeki izoformlarıyla mümkün olmaktadır. Bu multigen ailesi, şeker kinazların, ısı şok proteini-70 (Hsp-70) ile ilişkili proteinlerin adenosin trifosfat (ATP) bağlayan domainlerinin, aktin ile ilişkili proteinlerin ve prokaryotik aktin homologlarının dahil olduğu bir adenosin trifosfataz (ATPaz) süper ailesinin üyesidir (Ivanov ve diğ., 2015).

Multigen aileleri, ortak atasal genlerden duplikasyon ve ayrışmayla türeyen gen setleridir. Ökaryot genlerinin işlevsel ve düzenleyici rolleri bakımından evriminin çalışılmasında kullanışlı birer model oluşturan multigen ailelerine üye olan genlerin karakterizasyonu protein kodlayan bölgelerinin, nükleotid dizilerinin ve ekzon-intron dizilimlerinin karşılaştırılması sayesinde evrimsel yolları izlenebilir (Hightower ve Meagher, 1986). Aktin multigen ailesinin üyelerinin, hem yüksek derecede korunmuş olması hem de başta hücre iskeletinin ana bileşeni olarak üstlendiği geniş dağılım gösteren önemli rolleri gereği hücrelerde bol miktarda bulunması, bu genlerin analizlerinin çok çeşitli taksonomik seviyelerde hücre evrimle ilgili öngörü sağlama ve gen ile tür ilişkilerinin karşılaştırılmasına aracılık etme potansiyeli bulunduğu işaret etmektedir (Bhattacharya ve Ehling, 1995).

Yapılan çalışmalarda, birbirine en uzak omurgalı aktin izoformlarının protein dizileri arasındaki fark oranının % 6,6 olduğu gösterilmiştir (Mounier ve diğ., 1992) ve aktinler nükleotid dizisi seviyesinde de yüksek homoloji göstermektedir. Aktin izoformlarının sayısı, farklı canlı gruplarında değişkenlik gösterir. Örneğin kuşlarda ve memelilerde 6 aktin izoformu bulunur. Omurgasızlarda ise, çeşitli taksonomik gruplardaki canlılara ait izoform sayıları bilinmekle birlikte (Bhattacharya ve Ehling, 1995), omurgalıları kıyasla, aktinle ilgili daha az çalışma

mevcuttur (Ivanov ve diğ., 2015). Aktin izoformları, bitkilerde ve pek çok protozoonda da multigen aileleri tarafından kodlanır, ancak mayalarda ve alveolatlarda tek bir gen tarafından kodlanan tek bir aktin tipi bulunmaktadır (Carlini ve diğ., 2000). Aktin izoformlarının omurgalılarıdaki sınıflandırmasında, amino asit dizilerinin N-terminal bölgesindeki belirleyici değişikliklere bağlı olarak farklılık gösteren izoelektrik noktalarına göre, yükselen asiditeyi ifade edecek şekilde, sırasıyla α , β ve γ isimlendirmesi kullanılmaktadır (Perrin ve Ervasti, 2010). Ayrıca, izoformun bulunduğu dokuya göre kas hücresi tipi ve sitoplazmik tip olmak üzere iki genel kategori kabul edilmektedir (Wang ve diğ., 2008). Bunlardan α_{iskelet} -aktin, $\alpha_{\text{düz}}$ -aktin, α_{kalp} -aktin ve $\gamma_{\text{düz}}$ -aktin izoformlarının genetik anlatımı ağırlıklı olarak iskelet kası, kalp kası ve düz kas hücrelerinde gerçekleşir. Kas hücresi olmayan hücrelerde ise, bu gruplardaki canlılara ait diğer iki izoform olan $\beta_{\text{hücreiskeleti}}$ -aktin ve $\gamma_{\text{hücreiskeleti}}$ -aktin yüksek seviyede anlatılır (Perrin ve Ervasti, 2010). Omurgalılara ait sitoplazmik β ve γ aktinleri arasındaki farklılıkların kaynağı, biyokimyasal özellikleri birbirine yakın olan dört amino asittir (Perrin ve Ervasti, 2010). Bunun yanında, aktin izoformları, bulundukları canlıdan ziyade dokuya özgünlük gösterdiğinden, bir türün farklı dokularındaki izoformların amino asit kompozisyonlarındaki fark, birbirinden evrimsel olarak uzak türlerdeki aynı dokulara ait izoformların farkına kıyasla daha fazladır (Simiczyjew ve diğ., 2017). Omurgasızlarda ise farklı canlı gruplarında dokuya özgü aktin izoformları bulunmuş olmakla birlikte, genel kabul görmüş bir aktin sınıflandırması mevcut değildir. Canlılardaki aktinlerin birbirinden çok az farklılık gösteren çok sayıdaki izoformlarının farklı biyolojik roller üstlendiği knockout fare modellerinde gösterilmiştir (Perrin ve Ervasti, 2010). Ayrıca bu izoformların, değişen seviyelerde genetik anlatımı ve hücrede fazlaca ihtiyaç olan aktinin yüksek miktarda üretilmesini sağladığı düşünülmektedir. Buna rağmen, izoformlar arasındaki işlevsel ayrışmanın mekanizması uzun yıllardır tartışılmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada ise, aktin fonksiyonlarının tek belirleyicisinin amino asit dizileri olmadığı, özellikle β aktin için ana rolün belirleyicisinin nükleotid dizisi olduğu öne sürülmüştür (Vedula ve Kashina, 2018).

Aktinlerin hem nükleotid hem de amino asit seviyesindeki dizileri arasındaki filogenetik ilişkilerin incelendiği birçok çalışma arasında çeşitli aktin proteinlerinin incelendiği çalışmalar ve sadece spesifik türlerin ya da filumların aktinlerinin incelendiği çalışmalar mevcuttur (Wahlberg ve Johnson, 1997). Bunlara ek olarak, ökaryotların evrim ağacının şekillendirildiği çalışmalarda da aktin ile aktinin son yıllarda yeni keşfedilmiş bir formu olan nüklear aktinleri de barındıran süper gen ailesinin üyelerinden yararlanılmaktadır (Bajusz ve diğ., 2018). Bu

çalışmalarda sunulan modeller, aktinin ortaya çıkışının ökaryotların ortaya çıkışından önce gerçekleştiğini ve prokaryotik dünyaya kadar uzandığını, hatta aktinin ilk olarak bakterilerin, arkelerin ve ökaryotların ortak atasında evrildiğini öne sürmektedir (Erickson 2007; Stoddard ve diğ., 2017). Tek aktin geni taşıyan organizmalarda yapılan çalışmalar, bu organizmaların aktin gen dizilerinin kas hcreti tipi aktinlerden ziyade, omurgalıların sitoplazmik aktinlerine benzediğini gösterdiğinden, sitoplazmik aktinler atasal kabul edilmektedir (White ve Crother, 2000). Kökeninin çok eski olduğu öne sürülen aktinlerin hayat ağacındaki taksonomik gruplar arasındaki farklarını inceleyen yakın tarihli bir çalışmada ise (Gunning ve diğ., 2015), yüksek korunmuşluk gösteren ve çok işlevli omurgalı aktinleri, amino asit dizileri değişkenlik gösteren ve tek işlev üstlenen bakteriyel aktin homologları (MreB, FtsA ve ParM) ile karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucunda, aktinlerdeki değişen seviyelerdeki dizi benzerliğinin kaynağının, aktinle etkileşen diğer moleküllerin oluşturduğu seçilim baskısı olduğu öne sürülmüştür. Gunning ve diğ. (2015), omurgalı aktinlerinin, 100'n üzerindeki proteinle etkileşiminin, yüzeydeki amino asit bakiyelerinin neredeyse tamamı aracılığıyla gerçekleştiğini, bu sebeple, aktindeki olası amino asit değişimlerinin, aktinin diğer proteinlerle etkileşimini engelleyerek aktinin hayati işlevlerinin kaybıyla sonuçlanabileceğinden, aktinin amino asit dizisi üzerinde seçilim baskısı oluştuğunu, böylece dizinin diğer proteinlerle etkileşim gösteren bölgelerinin yüksek oranda korunmuş olarak kaldığını belirtmişlerdir. Omurgalı aktinlerinin ortaya çıkışı ise, kuşların evriminden önce gerçekleştiği tahmin edilen gen duplikasyonlarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Omurgalı aktinlerinin ortaya çıkışıyla ilgili öne sürülen bu modelde, önce bir gen duplikasyonu ile daha yüksek korunum gösteren β ve γ aktinlerin, daha sonra iki ayrı gen duplikasyonu ile benzerlik seviyeleri daha düşük kas hcreti tipi aktinlerin ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Vedula ve Kashina, 2018).

Aktin gen ailesinin yeleri, yüksek dizi homolojisinin bir diğer sonucu olarak, düşük evrimleşme hızıyla, çeşitli taksonomik seviyelerdeki ilişkilerin çözümlenmesi için önemli bir veri potansiyeli taşıyan nükleer belirteç genlerindendir. Bu nedenle daha fazla omurgalılarda olmak üzere, pek çok omurgasız türünde de aktin geninin bölgesel dizilemesini ve/veya karakterizasyonunu konu alan pek çok çalışma mevcuttur.

Moleküler filogeni, homolog deoksiribonükleik asit (DNA) ya da amino asit dizilerinin karşılaştırılmasıyla, organizmaların çeşitli taksonomik seviyeleri ya da genler arasındaki ortak atasal ilişkilerin ağaç benzeri diyagramlar şeklinde yansıtılmasıdır (Patwardhan ve diğ., 2014).

Moleküler belirteç olarak kullanılan kısa DNA dizileri, genler, ya da mikrosatellit bölgeleri arasında yapılan karşılaştırmalarda benzerlik görülmeyen bölgeler, zaman içinde gerçekleşen moleküler evrimin sonucu olan ayrışmaları gösterir. Bu ayrışmaların istatistiksel hesaplamalara dayanan analizleriyle, farklı organizmalar ya da genler arasındaki benzerlik ilişkisinin hiyerarşisini temsil eden filogenetik ağaçlar elde edilir. DNA dizilerindeki değişimin sabit hızda gerçekleştiği ve amino asit değişimlerinin evrimsel zaman ölçeğiyle korelasyon gösterdiği önermesine dayanan moleküler saat hipotezi ise, soy hatlarındaki ayrışmaların zamanını belirlemede kullanılır.

Organizmalara ait tüm genler ya da makromoleküller, filogenetik belirteç olmaya uygun değildir ve her filogenetik belirteç her organizma grubunun ilişkilerinin çözülmesinde bilgi sağlamaz. Çok hızlı evrilen bir gen, çoklu değişimler sebebiyle satürasyona ulaşabileceğinden, filogenetik analizler için bilgi sağlayacak yeterli bölgeye sahip olmayabilir. Bu sebeple evrimsel hızı düşük, yani daha yüksek korunmuşluk gösteren genlerin filogenetik analizlerde kullanımı daha uygundur. Protein kodlayan nükleer bir gen olan elongasyon faktörü-1a (EF-1a), 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA), 5S rRNA, 28S rRNA gibi nükleer ribozomal genler ve sitokrom oksidaz I/II (COI I/II), mitokondriyal 12S rRNA, sitokrom-b gibi mitokondriyal genler çeşitli taksonomik seviyelerdeki filogenetik analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin bilinmeyen türlerin kısa DNA dizilerinin bilinen türlere ait bir dizi havuzuyla karşılaştırılarak tanımlanmasının gerçekleştirildiği DNA barkodlama yönteminde (Hebert ve diğ., 2003) hayvan türleri için kullanılan standart genetik belirteç, COI genidir (Patwardhan ve diğ., 2014). COI geni, moleküler sistematik çalışmalarında da sıklıkla 12S rRNA gibi diğer mitokondriyal genlerle birlikte değerlendirilir. Bunun yanında, mitokondriyal DNA (mtDNA) dizi analizlerinin çözümleyemediği bölgelerde söz konusu taksonomik grup için bilgi sağlayabilecek nükleer genlerin de bu kombinasyona eklenmesi daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesini sağlayabilir (Carlini ve diğ., 2000). Ayrıca, bir organizmaya ait farklı genlerin evrimsel hızları veya tarihleri farklılık gösterebileceğinden, tek bir belirteç gen veya protein dizisinden elde edilen filogeniler, yalnızca o gene ait evrimi yansıtır. Organizmaların farklı taksonomik seviyelerdeki ilişkilerinin belirlenmesi ise çok sayıda gen ağacının birlikte kullanılmasıyla mümkündür.

Aktin dizilerinin filogenetik belirteç olarak değerlendirildiği erken dönemlerde, evrimleşme hızının düşük olması bakımından, filum altı taksonomik seviyelerde filogenetik belirteç olarak

kullanılmaya uygun olmadığı öne sürülmüştür (Mounier ve diğ., 1992) ve aktinle ilgili çalışmalar, genellikle, filum üzeri ilişkilerin belirlenmesi ile aktin geninin evrimi çalışmalarıyla kısıtlı kalmıştır (Carlini ve diğ., 2000). Ancak aktin geninin çok sayıda ökaryotun filogenetik ilişkisini belirlemede kullanıldığı çalışmalar, aktin gen dizilerindeki karakterlerin, filumdan aşağı bazı hiyerarşik seviyelerde de canlıdan bağımsız evrilmediğini göstermiştir (Daniel ve diğ., 2001). Örneğin Carlini ve diğ. (2000), bir genin veya gen ailesinin korunmuşluk seviyesinin, farklı taksonlarda ve genin paralogları arasında değişkenlik gösterdiğini, bunun yanında aktinin evrimsel hızının ölçüldüğü çalışmalarda, aktinin yalnızca amino asit dizisi üzerinden evrimleşme hızının ölçüldüğünü belirterek, aktinin, sinonim olmayan değişim hızına oranla 35 kat daha hızlı olabilen sinonim değişimlerinin, daha aşağı takson seviyelerinin ilişkilerinin analizlerinde bilgi sağlayabileceğini öne sürmüştür. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda, aktin, filumun aşağısındaki taksonomik seviyelerde de filogenetik belirteç olarak değerlendirilmiştir (Uribe ve diğ., 2017; Sin ve diğ., 2007; Bhattacharya ve Ehrling, 1995). Bununla birlikte çoğu organizmada aktinin çok sayıda izoformunun bulunmasının, paralog ve ortolog aktinlerin ayrıştırılmasındaki zorluklar yönünden, yakın akrabalığı olan organizmaların filogenetik karşılaştırmalarında karışıklığa sebep olabileceği de tartışmalar arasındadır (Adema, 2002). Buna rağmen, aktin dizilerindeki yüksek korunmuşluk ve aktinin tüm ökaryotlarda hücre iskeletinin bileşeni olarak üstlendiği temel rol sayesinde, ökaryotik canlı gruplarının hücresel evrimiyle ilgili öngörü sağlama ve gen ile tür arasındaki ilişkilerinin incelenmesine aracılık etme potansiyeli çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir (Bhattacharya ve Ehrling, 1995).

Omurgalı aktinlerine kıyasla omurgasız aktinlerine ait bilgi birikimi azdır ve buna bağlı olarak, tüm omurgasız aktinlerini kapsayan, kabul edilmiş bir sınıflandırma mevcut değildir (Ivanov ve diğ., 2015). Omurgasız aktinlerinin, genellikle, Chordata'nın kas aktinlerinden ziyade sitoplazmik aktinler ile benzerlik gösterdiği düşünülmektedir (Vandekerckhove ve Weber, 1984). Tunicata'nın kas hücresi tipi benzeri aktin izoformlarının ise hem omurgalı hem de omurgasız aktinlerine benzediği, dolayısıyla Tunicata'nın kas hücresi tipi aktinlerinin, sitoplazmik aktinden kas hücresi tipi aktine geçişi temsil ettiği öne sürülmüştür (Kovilur ve diğ., 1993). Bununla birlikte, Arthropoda aktinleriyle yapılan çalışmalar, omurgasızlardaki aktin izoformlarının farklı evrimsel hikâyeleri olabileceğine işaret etmektedir. Örneğin Mounier ve diğ. (1992), Arthropoda aktinlerini diğer metazoa aktinleriyle karşılaştırarak yaptıkları çalışmada, *Drosophila melanogaster* ve *Bombyx mori* türlerinin kas dokusuna özgü anlatımı olan aktinlerinin, omurgalı kas hücrelerine ait izoformlardan büyük ölçüde farklı

olduğunu göstererek, kas hücresi tipi aktinlerin Chordata'da ve Arthropoda'da birbirinden bağımsız olarak ortaya çıktığını öne sürmüşlerdir. Arthropoda ve Deuterostomia kas aktinlerinin arasındaki bu farklılığın, Protostomia ve Deuterostomia soy hatlarında gerçekleşmiş muhtemel iki kas aktini derivasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu da kas hücresi tipi aktinlerin, hayvanların evrimi süresince sitoplazmik aktinlerden en az iki kez ortaya çıktığını göstermektedir (Mounier ve diğ., 1992).

Bilateral simetri gösteren canlılar, Ecdysozoa, Deuterostomia ve Lophotrochozoa olmak üzere üç ana gruba ayrılır. Ecdysozoa grubu Arthropoda ve Nematoda; Deuterostomia ise omurgalılar, Ascidia'yı ve Echinoidea'yı içerir. Annelida, Platyhelminthes, Nemertea, Bryozoa, Phoronida, Brachiopoda ve Mollusca'dan oluşan Lophotrochozoa grubu ise, barındırdığı geniş takson çeşitliliğine rağmen, moleküler seviyede, diğer iki bilateral gruba göre çok daha az çalışılmıştır. Ancak yapılan gelişim genetiği çalışmaları, daha önce omurgalılara atfedilen bazı özelliklerin Lophotrochozoa grubuna dâhil canlılarda da bulunduğunu göstermiş (Bryant, 2004), bu bakımdan, bilateral simetri gösteren Mollusca gibi bu gruba dâhil taksonların model olarak canlıların evriminin anlaşılmasındaki önemini ortaya koymuştur.

Mollusklar, değişken yaşam döngülerine sahip, yüksek çeşitlilik gösteren canlıları barındıran bir omurgasız hayvan grubudur. Mollusk grubundan canlılar sığ sulardan derin denizlere tüm denizel ortamlarda yayılım gösterir ve bu gruba dâhil karasal formlar da mevcuttur. Bunlar arasından sığ sularda bulunan, daha büyük boyutlu türler daha iyi bilinmektedir, ancak bu canlılar mollusk çeşitliliğinin küçük bir bölümünü oluşturur. Diğer mollusk ailelerinin veya cinslerinin fazla bilinmemesinde, bu organizmaların boyutlarının küçüklüğü ya da spesifik yaşam ortamlarının insanların erişimine elverişsizliği gibi sebeplerle örneklenmelerinde yaşanan zorluklar etkilidir. Bu zorlukların başlıca çıktısı olarak, molluskların kökenleri ve farklı fenotiplerinin evrimi, öne sürülen pek çok filogenetik modele rağmen, büyük ölçüde çözümsüz kalmıştır (Wanninger ve Wollesen, 2019). Bu sebeple, mollusk türlerinin zenginliği, biyocoğrafik dağılımı ve filogenetik analizleri için, başta derin denizlerde olmak üzere taksona ait canlıların tüm dağılım alanlarında örneklemelerinin artırılarak bu canlıların çalışılması önem kazanmaktadır. Bununla birlikte, mollusklara ait zengin bir fosil kaydı mevcuttur. Mollusklar, ilaç sanayii ile tıpta kullanılan immünoestimülatör etkili peptidlere sahip olan ve besin olarak tüketilen canlı türlerini barındırması yönünden ayrıca ekonomik bir önem de kazanmıştır (Wanninger ve Wollesen, 2019). Mollusk filumunun günümüzde kabul edilen sınıfları Bivalvia,

Caudofoveata, Cephalopoda, Gastropoda, Monoplacophora, Polyplacophora, Scaphopoda ve Solenogastres'tir.

Mollusk aktinlerinin izole edildiği pek çok çalışma mevcuttur. *Aplysia californica*'da kas hücresi ve sitoplazmik aktin tiplerinin ikisi de bulunmuştur ve her bir haploid genom başına 3-5 aktin geni bulunduğu düşünülmektedir. *Crassostrea gigas*'ta da, birinin anlatımı mantoda olmak üzere, iki çeşit aktin karakterize edilmiştir. *Placopecten magellanicus*'un adduktor kasından bir aktin geni izole edilmiştir; southern hibridizasyonu aktin gen ailesinin 12-15 üyeye sahip olabileceğini göstermiştir. *Patella vulgata*'da aktin geninin analizi, 3'-UTR bölgesindeki farklılıklara dayanarak 4 alt grupta sınıflandırılacak 7 genin mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Gelişimin erken safhasında her bir alt grup için yapılan anlatım analizleri, bunların birbirinden bağımsız olarak düzenlendiği ve farklı işlevlere sahip olduğunu göstermiştir (Bryant ve diğ., 2006). Bunların yanında, üç ana mollusk sınıfında izole edilen aktinler yüksek amino asit homolojisi göstermektedir ve bunların protein kodlayan bölgelerinin dizi uzunluğu neredeyse sabittir (Hongming ve diğ., 2007; Sin ve diğ., 2007; Adema, 2002). Bu örnek çalışmalara rağmen, Molluskların kökenlerinin çalışılmasında karşılaşılan genel sorunlara benzer şekilde, genetik verinin yetersizliğinden kaynaklı olarak, Mollusk aktinlerinin özelinde de gen ailelerinin çeşitliliği, tipleri, anlatımı ve moleküler evrimi hakkında bilgi birikimi kısıtlıdır. Yapılan çalışmalarda, Mollusk aktinlerinin omurgalıların hem kas tipi hem de sitoplazmik aktinleriyle benzerlik göstermesi sebebiyle sınıflandırılması mümkün olmamıştır (Ivanov ve diğ., 2015).

Mollusk filumunu temsil eden çeşitli canlı türlerine ait aktinlerin karakterizasyonu, Arthropoda aktinleriyle yapılan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda, aktin geninin Protostomia soy hattındaki kas tipi aktin izoformlarının köken(ler)i hakkında öngörü sağlaması bakımından (Carlini ve diğ., 2000) özellikle önem kazanmaktadır. Bunun yanında, Mollusk aktinlerinin sınıflandırılmasında kullanılmak üzere ve taksonomik seviyelerdeki ilişkilerin çözülmesine yönelik filogenetik analizlerde aktinin sahip olduğu nükleer belirteç gen olarak kullanılma potansiyeli, mollusklarda aktinlerin çalışılması gerekliliğini öne çıkartmaktadır.

Gastropodlar, barındırdığı 70.000 den fazla organizmayla mollusk filumuna dâhil en büyük sınıftır ve kabuklu ile kabuksuz salyangoz türlerini barındırır (Ivanov ve diğ., 2015). Gastropodların en fazla canlı çeşitliliğini içeren alt sınıflarından Vetigastropoda ise *Gibbula* cinsinin dâhil olduğu Trochidae ailesini içerir.

Gastropodlarda kabuğun başlıca şekil, yapı ve renkli desen özelliklerinin temel alındığı bir sınıflandırma kullanılmaktadır (Bieler, 1992). Ancak farklı anatomik özelliklerin modern filogenetik yöntemlerle değerlendirilmesi ve moleküler karakterlerin kullanılmaya başlaması Gastropod sınıflandırmasını köklü olarak değiştirmiştir (Brown ve Lydeard, 2010). Günümüzde kullanılan genetik veriye dayalı yöntemler, örtülü kalmış türleri ve pek çok gastropod taksonundaki şüpheli tür delineasyonlarını ortaya çıkartmış (Delicado ve Ramos, 2012; Weigand ve diğ., 2013) ve sistematikte bazı revizyonları gerekli kılmıştır (Affenzeller ve diğ., 2017). Bu sebeple kabuk morfolojisi gibi salt dışsal özelliklerin kullanılmasına dayanan tür belirlemeleri ve delineasyonları, moleküler belirteçlerden ya da morfometriden elde edilen verilerle de desteklenmediği sürece güvenilir değildir. Tür belirleme ve tanımlama, sınıflandırmanın yanında biyoçeşitliliğin, ekolojik niş farklılaşmasının ve korunum ölçümlerinin değerlendirilmesi bakımından da önem taşır (Affenzeller ve diğ., 2017).

Trochidae ailesi ekolojik ve ekonomik yönden önemli üyeler barındırır. Spiral ve konik kabukları bu grubun üyelerinin ayırt edici özelliklerindendir ve bu canlılar otlanarak beslenir (Hawkins ve diğ., 1989). Gruba dâhil üyeler, dünya çapında yayılım göstermekle birlikte, Batı Pasifik ve Hint Okyanuslarının özellikle gelgitli tropik kayalık kıyılarında yoğun olarak bulunur (Williams ve diğ., 2010). Hem morfolojik özelliklerinde (Williams ve diğ., 2008) hem de moleküler filogenilerinde (Kano, 2008; Williams ve diğ., 2008, 2010; Williams, 2012) karşılaşılan homoplazi sebebiyle Trochidae ailesinin sistematigi ve filogenetik ilişkileri yalnızca kısmen çözümlenebilmiştir (Uribe ve diğ., 2017). Bu yönden, Akdeniz trochid gastropodları, önceki tanımları ve delineasyonları çoğunlukla bulanık kalmış türlerin güncel bağlamda değerlendirilmesi için elverişlidir ve *Gibbula* cinsinin temsilcileri bunlara örnektir (Affenzeller ve diğ., 2017).

Gibbula cinsinin temsilcileri zengin çeşitliliktedir ve dünya denizlerinde geniş yayılım gösterir. Bunun yanında, *Gibbula* cinsine ait türlerin kabuk morfolojilerindeki çeşitliliğe, orijinal tanımlamalarındaki muğlaklığa ve örneklemelerindeki yetersizliğe bağlı olarak tanımlanması ve delineasyonu sorunlar barındırmaktadır. Ayrıca, *Gibbula* cinsine ait türler ile *Phorcus* ve *Steromphala* cinslerinin temsilcileri arasındaki morfolojik benzerlikler, bu üç Trochidae cinsinin doğru sınıflandırılması bakımından sorun teşkil etmektedir. Hem mitokondriyal hem de nükleer genler kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde, çalışılan türe ait temsilcilerin atanmış bulunduğu cinslerle monofiletik gruplanma göstermemesi, mevcut taksonominin tekrar

gözden geçirilmesini zaruri kılmaktadır. Kabuklara ait morfometrik verilerle birlikte, farklı nükleer genlerin ve/veya mikrosatellitlerin takson örnekleme artırılarak daha ileri filogenetik analizlerde kullanılması, bu üçlü grup içi ilişkilerin çözülmesinde gereklidir. *Gibbula* cinsinin temsilcilerinin kompleksler oluşturacak şekilde yaşayabilmeleri de, bu grupta tür sınırlarının çizilmesindeki zorluklardandır.

Gibbula rarilineata, dünya genelinde yoğunlukla Akdeniz kıyıları ile Kuzey Atlantik Okyanusu'nun Portekiz kıyılarında yayılım gösteren bir tür olmakla birlikte Doğu Avrupa ülkelerinin Karadeniz kıyılarında yapılan örneklemelerde de kayıtları mevcuttur. Türkiye özelinde ise ayrıca Marmara Denizi kıyılarında bulunabilen bir türdür. *G. rarilineata* üçgen benzeri bir şekle sahiptir. Kabuk çapı ve yüksekliği birbirine yakındır (Şekil 2.1). Kabuk tabanı hafifçe konkavdır (Affenzeller ve diğ., 2017). *G. rarilineata*'nın kabuk deseni tanımlı türdeki bireyler arasında değişkenlik göstermemekle birlikte, juvenil *Gibbula divaricata*'lar ile yüksek benzerlik göstermesi ve kurumuş halde veya etanol içinde muhafaza edilmiş kabuklarının renk ve desenlerini kaybetmesi nedeniyle, tanısal değer teşkil etmemektedir (Affenzeller ve diğ., 2017).



Şekil 2.1: Çalışmada kullanılan organizma *G. rarilineata*'nın kabuklarının görünümü.

G. rarilineata, doğrudan türün biyolojisine yönelik çalışmalar bulunan model bir organizma değildir. Farklı takson seviyelerindeki çözümlemeleri amaçlayan filogenetik analizlerde kullanılmak üzere, moleküler belirteç olarak kullanılan COI geni *G. rarilineata*'da da dizilenmiştir (Barco, 2013). *G. rarilineata*'nın aktin geninin bölgesel dizisi de veri bankalarında mevcuttur (GenBank erişim kodu: ANZ03386.1).

Bununla birlikte, *G. rarilineata* gibi daha kolay örneklenebilen canlılardan elde edilecek genetik veriler, ait olduğu taksonomik grubun ilişkilerindeki belirsizliklerin çözümlenmesinde önemlidir. Bu çalışmada amaçlanan ise aktinlerin moleküler belirteç olarak mollusk filumuna ait filogenetik ilişkileri çözümleme potansiyeli, ayrıca mollusk aktinlerinin sınıflandırılmasına yönelik yapılabilecek gelecek çalışmalar göz önünde bulundurularak, *G. rarilineata* aktinin klonlanıp komplementer DNA (complementary DNA; cDNA) dizisinin elde edilmesiyle veri bankalarındaki aktin dizilerinin genişletilmesine katkı sağlamaktır.



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. *Gibbula rarilineata* ÖRNEKLERİNİN TOPLANMASI

Gibbula rarilineata örnekleri Burgazada kıyılarından toplandı. Örnekler toplandıkları anda sıvı azot içerisine aktarıldı ve RNA izolasyonu yapılana kadar -80°C’de saklandı.

3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

Total RNA izolasyonu, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Katalog No: 74104) kullanılarak, çeşitli basamaklarında uyarlamalar yapılarak üreticinin belirttiği yönergeye göre gerçekleştirildi.

Dondurulmuş *G. rarilineata* örnekleri homojenizasyon için kabuklarından ayrılarak ayak bölgesinden doku parçaları alındı ve -20°C’de soğutulmuş havan içine yerleştirildi. Doku parçaları havan içerisinde sıvı azot ile muamele edilerek parçalandı ve toz hale getirildi. Toz halindeki örnekler, kite ait yönergede belirtildiği gibi en fazla 30 mg olacak şekilde tartıldı ve -20°C’de soğutulmuş steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplere 0,5 mm ve 1 mm çapındaki cam boncuk karışımı ile kit içindeki lizis tamponu olan RLT’den 600 µl eklendi ve dokular dismembranatör aracılığıyla mekanik olarak homojenize edildi. Dismembranatördeki parçalama işlemi, 30 saniye buzda bekletme aralıkları ile 1’er dakikalık 6 tekrarla gerçekleştirildi. Santrifüj tüpü içinde doku kalıntısı bulunmadığına emin olunduktan sonra homojenatlar yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 8000 g’de 3 dakika santrifüj edildi. Homojenatlardan elde edilen süpernatanttan 500 µl alınarak başka bir tüpe aktarıldı ve üzerine aynı hacimde % 70’lik etanol eklendi. Karışımdan 700 µl alınarak kit içindeki RNeasy spin kolonuna aktarıldı ve 8000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında kolondan geçen sıvının toplandığı tüp boşaltıldı. Bu aşama her santrifüj basamağından sonra gerçekleştirildi. Daha sonra, 700 µl RW1 tamponu kolona eklendi ve 8000 g’de 30 saniye santrifüj edildi. Aynı işlemler, 500 µl RW1 tamponuyla iki kez tekrarlandı. RW1 tamponunun üçüncü kez kullanıldığı basamakta, etanol kalıntılarının uzaklaştırılması için 3 dakika santrifüj yapıldı. Etanol kontaminasyonunun engellenmesi için toplama tüpü değiştirildi ve kolon 8000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü bir kez daha değiştirildi ve kolona 1,5 µl ribonükleaz (RNaz) bulundurmayan su eklenerek 8000 g’de 1 dakika santrifüj edildi. Bu aşamada kolona bağlanan RNA toplama tüpüne aktarılacak süspansiyon haline getirilmiş total RNA izolatu elde edildi.

Elde edilen total RNA kalite ve kantite açısından değerlendirilmek üzere jel elektroforezi yapılarak görüntülendi ve konsantrasyon ölçümü Nanodrop cihazında (Thermo Fisher Scientific) gerçekleştirildi.

Elektroforez için 1XTAE tamponu kullanılarak % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Agarozun 1XTAE tamponu içinde çözünmesi için karışım mikrodalga fırında kaynama sıcaklığına gelene dek ısıtıldı. Çözeltinin 50°C'ye kadar soğuması beklendi ve enterkalasyon ajanı olarak, 0,5 µg/ml etidyum bromür eklendi. Yatay kaset içine aktarılıp donması beklenen agaroz jelin kuyucuklarına, elden edilen total RNA izolatından alınan 5 µl örnek 0,1 hacimde 5X yükleme boyasıyla karıştırılarak yüklendi. Örnek 65 mV değerinde 35 dakika 1XTAE tamponu yüklü elektroforez tankında yürütüldü. İleri aşamalarda elde edilen PZR ürünlerinin tümü için jel elektroforez analizleri aynı bileşenlerle ve aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) için cDNA Sentezi Öncesinde RNA'ların Hazırlanması

Yalnızca bölgesel dizi bilgisi mevcut olan genlerin tam boyutlu cDNA dizilerinin elde edilmesinde kullanılan yöntemlerden olan RACE PZR ile cDNA'nın 5' bölgesinin eldesi için, cDNA sentezi öncesinde dizisi bilinen adaptörlerin bu bölgeye ligasyonu gereklidir. Bu adaptörlere bağlanmak üzere tasarlanmış primerlerle birlikte gen spesifik primerlerin kullanılmasıyla dizi bilgisi mevcut olmayan uç bölgenin çoğaltılması mümkün hale gelir. Adaptör ligasyonu öncesinde, izole edilen total RNA bir defosforilasyon enzimiyle muamele edilir. Böylece tam boyutlu mRNA, başlık yapısı sayesinde intakt halde kalırken, mRNA olmayan RNA tipleri ve 5' bölgesi kırık olan mRNA'lar, cDNA sentezi öncesinde elimine edilir. Bu işlem sonrasında elde edilen tam boyutlu mRNA'ların başlık yapısı bir fosfataz enzimiyle uzaklaştırılır. Böylece 5' ucunda başlık yapısının uzaklaştırılmasından arta kalan fosfat (PO₄) ile adaptörün hidroksi (OH) ucunun, RNA ligazlar yardımıyla, ligasyonu sağlanır.

RNA'ların cDNA sentezi için hazırlanmasında GeneRacer Kit (Invitrogen, Katalog No: L150201) kullanıldı. İşlemlerde üreticinin yönergeleri kullanıldı.

3.2.1.1.RNA'nın Defosforilasyonu

RNA'nın defosforilasyonu için kitin belirttiği içeriklerle buz içinde 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpleri içinde reaksiyon düzeneği kuruldu (Tablo 3.2.1.1.1). Tüp içeriği, hafifçe pipetlenip vortekslendikten sonra 50°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüp içeriğinin dipte toplanması için santrifüj kullanıldı. Defosforilasyonu yapılmış RNA örneği, çöktürülmeden önce buz içinde bekletildi.

Tablo 3.2.1.1.1: RNA'nın defosforilasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)
RNA	4 µl
10X CIP Tamponu	1 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
CIP (10U/µl)	1 µl
DEPC H ₂ O	3 µl
Toplam	10 µl

Tüp içindeki RNA'nın defosforilasyon aşamasında kullanılan bileşenlerin kontaminasyonundan arındırılması için RNA çöktürülüp dietilpirokarbonat (DEPC) su ile tekrar süspansiyon haline getirildi. RNA'nın çöktürülmesi için 90 µl DEPC su ve 100 µl fenol:kloroform eklenerek 10000 g'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstte kalan sıvı başka bir steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve 2 µl 10 mg/ml'lik midye glikojeni ile pH 5,2 seviyesinde 10 µl 3M sodyum asetat eklendi. Otomatik pipet ile pipetaj yapılarak bileşenlerin iyice karışması sağlandı. Daha sonra % 95 etanol eklendi ve hafifçe vortekslendi. İçerik, bir gece +4°C'de bekletildikten sonra 20 dakika, 10000 g'de, +4°C'de santrifüj edildi ve RNA çöktürüldü. Çökelti hareket ettirilmeden tüp içindeki süpernatant otomatik pipet yardımıyla boşaltıldı. Tüpün içine 500 µl %70 etanol ilave edildikten sonra tüp aşağı-yukarı doğru çalkalandı, hafifçe vortekslendi ve +4°C'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj ve süpernatantın boşaltılması basamakları tüp içinde etanol kalmayınca kadar 2-3 kez tekrar edildi. Etanol kalıntısından tamamen arındırmak için örnek,

içinde bulunduğu tüpün kapağı açık biçimde 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Son olarak, defosforilasyonu gerçekleştirilen RNA, 7 µl DEPC su ile tekrar süspansiyon haline getirildi.

3.2.1.2.mRNA Başlık Yapısının Uzaklaştırılması

mRNA başlık yapısının uzaklaştırılması için buz içinde, 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpleri içinde kitin belirttiği içeriklerle reaksiyon düzeneği kuruldu (Tablo 3.2.1.2.1). Tüp içeriği hafifçe pipetlenip vortekslendikten sonra 37°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında birkaç saniye santrifüj edildi ve buz içine yerleştirildi. RNA'nın reaksiyon bileşenlerinden arındırılması için 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi çöktürülüp 7 µl DEPC su ile tekrar süspansiyon haline getirildi.

Tablo 3.2.1.2.1: mRNA başlık yapısının uzaklaştırılması için kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)
Defosforilasyonu yapılmış RNA	7 µl
10X TAP Tamponu	1 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
TAP (0,5 U/µl)	1 µl
Toplam	10 µl

3.2.1.3.Başlıksız mRNA'nın RNA Oligo ile Ligasyonu

GeneRacer Kit'in bileşenlerinden olan GeneRacer RNA Oligo (Tablo 3.2.1.3.2), üreticinin liyofilize halde içinde sunduğu tüpte, başlık yapısı uzaklaştırılan 7 µl RNA ile tekrar süspansiyon haline getirildi. Sıvının mikrosantrifüj tüpünün dibinde birikmesi için 1-2 saniye santrifüj edilmesinden sonra, RNA'nın sekonder yapısının gevşemesi için 65°C'de, 5 dakika inkübasyon yapıldı ve ardından tüp 2 dakika buz içinde bekletildi. Kitin belirttiği bileşenlerle (Tablo 3.2.1.3.1) oluşturulan reaksiyon 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1-2 saniye santrifüj edildi. RNA, 3.2.1.1'de anlatıldığı gibi çöktürüldükten sonra 10 µl DEPC su ile tekrar süspansiyon haline getirildi.

Tablo 3.2.1.3.1: RNA Oligo ligasyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)
Defosforilize, başlıksız RNA	7 µl
10X Ligaz Tamponu	1 µl
10 mM ATP	1 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
T4 RNA ligaz (0,5 U/µl)	1 µl
Toplam	10 µl

Tablo 3.2.1.3.2: RNA ile ligasyonu gerçekleştirilen adaptörün dizisi.

GeneRacer	5'-
RNA Oligo	CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA
	-3'

3.3.cDNA SENTEZİ

G. rarilineata'nın ayak dokusundan elde edilen total RNA'dan ilk zincir cDNA sentezi Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (ROCHE, Katalog No.: 05081955001) kullanılarak gerçekleştirildi. Kitin kullanımında üreticinin belirttiği yönergeye uyuldu. Sentez koşulları ve bileşenleri Tablo 3.3.1.'de gösterildi. Elde edilen cDNA, farklı PZR basamaklarında farklı primerlerle çoğaltılmak üzere -20°C'de saklandı.

Tablo 3.3.1: cDNA sentezinde kullanılan bileşenler ve sentez koşulları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
RNA	2 µl	
Oligo (dT) primer	1 µl	2,5 µM
RNaz içermeyen su	8,4 µl	
Toplam	11,4 µl	

65°C’de 10 dakika inkübasyon

5X RT Tampon	4 µl	1X
RNaz inhibitörü	0,5 µl	20U
dNTP karışımı	2 µl	1 mM (Her bir nükleotid için)
DTT	1 µl	5mM
Revers transkriptaz	1,1 µl	10U
Toplam	20 µl	

50°C’de 30 dakika inkübasyon**85°C’de 5 dakika inkübasyon****3.3.1. 5’ RACE PZR için RNA Oligo Ligasyonu Yapılmış RNA’dan cDNA Sentezi**

Elde edilme yöntemi 3.2.1’de anlatılan adaptör ligasyonu yapılmış RNA’lardan cDNA sentezi, GeneRacer Kit’e dâhil olan bileşenler ile üreticinin belirttiği koşullara uygun olarak gerçekleştirildi (Tablo 3.3.1.1). cDNA’nın ilk zincir sentezinde kullanılan GeneRacer Oligo (dT) Primer, Tablo ..’da dizisi verilmiş olan, ileri basamaklarda 3’ uç bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan, yine kit üreticisinin sağladığı GeneRacer 3’ Primer için bağlanma bölgesi sağlamaktadır.

Tablo 3.3.1.1: RNA Oligo ile ligasyonu yapılmış RNA kalıbından ilk zincir cDNA sentezinde kullanılan kit bileşenleri ve kullanım koşulları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
Oligo ligasyon uygulanmış RNA	10 µl	
GeneRacer Oligo (dT) primer (50 µM)	1 µl	
dNTP karışımı	1 µl	
Steril distile su (dH ₂ O)	1 µl	
Toplam	13 µl	
65°C’de 5 dakika inkübasyon		
Buz üzerinde 1 dakika soğutma		
5X İlk zincir tamponu	4 µl	1X
0,1 M DTT	1 µl	
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl	2 U
SuperScript III RT (200 U/µl)	1 µl	10 U
Toplam	20 µl	
55°C’de 50 dakika inkübasyon		
70°C’de 15 dakika inkübasyon		

3.4.PRİMERLER

*G. rarilinet*a’nın aktin geninin çoğaltılıp dizilenmesi için tasarlanan primerlerle kitlere ait primerler birlikte kullanıldı. Çalışmalardaki kit bileşeni olmayan primerlerin tümü hizmet alımıyla Sentegen Biyoteknoloji A.Ş.’de sentezletildi. Primerlerin sentez skalası 100 nmol olarak seçildi. Primerleri sentezleyen firmanın 2 ml’lik tüpler içinde liyofilize halde ulaştırdığı primerler, üreticinin belirttiği miktarlarda steril dH₂O ile süspanse edildi. Deneyler sırasında kullanılmak üzere, stoktan 10X sulandırılmış alikotlar hazırlandı. Kitlere ait primerler ise kit

üreticilerinin yönergelerde belirttikleri kullanım aralıkları içinde çalışmalara uyarlandı. Çalışmalar boyunca farklı PZR’lerde kullanılan primerlerin tümü Tablo 3.4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.4.1: Çalışmada kullanılan tüm primerler ve dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi (5'→3')	T _m
Acfw	CCCATCTACGAGGGTTACGC	57°C
AcRv	CTGCTGGAAGGTGGACAGAG	56°C
5Rv351	AGAAGGTGTGATGCCAGATCT	52°C
5Rv247	TCCCATGCCGACCATCACGCC	63°C
GrAcSqFw	GTCATCACCATTGGCAACGAG	54 C
3Nstd	TTGGCAACGAGAGGTTTCAGGT	54°C
GeneRacer 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	74°C
GeneRacer 3' Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	76°C
GeneRacer Oligo (dT) Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACGGCATGACAGTG(T) ₂₄	-

Aktin geninin PZR ile çoğaltımı için kullanılacak ilk primer çifti tasarlanırken *G. rarilineata*'nın, gastropodlar arasından yakın akrabalarının veri bankalarında mevcut olan aktin nükleotid dizilerinden yararlanıldı. Bunlar arasından *G. rarilineata*'nın en yakın akrabası olan *Haliotid*'lerin aktin gen dizileri GenBank veri tabanından elde edildi ve National Center for Biotechnology Information (NCBI)'in web sitesindeki (www.ncbi.gov) çevrimiçi biyoinformatik uygulaması olan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) kullanılarak diğer gastropod aktinleri ile hizalandı. Hizalamadan elde edilen veri seti BioEdit uygulamasında değerlendirilerek korunmuş dizi bölgeleri belirlendi. *Haliotis diversicolor*'a ait aktin nükleotid dizisi primer tasarımında kalıp olarak kullanıldı. Nükleotid dizisi üzerinden primer taraması yapmak üzere primer tasarımına yönelik çevrimiçi bir uygulama olan Primer-BLAST kullanıldı. *G. rarilineata* aktin geninin tam boyutlu cDNA'sının sentezi için programın öngördüğü olası primerler arasından, gen üzerindeki korunmuşluk gösterdiği kaydedilmiş olan bölgelere denk gelen ve mümkün olan en uzun diziyi çoğaltabilecek primer çiftleri değerlendirildi. Primerlerin erime sıcaklığı (T_m) değerinin 60°C civarında olmasına dikkat edildi. Programın yaklaşık 600 baz çifti (bç) uzunluğunda bir bölgeyi çoğaltacağını öngördüğü primer çifti seçildi (Tablo 3.4.1. Acfw, Acrv).

3.5.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR)

G. rarilineata aktin geninin tam boyutlu olarak elde edilebilmesi için farklı primerler ile farklı PZR stratejileri denendi.

3.5.1. Tasarlanan Primerlerle Seçilen Bölgenin Çoğaltılması

PZR, *H. diversicolor*'un aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlanan ve dizileri Tablo 3.4.1'de gösterilen Acfw ve Acrv primerleri kullanılarak, Tablo 3.5.1.1'de belirtilen bileşenlerle gerçekleştirildi. Reaksiyon için kullanılan Reddy Mix Master Mix (Thermo Scientific, Katalog No:AB1454LDA), ThermoPrime *Taq* DNA Polimeraz, 10X ReddyMix PZR tamponu, MgCl₂ ve dNTP ile birlikte jel elektroforezi sonrasında jelde PZR ürünlerinin görüntülenmesini sağlayan jel yükleme boyasını da hâlihazırda içermektedir. ReddyMix Master Mix, üreticisinin yönergesinde önerdiği miktar aralığında kullanıldı. PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar Tablo 3.5.1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.1.1: *H. diversicolor*'un aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlanan primerlerle gerçekleştirilen PZR'de kullanılan bileşenler.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X ReddyMix Master Mix	25 µl	1X
Acfw Primer	2x 1,25 µl	0,5 µM
Acrv Primer		
Kalıp cDNA zinciri	5 µl	
dH ₂ O	17,5 µl	
Toplam	50 µl	

Tablo 3.5.1.2: *H. diversicolor*'un aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlanan primerlerin kullanıldığı PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	25 saniye	30
Bağlanma	57 °C	35 saniye	
Uzama	72°C	65 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

PZR ürünlerinin görüntülenmesi için yapılan jel elektroforezi 3.2'de belirtilen şekilde, aynı malzemeler kullanılarak aynı koşullarda gerçekleştirildi. Çoğaltımda kullanılan PZR karışımı yükleme boyasını da içerdiğinden, örnekler doğrudan jele yüklendi. İleri basamaklarda çoğaltılan tüm PZR ürünleri için jel elektroforezi aynı miktardaki malzemeler kullanılarak aynı koşullarda gerçekleştirildi.

3.5.2. 5'RACE PZR

RNA Oligo ligasyonu yapıldıktan sonra sentezlenen ilk zincir cDNA'ların çoğaltılmasında, bu adaptöre bağlanabilen GeneRacer 5' Primer kullanıldı. GeneRacer 5' Primer ile birlikte kullanılmak üzere Haliotidler'e ait aktin dizileri üzerinden kısa bir bölgeyi çoğaltacak iki reverse primer tasarlandı. Tasarlanan primerlerden daha uzun boyutlu ürün vermesi beklenen 5Rv351 ile gerçekleştirilen PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.5.2.1'de, bu PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar Tablo 3.5.2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.2.1: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv351 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen ilk PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X ReddyMix Master Mix	25 µl	1X
GeneRacer 5' Primer	3 µl	
5Rv351	1 µl	
Kalıp cDNA zinciri	5 µl	
dH ₂ O	16 µl	
Toplam	50 µl	

Tablo 3.5.2.2: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv351 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltımında kullanılan PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	25 saniye	
Bağlanma	48 °C	35 saniye	30
Uzama	72°C	65 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

3.5.2.1. Touchdown PZR

Touchdown PZR, geleneksel PZR yönteminden farklı olarak, bağlanma sıcaklığının ilk döngülerde yüksek başlayıp, ilerleyen döngülerde azaldığı bir PZR türüdür. Touchdown PZR'de bağlanma sıcaklığının daha yüksek derecelerden başlamasının sebebi, primerlerin kalıp DNA'lara bağlanma spesifikliğini artırmak ve böylece hedeflenen dizi bölgesi dışındaki ürünlerin çoğaltılmasını önlemektir. Sıcaklığın ilerleyen döngülerde azalması ise PZR ürününün düşük konsantrasyonlu olarak elde edilmemesini sağlar.

5' bölgesinden çoğaltılan ilk PZR ürünü üzerinden gerçekleştirilen Touchdown PZR için, bu ürünün dizisi içinde kalan bir bölge ile örtüşme gösteren ikinci bir reverse primer tasarlandı. Touchdown PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.5.2.1.1'de, Touchdown PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar Tablo 3.5.2.1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.2.1.1: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv247 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen Touchdown PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X ReddyMix Master Mix	25 µl	1X
Gene Racer 5' Primer	3 µl	
5Rv247 Primer	1 µl	
Kalıp PZR ürünü	5 µl	
dH ₂ O	16 µl	
Toplam	50 µl	

Tablo 3.5.2.1.2: GeneRacer 5' Primer ve 5Rv247 kullanılarak 5' bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan Touchdown PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	25 saniye	
Bağlanma	66°C → 56°C (56°C'ye kadar her üç döngü sonrası 2°C düşüş, kalan 15 döngüde sabit sıcaklık)	35 saniye	30
Uzama	72°C	65 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

3.5.2.2.PZR ürünlerinin saflaştırılması

PZR ürünlerinin saflaştırılması QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Katalog No.:28704) kullanılarak, jelden geri kazanımla yapıldı. PZR ürünlerinin konsantrasyonlarının artırılması ve çoğaltılması hedeflenen ürünlerin spesifik olmayan ürünlerden arındırılması için bu yöntem kullanıldı. PZR ürünlerinin yüklenmesi için 1XTAE tamponuyla %0,8'lik agaroz jel hazırlandı. Daha fazla PZR ürününün jele yüklenebilmesi için, standart jel tarakları yerine geniş uçlu jel tarakları kullanıldı. Kuyulara 80 µl PZR ürünü yüklendi. Jel elektroforezi 60 mV'de 25 dakika sürdürüldü. PZR ürünlerinin jelden geri alınması için, çoğaltılması hedeflenen bölgeye yakın uzunluktaki bantlar, sterilize edilmiş bir bisturiyle kesilip ayrıldı ve tartıldıktan sonra santrifüj tüpüne aktarıldı. Tüp içerisinde 80 mg'lık jel, kit yönergesinde belirtildiği üzere, ağırlığıyla eşdeğer hacimde (80 µl) kabul edilerek, üzerine 4 katı hacimde QG tamponu eklendi ve 2-3 dakika aralıklar ile vortekslenerek 10 dakika 50°C'de inkübe edildi. Jel tamamen eridikten sonra, tüpe jel hacmi kadar izopropanol eklendi. Kite dahil olan QIAquick spin kolonlarına aktarılan örnek, DNA'nın kolona bağlanması için 1 dakika santrifüj edildi. Bu adımdaki ve bundan sonraki tüm santrifüj işlemleri 17900 g'de yapıldı. Santrifüj sonrasında kolona bağlı toplama tüpü içeriği boşaltıldı. Kolona 0,5 ml QG tamponu eklenerek tekrar 1 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama için kolona 0,75 ml PE tamponu eklendi ve daha etkili olması için santrifüjden önce 5 dakika kolonda bekletildi, daha sonra tüp içeriği 1 dakika santrifüj edildi. Kullanılan tampon kalıntılarından arındırmak üzere kolon bir kez daha santrifüj edildi. Tüm santrifüj basamaklarından sonra toplama tüpü içeriği boşaltıldı ve tekrar kullanıldı. Son adımda kolona bağlı DNA'nın tekrar süspansiyon haline getirilmesi için kolona 30 µl EB tamponu eklendi ve DNA eldesinin artırılması için kolon içinde 4 dakika bekletildi. Daha sonra 1 dakika santrifüj tekrar edilerek 30 µl DNA süspansiyonu elde edildi.

3.5.2.3.Saflaştırılan PZR ürünlerinin PZR ile tekrar çoğaltılması

Jelden geri kazanılarak saflaştırılan üründe konsantrasyon artışı sağlamak için, saflaştırılan ürünün kalıp olarak kullanıldığı bir PZR aşaması daha gerçekleştirildi. Kalıp DNA olarak kullanılan saflaştırılmış ürünün çoğaltımı Tablo 3.5.2.1.1'de belirtilen bileşenlerin aynı miktarlarda kullanımıyla, Tablo 3.5.2.1.2'de belirtilen aynı Touchdown PZR koşulları tekrar edilerek gerçekleştirildi.

3.5.3. 3'RACE PZR

3' RACE PZR için *G. rarilineata* aktininin Acfw ve Acrv primerleri kullanılarak çoğaltılıp dizilenen bölgesi üzerinden gen spesifik forward bir primer tasarlandı. İlk zincir sentezi GeneRacer Oligo (dT) Primer ile yapılan cDNA, PZR'de kalıp olarak kullanıldı. Tasarlanan gen spesifik primer, Oligo (dT) primer üzerinde bağlanma bölgesi bulunan GeneRacer Kit üreticisinin sağladığı GeneRacer 3' Primer ile birlikte kullanılarak *G. rarilineata* aktininin dizisi bilinmeyen 3' ucu bölgesinin çoğaltımı sağlandı. *G. rarilineata* aktininin 3' ucunun çoğaltımı için *G. rarilineata*'nın dizilenen bölgesi üzerinden tasarlanan forward primer Tablo 3.4.1.'de verilmiştir. PZR bileşenleri ve bunların kullanıldığı miktarlar Tablo 3.5.3.1'de, PZR'nin gerçekleştirildiği koşullar Tablo 3.5.3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.3.1: GrAcSqFw ve GeneRacer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltılması için gerçekleştirilen PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X ReddyMix Master Mix	25 µl	1X
GrAcSqFw	1,25 µl	
GeneRacer 3' Primer	3 µl	
Kalıp cDNA zinciri	5 µl	
dH ₂ O	15,75 µl	
Toplam	50 µl	

Tablo 3.5.3.2: GrAcSqFw ve GeneRAcer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltıldığı PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95°C	2 dakika	1
Denatürasyon	95°C	25 saniye	30
Bağlanma	51 °C	35 saniye	
Uzama	72°C	65 saniye	
Son uzama	72°C	5 dakika	1

3.5.3.1.Nested PZR

Nested PZR, çoğaltılan ürünlerin spesifikleştirilmesini sağlayan bir diğer PZR çeşididir. Bu yöntemde birbirine ardışık gerçekleştirilen iki PZR'de kullanılan primerlerden aynı yönde olanlar (forward ile forward, reverse ile reverse), birbiriyle örtüşen dizilere sahip olacak biçimde tasarlanır. İlk PZR basamağında gerçekleşmiş olabilecek spesifik olmayan primer bağlanmaları sonucu elde edilen ürünleri de barındıran reaksiyon sonrası tüp içeriği, ikinci PZR'de kalıp olarak kullanıldığında, dizisi ilk primer çiftiyle tam örtüşmeyen ikinci basamak primerlerinin bu spesifik olmayan ürünlere bağlanma olasılığı düşük olduğundan, elde edilmesi hedeflenen ürünün çoğaltılma imkanı artar.

Gerçekleştirilen Nested PZR'de GrAcSqFw ile 3' bölgesinden çoğaltılan ilk PZR ürünü kalıp olarak kullanıldı ve yine *G. rarilineata* aktininin dizilenen bölgesi üzerinden GrAcSqFw ile 11 bazlık örtüşme gösteren ikinci bir forward primer tasarlanarak kullanıldı. GeneRacer Oligo (dT) üzerinde bağlanma bölgesi bulunan ve Nested PZR'de kullanılmak üzere kit üreticisinin sağladığı ikinci 3' primer, tasarlanan primerle kullanıldığında hedef bölge çoğaltılamadığından, reverse primer olarak GeneRacer 3' Primer ikinci PZR basamağında da kullanıldı. Nested PZR, ürün spesifikliğini artırmak için, daha önce 5' bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan ve Tablo 3.5.2.1.2'de belirtilen Touchdown PZR koşullarında gerçekleştirildi. Nested PZR'de kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.5.3.1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5.3.1.1: 3Nstd ve GeneRacer 3' Primer kullanılarak 3' bölgesinin çoğaltıldığı Nested PZR'nin gerçekleştirilme koşulları.

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
2X ReddyMix Master Mix	25 µl	1X
3Nstd primer	1,25 µl	
GeneRacer 3' Primer	3 µl	
Kalıp PZR ürünü	3 µl	
dH ₂ O	17,75 µl	
Toplam	50 µl	

3.6.PZR ÜRÜNLERİNİN *Escherichia coli* TRANSFORMASYONUyla KLONLANMASI

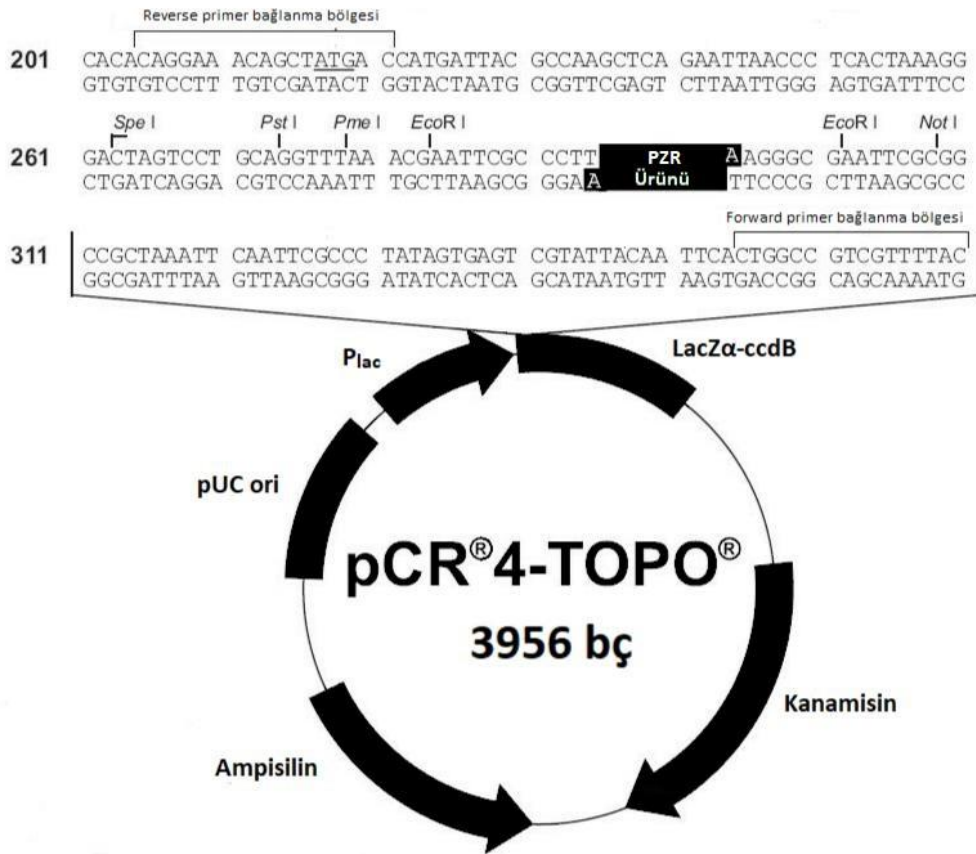
3.6.1. Plazmid Vektörün Transformasyona Hazırlanması

PZR ürünlerinin klonlanmasında, TOPO TA For Sequencing kitinin bileşenleri kullanıldı. Ancak kit üreticisinin sağladığı hücrelerin transformasyonu gerçekleştirilemediğinden, transformasyon için İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü stoklarından sağlanan *E. coli* DH5α suşu kullanıldı. Transformasyon kiti dahil olan pCR4-TOPO vektörüyle gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin pCR4-TOPO vektörüne (Şekil 3.6.1.1) aktarılmasında kullanılan bileşenler Tablo 3.6.1.1'de verildi.

PZR ürünün vektöre aktarılması için reaksiyon oda sıcaklığında (22-23°C) 30 dakika inkübe edildi ve transformasyona kadar buzun içinde bekletildi.

Tablo 3.6.1.1: PZR ürünlerinin pCR4-TOPO TA vektörüne aktarılmasında kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Hacim (µl)
PZR Ürünü	3 µl
Tuz Çözeltilisi (200mM NaCl, 10 mM MgCl ₂)	1 µl
dH ₂ O	2 µl
TOPO vektörü pCR4-TOPO TA	1 µl
Toplam	6 µl



Şekil 3.6.1.1: *G. rarilineata* aktininin klonlanması için *E. coli* transformasyonu yapılan plazmid vektör pCR4-TOPO'nun replikasyon başlangıç noktasını (pUC ori), promotor bölgesini (P_{lac}) ve belirteç genlerini (ampisilin, kanamisin, LacZα-ccdB) gösteren harita. İnsersiyon bölgesi ve dizilemede kullanılan primerlerin bağlandığı bölgeler ile restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri (Spe I, Pst I, Pme I, EcoR I, Not I) dizi üzerinde işaretlidir.

3.6.2. Transformasyon

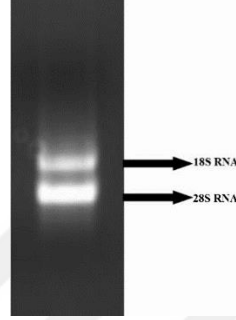
Transformasyon öncesinde, 1,5 ml'lik steril tüpler içinde 50'şer µl olacak şekilde önceden hazırlanıp -80°C'de saklanan *E. coli* hücreleri buz içinde çözündürüldü. Hücrelere, PZR ürünü yüklü vektörün bulunduğu çözeltiden, son konsantrasyonu 100 ng/µl olacak şekilde 2 µl eklendi. Negatif kontrol olarak, hücre barındırmayan başka bir tüpe 1000 ng vektör ve 20 µl dH₂O eklendi. İki tüp de önce buz içinde 30 dakika, ardından 42°C'ye ısıtılmış su banyosunda 30 saniye bekletilerek ısı şokuna uğratıldı. Hemen ardından hücreler buzun içine aktarılıp 2-3 dakika bekletildi. Ardından hücreler 50 mg/µl ampisilin içeren 0,5 ml Luria-Bertani (LB) besiyerine ekildi. Besiyerine ekilen hücreler 37°C'de 200 rpm'de 1 saat çalkalandı.

Çalkalama sonrasında 10-50 µl arasında değişen hacimlerde hücreler, 20 µl LB besiyeri ile birlikte, ampisilin (50 µg/ml) içeren ve hücre ekimi öncesinde oda sıcaklığına getirilmiş 5 ayrı katı besi yerine ekildi. Başka bir besi yerine hücre içermeyen negatif kontrol bileşimi yayıldı. Örnekler ve negatif kontrol petrileri bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

4. BULGULAR

4.1. *Gibbula rarilineata*'DAN ELDE EDİLEN TOTAL RNA

Qiagen RNeasy Kit kullanılarak izole edilen total RNA %1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1.1) ve konsantrasyonu Nanodrop'ta 424,0 µg/ml olarak ölçüldü.

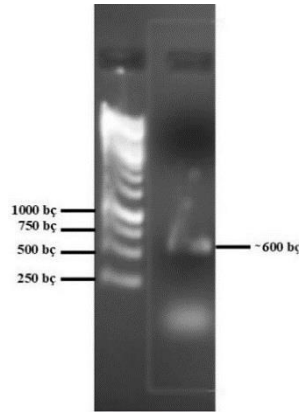


Şekil 4.1.1: *G. rarilineata*'dan izole edilen RNA'nın jel görüntüsü.

4.2. *Gibbula rarilineata* AKTİNİNDEN ÇOĞALTILAN PZR ÜRÜNLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.2.1. Tasarlanan Primerlerle Seçilen Bölgeden Çoğaltılan PZR Ürünü

Sentezinde kullanılan Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit'e ait bileşenleri ve sentezinin gerçekleştirildiği koşullar Tablo 3.3.1'de belirtilen ilk zincir cDNA'nın PZR ile çoğaltımı Acfw ve Acrv primerleriyle gerçekleştirildi. Çoğaltılan ürünün jel görüntüsü Şekil 4.2.1.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2.1.1: Acfw ve Acrv primerleri kullanılarak çoğaltılan aktin bölgesine ait jel görüntüsü.

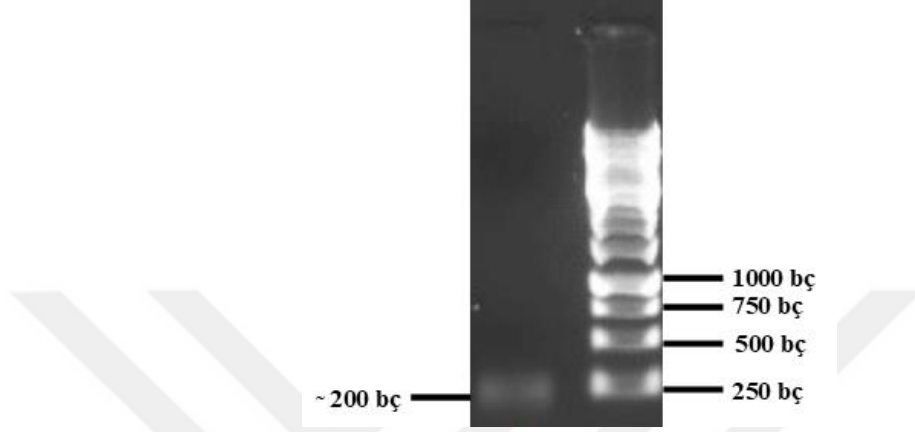
PZR sonrasında yaklaşık 600 bç uzunluğunda bir bölgenin çoğaltıldığı görüldü. PZR ürünün konsantrasyonu Nanodrop ile 264,6 ng/μl olarak ölçüldü. PZR’de kullanılan primerler 10’ar μM konsantrasyonda hazırlanarak dizilenecek örneklerle birlikte Sentegen Biyoteknoloji’ye gönderildi. Dizileme yöntemi olarak Sanger dizileme seçildi ve gönderilen forward ve reverse primerlerle çift yönlü dizileme talep edildi.

Firmanın gönderdiği dizi sonuçları BioEdit Sequence Alignment Editor’da değerlendirildi. Dizi bilgisiyle birlikte gönderilen kromatogramda nükleotid okumalarına ait piklerin yeterince yüksek olmadığı, arka plan gürültüsü yüksek olan başlangıç ve bitiş bölgelerindeki bazlara ait okumalar çalışmada kullanılmadı. Bu değerlendirme iki yöndeki okumalar karşılaştırılarak yapıldı. BioEdit Sequence Alignment Editor’da önce bu dizi bölgeleri kırpıldı, ardından diziler birbirine hizalandı. İki yöndeki okumanın kromatogram verileri karşılaştırılarak, ham verilerden daha güvenilir dizi sonuçlarına ulaşmak hedeflendi. Elde edilen konsensüs dizisi, doğru genin çoğaltıldığından emin olmak için, sisteme yüklenen dizi bilgisini veri tabanındaki diğer canlıların nükleotid dizileriyle karşılaştırıp hizalayan çevrimiçi biyoinformatik yazılımı BLAST ile değerlendirildi. Sisteme yüklenen verinin, özellikle mollusk aktinleriyle yüksek oranda eşleştiği görüldü.

4.2.2. 5’ RACE PZR ile Elde Edilen Ürün

G. rarilineata aktininin bölgesel dizi verisi elde edildikten sonra, GeneRacer Kit’e ait GeneRacer 5’ Primer ile çalışabilecek reverse primerler, *in silico*, *G. rarilineata*’nın bölgesel aktin nükleotid dizisi üzerinden tasarlandı. Tasarlanan bu primerler ile genin çoğaltımı sağlanamadı. Bu sebeple farklı bir strateji benimsenerek, *G. rarilineata* aktinin bölgesel dizisinin BLAST ile karşılaştırmasında en fazla dizi benzerliği olduğu görülen organizmaların aktin nükleotid dizileri üzerinden, 5’ uç bölgesinde kısa ürünler çoğaltacak iki reverse primer (5Rv351 ve 5 Rv247, Tablo 3.4.1) tasarlandı. İlki daha uzun bir bölgeyi çoğaltacağı öngörülen primerin çoğalttığı PZR ürünü, ikinci PZR basamağında kalıp olarak kullanıldı. Tasarlanan ikinci primer ile gerçekleştirilen PZR sonrasında yaklaşık 200 bç’lik bir ürün elde edildi (Şekil 4.2.2.1). Ürünün konsantrasyonu Nanodrop’ta 24,9 ng/μl olarak ölçüldü. Klonlama ve dizileme basamakları için ürünün konsantrasyonu PZR ürünü üzerinden PZR, DNA çöktürme ve jelden geri kazanımla yükseltilmeye çalışıldı, ancak anlamlı bir artış sağlanamadı.

5' bölgesine ait PZR ürününün pCR4-TOPO vektörüne aktarımıyla *E. coli* transformasyonu sonrasında hücre ekimi yapılan besiyerlerinde üreme görülmedi. 5' PZR ürünü klonlama yapılmadan dizilendi ve başlangıç kodonundan (ATG) itibaren 200 bç uzunluğunda bir bölgenin dizi bilgisi elde edildi.



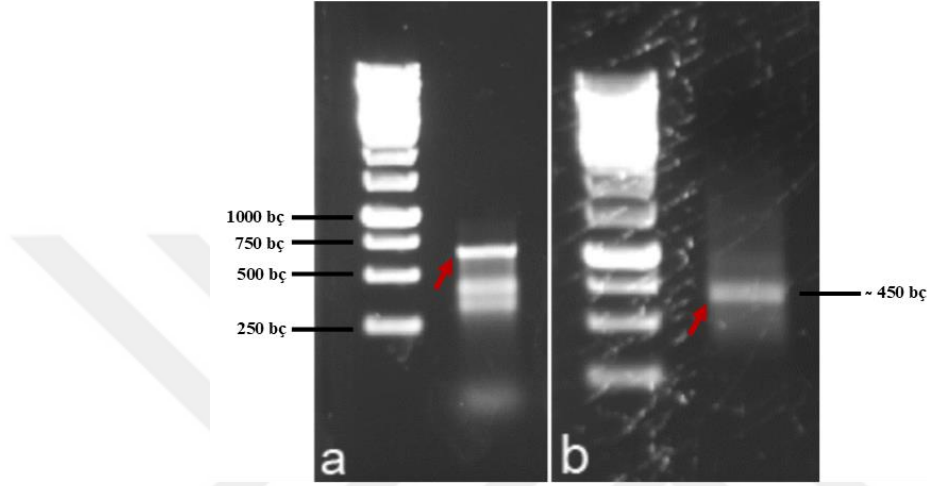
Şekil 4.2.2.1: 5' ucundan çoğaltılan aktin bölgesine ait jel görüntüsü.

4.2.3. 3' RACE PZR ile Elde Edilen Ürün

3' RACE PZR için *G. rarilineata* aktininden elde edilen bölgesel nükleotid dizisi üzerinden, birbiriyle 11 bazlık örtüşme gösteren iki forward primer (GrAcSqFw, 3Nstd, Tablo 3.4.1) tasarlandı. cDNA'nın sentezinde kullanılan GeneRacer Oligo (dT) Primer'in bağlanma bölgesi sağladığı GeneRacer 3' Primer, reverse primer olarak kullanıldı. GrAcSqFw ile çoğaltılan PZR ürünün jel elektroforezi sonrasında yapılan görüntülemeye, jelde birden fazla bant bulunduğu tespit edildi (Şekil 4.3.2.1a). Bu spesifik olmayan bantların giderilmesi için tasarlanan ikinci primerle ilk PZR ürünü kalıp olarak kullanılarak, ikinci bir PZR gerçekleştirildi. Dizisi birbiriyle örtüşen primerlerle tekrarlı basamaklarda gerçekleştirilen Nested PZR yöntemi sonrasında, jel görüntüsünde yaklaşık 450 bç'lik tek bir keskin bant tespit edildi (Şekil 4.3.2.1b). Düşük konsantrasyonlu spesifik olmayan ürünlerin olası kontaminasyonundan arındırılması için, çoğaltılan hedef ürünün, transformasyon öncesinde, jelden geri kazanım yöntemiyle saflaştırılması gerçekleştirildi.

PZR ürünlerinin pCR4-TOPO vektörüne aktarılması reaksiyonu sonrasında *E. coli* transformasyonu, yukarıda belirtildiği gibi yapıldı ve hücrelerin katı besiyerlerine ekimi gerçekleştirildi. 37°C'de etüvde 24 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerlerinde üreyen koloniler arasından seçilenler, plazmid izolasyonu ve koloni PZR için kullanıldı. Plazmid

izolasyonu ile üreyen hücrelerde plazmidin varlığı teyit edildi. Plazmide aktarılan PZR ürünü, bu kez plazmid üzerindeki primerlerle çoğaltıldığından, koloni PZR ürününün jel görüntüsünde, beklendiği gibi, yaklaşık 200 bç daha uzun bir ürün bandı görüldü. Plazmid konsantrasyonu 500 ng/μl olarak ölçüldü. İzole plazmid, ilgili bölgenin dizilenmesi için üreticinin sağladığı primerlerle dizilendi.



Şekil 4.2.3.1: 3' ucundan GrAcSqFw primeri ile çoğaltılan ilk PZR ürünü (a), 3Nstd primeri kullanılarak Nested PZR ile çoğaltılan spesifik PZR ürünü (b).

4.3. *Gibbula rarilineata* 'NİN AKTİN NÜKLEOTİD DİZİSİ

G. rarilineata aktininin 5' ucu bölgesinden çoğaltılan 200 bç'lik ürünün okumaları yüksek oranda arka plan gürültüsü içerdiğinden, ileri analizlerde yalnızca 42 bazlık bir alan kullanıldı. Bu alan başlangıç kodonu ATG'yi içermektedir. Aktinin 5' ucundan elde edilen bölgenin nükleotid ve amino asit dizisi Şekil 4.3.1'de gösterilmiştir.

atg	gat	gag	gat	gtt	gca	gct	ttg	gtc	agt	gac	aac	ggc	tcc
M	D	E	D	V	A	A	L	V	S	D	N	G	S

Şekil 4.3.1: 5' ucundan elde edilen bölgenin nükleotid ve amino asit dizisi.

Klonlanmış ürünün tam boyutlu olarak dizi bilgisi sağlandı. Dizileme sonrasında, cDNA sentezi sırasında GeneRacer 3' Primerin bağlanması için eklenen adaptörün yanlış bir bölgeye bağlandığı ve 3' ucu bölgesinin tamamen çoğaltılamadığı görüldü. Diğer organizmaların aktinleriyle karşılaştırıldığında, *G. rarilineata*'nın 3' ucunda 16 amino asit dizisinin eksik kaldığı görülmektedir.

cctca gta ccc atc gag cac ggc atc gtc acc aac tgg gat gat atg gag aag atc tgg cat
S V P I E H G I V T N W D D M E K I W H
cac acc ttc tac aac gag ctc cgt gtg gcc cca gag gaa cac ccc gtc ctc ctg aca gag
H T F Y N E L R V A P E E H P V L L T E
gct ccc ctc aac ccc aag gct aac cgt gaa aag atg acc cag atc atg ttc gag acc ttc
A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F
aac tct ccc gct atg tat gtg gcc atc cag gct gtt ctc tcc ctc tac gcc tct ggt cgt
N S P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R
acc acc ggt gtc gtt ctc gac tct ggt gat ggt gtc acc cac aat gtc ccc atc tat gaa
T T G V V L D S G D G V T H N V P I Y E
ggt tat gct ctt ccc cac gcc atc atg agg ttg gat ctt gcc gga cgt gac ctc act gat
G Y A L P H A I M R L D L A G R D L T D
tac ctc atg aag atc ctc aca gag cgt ggt tac tcc ttc acc acc aca gct gag aga gaa
Y L M K I L T E R G Y S F T T T A E R E
atc gtc aga gac atc aag gag aaa ctc tat tac gtt gcc ctc gac ttt gag cag gaa atg
I V R D I K E K L Y Y V A L D F E Q E M
caa act gct gct tca tct tcc tcc ctg gag aag agc tat gag ctt ccc gac ggt caa gtc
Q T A A S S S S L E K S Y E L P D G Q V
atc acc att ggc aac gag agg ttc agg tgt cca gag gct atg ttc cag ccg tcc ttc ctt
I T I G N E R F R C P E A M F Q P S F L
ggt atg gaa tca gct ggc atc cat gaa aca aca tac aac tcc atc atg aag tgt gat gtt
G M E S A G I H E T T Y N S I M K C D V
gat atc cgt aaa gac ttg tat gcc aac act gtg ttg tca gga ggt acc acc atg ttc ccc
D I R K D L Y A N T V L S G G T T M F P
ggt atc gct gac agg atg cag aag gaa atc aca aac ttg gca cca gca aca atg aag atc
G I A D R M Q K E I T N L A P A T M K I
aag gtc att gct ccc cca gag agg aaa tac tct gtc tgg atc ggt ggt tcc atc ttg gct
K V I A P P E R K Y S V W I G G S I L A
tct ctg tcc acc ttc caa cag atg tgg atc agc aaa
S L S T F Q Q M W I S K

Şekil 4.3.2: Veri bankasından elde edilmiş bölgesel aktin dizisi (koyu gri) ile klonlanan bölgenin (açık gri) konsensüs dizisi (örtüşen bölge sarı ile işaretlenmiştir). Nükleotid dizisi ve kodonların karşılığı olan amino asit dizisi birlikte verilmiştir.

4.3.1. *Gibbula rarilineata* Aktininin Diğer Aktinlerle Hizalanması

G. rarilineata aktini veri bankalarında amino asit dizisi tam boyutlu olarak bulunan gastropod sitoplazmik (*Pomacea canaliculata*, *Rapana venosa*, *Cepaea nemoralis*, *Littorina littorea*, *Lymnaea stagnalis*, *Aplysia californica*, *Biomphalaria glabrata*, *Haliotis tuberculata*, *H. discus hannai*, *H. diversicolor supertexta*, *H. diversicolor*, *H. iris*) ve kas tipi aktinler (*P. canaliculata*, *A. californica*) ile bivalve kas tipi aktinleri (*Mytilus galloprovincialis*, *Crassostrea virginica*, *C. gigas*, *Mizuhopecten yessoensis*) seçilerek CLUSTAL W kullanılarak hizalandı. İnsana ait 4 kas tipi ve 2 sitoplazmik aktin dizisi, diagnostik amino asit pozisyonlarına göre, *G. rarilineata* aktininin sınıflandırılmasında kullanılmak üzere hizalamaya eklendi ((Tablo 4.3.1.1, 4.3.1.2).

Tablo 4.3.1.1: Aktinlerin sınıflandırmasında insan aktin izoformlarında diagnostik olarak kullanılan amino asitler ve pozisyonları ile *G. rarilineata*'nın belirlenen aktin amino asit dizi pozisyonlarının karşılaştırması.

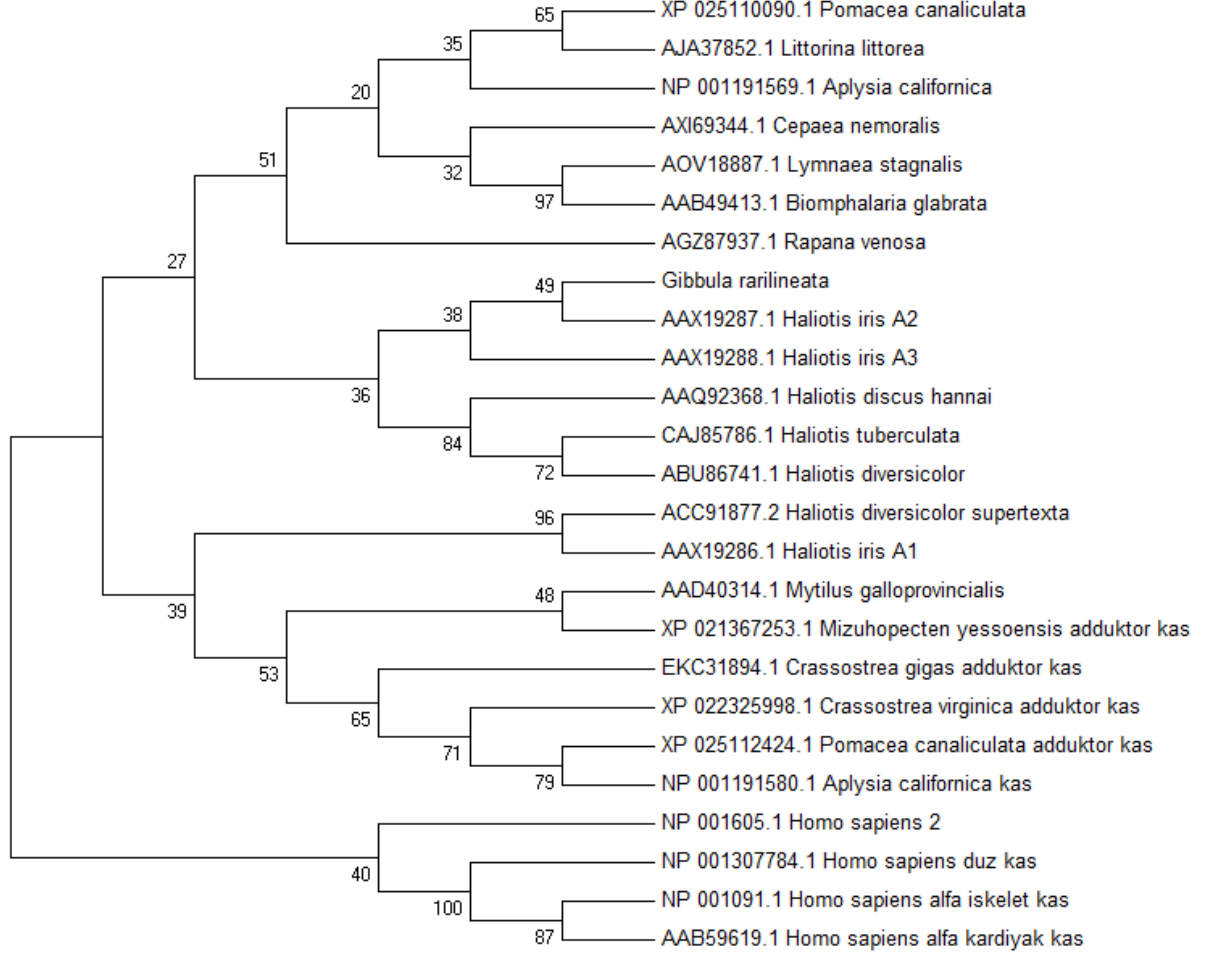
Diagnostik amino asit pozisyonu	<i>Homo sapiens</i> (Sitoplazmik, Kas tipi)	<i>G. rarilineata</i>
6	I, T	V
10	V&I, C	?
16	M, L	?
17	C, C&V	?
76	V, I	V
103	V, T	V
162	T, N	N
176	L, M	M
201	T, V	T
225	Q, N	Q
260	A, T	A
267	L, I	L
287	V, I	V
297	T, N	T
365	S, A	?
153	L, M	M
272	C, A	A
279	Y, F	F
5	I, S&T	A
129	T, V	S

Tablo 4.3.1.2 (devam): *G. rarilineata* aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. *G. rarilineata*'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.

KMTQIMFETF	NSPAMYVAIQ	AVLSLYASGR	TTGVVLDSDG	GVTHNVPIYE	GYALPHAIMR
.	T	.	I.M	.	L
.	T	.	I.M	.	L
.	V	.	I	.	.
.	V	.	I	.	.
.	V	.	I	.	.
.	V	.	I	.	.
.	A	.	I	T	LC
.	A	.	I	T	L
.	A	.	I	T	L
.	A	.	I	T	L
.	A	.	I	T	L
.	.	.	I	T	.
.	T	.	I	T	.
.	.	.	I	T	.
.	T	.	I	T	.
.	T	.	I	T	.
.	T	.	I.M	T	.
.	A	.	I	T	L
.	.	.	I	T	.
.	.	.	I	T	.
.	.	.	I	T	.
.	.	.	I	T	.
.	.	.	I	T	L
.	.	.	I	S.T	.
.	.	.	I	T	.
LDLAGRDLTD	YLMKILTERG	YSFTTTAERE	IVRDIKEKLY	YVALDFEQEM	QTAASSSSLE
.	.	.	C	.	A
.	.	.	C	.	A
.	.	V	C	N	A
.	.	V	C	N	A
.	.	V	C	N	A
.	.	V	C	N	A
S	NW	.	C	.	S
.	.	.	C	.	A
.	.	.	C	.	A
.	.	.	C	N	S.A
.	.	.	C	.	.
.	.	.	C	.	A.T
.	.	.	C	.	.
.	.	.	C	.	ST
.	.	.	C	D	.
.	.	.	C	.	ST
.	S	.	C	.	A
.	.	.	A	.	A
.	.	.	D	.	A
.	.	.	C	.	S
.	.	.	A	.	.
.	M	.	A	.	.
.	.	.	A	I	.
.	.	.	C	.	S

Tablo 4.3.1.2 (devam): *G. rarilineata* aktininin gastropoda aktinleri ile hizalanması. *G. rarilineata*'nın dizilenemeyen bölgeleri soru işareti (?) ve hizalama boşlukları tire (-) olarak gösterilmiştir. Varyasyon gösteren bölgelerin amino asitleri belirtilmiş, referans dizi ile aynı olan bölgeler nokta (.) şeklinde verilmiştir.

KSYELPDGQV	ITIGNERFRC	PEAMFQPSFL	GMESAGIHET	TYNSIMKCDV	DIRKDLANT
.....		...L.....	...C.....	.F.....	
.....		...L.....	...C.....	.F.....	
.....		..TL.....I		I	N
.....		..TL.....I		I	N
.....		..TL.....I		I	N
.....		..TL.....I		I	N
.....		..SL.....			
.....		..SL.....			
.....		..SL.....			
.....		..SL.....			
.....					
.....			V.....		
.....		...L.....	V.....		I
.....		...E.....			
.....			V.....	.F.....	
.....		...T.....	...VV.....		
.....		..SL...IL			
.....		...L.....	...A.....		
.....		...L.....			
.....		..SL.....			
.....		...L.....	...A.....		
.....		...L.....			
.....		...L.....			
.....		..SL.....			
VLSGGTTMFP	GIADRMQKEI	TNLA PATMKI	KVIAPPERKY	SVWIGGSILA	SLSTFQQMWI
.....Y.		.A...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...	.I.....		
.M.....Y.		.A...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...	.I.....		
.....		.A...S...	.I.....		
.....		.S...S...	.I.....		
.....		.A...S...	.I.....		
.....		.A...S...	.I.....		
.....		.A...S...	.I.....		
.....S...Y.		SA...P...	.I.....		
.....S...Y.		AA.....	.I.....		
.....S...		SA.....	.I.....		
.....S...Y.		SA...P...	.I.....		
.....S...		.A...P...	.I.....		
.....S...		VA...P...	.I.....		
.....S...		.A...P...	.I.....		
.....		.S...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...			
.....Y.		.A...S...			
.....		.A...S...	.I.....		
.....Y.		.A...S...			
.....		.A.....	.I.....		
.....		.A.....	.I.....		
.....		.A...S...	.I.....		



Şekil 4.4.1: İnsan aktin izoformları dış grup olarak kullanılan sitoplazmik ve kas tipi aktinlerin ayrışmasını gösteren filogenetik ağaç.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmada *G. rarilineata*'nın aktin geninin klonlanıp dizilenerek filogenetik analizlerinin yapılması, böylece aktinlerin özellikle omurgasızlardaki sınıflandırmasında ileriki çalışmalar için veri katkısı sağlanması hedeflenmiştir. Buna yönelik olarak yapılan RNA izolasyonu, PZR ve dizilemeler sonucunda *G. rarilineata* aktininin 5'ucu bölgesinde başlangıç kodonundan itibaren 42 bç uzunluğunda bölgenin dizi bilgisi sağlandı. 3'ucu bölgesinde ise 600 bazlık bir bölge dizilendi, ancak genin açık okuma çerçevesini sonlandıran bölgenin dizisi elde edilemedi. Elde edilen dizi, daha önce *G. rarilineata* aktinininden başka araştırmacıların elde ettiği bölgesel diziyle hizalanarak 900 bazlık bir konsensüs dizisi oluşturuldu. Filogenetik analizlerde bu bölgelerden elde edilen amino asit dizisi kullanıldı.

Aktinler, çok sayıdaki önemli biyolojik rolleri sebebiyle en fazla çalışılmış proteinlerdendir (Bryant ve diğ., 2006; Ma ve diğ., 2007; Perrin ve Ervasti, 2010). Özellikle omurgalı aktinlerinin yapısal, işlevsel ve moleküler yönden incelendiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Aktinlerin bu biyolojik rollerini, farklı taksonomik gruplardaki canlılarda bulunan değişken sayıdaki birbirinden ayrı rolleri üstlenen izoformlarıyla gerçekleştirdiği düşünülmektedir (Perrin ve Ervasti, 2010; Simiczyjew ve diğ., 2017). Aktin izoformları aktin multigen ailesini oluşturur ve omurgalılarda bulunduğu dokuya göre sitoplazmik ve kas tipi olarak sınıflandırılır. Ayrıca izoelektrik noktalarına göre α , β ve γ sınıflandırması yapılır (Wang ve diğ., 2008). Omurgasız aktinleriyle yapılan çalışmalar ise kısıtlı sayıdadır ve omurgasızların aktinleri için genel kabul gören bir sınıflandırma mevcut değildir. Yapılan çalışmalar omurgasız aktinlerinin, omurgalıların hem sitoplazmik hem de kas tipi aktinlerine benzerlik gösterdiğini öne sürmektedir. Bunun yanında Arthropoda aktinleriyle yapılan çalışmalar, Arthropoda kas aktinlerinin, atasal sitoplazmik aktinlerden ayrışma zamanının omurgalı kas aktinleriyle aynı olmadığını öne sürmüştür (Mounier ve diğ., 1992). Böylece omurgasız aktinlerinin farklı hikâyelere sahip olabileceği görülmektedir. Aktinlerin tek hücrelilerden insana kadar çok yüksek korunmuşluk gösteren ve kökeni çok eski bir molekül olduğu göz önünde bulundurulduğunda, aktinlerin farklı taksonomik gruplardaki hikâyelerinin, hücresel evrimle ilgili öngörü sağlama potansiyeli söz konusu olmaktadır (Erickson 2007; Stoddard ve diğ., 2017). Aktin multigen ailesinin üyelerinin sınıflandırılması da bu noktada önemli hale gelmektedir.

Omurgasız aktinleri için genel kabul gören bir sınıflandırma olmamakla birlikte, omurgasız aktinlerinin, omurgalıların sitoplazmik aktinlerine benzerliği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir. Buna bağlı olarak omurgasız aktinleri, omurgalıların sınıflandırması yapılmış aktinleriyle karşılaştırılarak kategorize edilmektedir. İnsanda bulunan 6 aktin izoformundaki 20 amino asit, bu kategorizasyonda diagnostik olarak kullanılmaktadır (Ivanov ve diğ., 2015). Çalışmamızda *G. rarilineata* aktini, insan sitoplazmik aktin izoformlarındaki diagnostik amino asitlerle 8 amino asidinin, kas tipi amino asit dizilerindeki diagnostik amino asitlerle ise 4 pozisyonda eşleştiği görüldü. 10., 16., 17. ve 365. pozisyonundaki amino asitler, çalışmada bu pozisyonlara denk düşen bölgelerin dizilenememesine bağlı olarak değerlendirilemedi. 5. ve 129. pozisyonundaki amino asitlerin, Ivanov ve diğ (2015)'nin mollusklar genelinde belirttiği üzere gastropodlar özelinde de çeşitlilik gösterdiği görüldü. *G. rarilineata* aktininde dizileme yapılamamış bölgelerin bulunması sebebiyle değerlendirilememiş amino asit pozisyonları bulunmasına rağmen, karşılaştırılmış pozisyonlarda insan sitoplazmik aktinleriyle görülen benzerlik sebebiyle, çalışmada elde edilen *G. rarilineata* aktini sitoplazmik aktin olarak değerlendirildi. (*G. rarilineata* insan aktin izoformlarıyla karşılaştırılmasında kullanılan diagnostik amino asitler ve pozisyonları Tablo 4.4.1.2'de verilmiştir).

G. rarilineata'nın sitoplazmik ve kas tipi aktinlerle ilişkisi filogenetik analizlerle de değerlendirildi. Veri setinde, veri bankalarında aktin amino asit dizisi tam boyutlu olarak mevcut bulunan türlere ait amino asit dizileri kullanıldı. Sitoplazmik aktinlerden yalnızca gastropodlara ait diziler seçilirken, kas tipi aktinler için gastropodlarda yeterli dizi bilgisi bulunmadığından, bivalve grubundan canlılara ait kas tipi aktin amino asit dizileri veri setine eklendi. İnsan aktin izoformları, omurgasız aktinlerinin kategorizasyonunda kullanıldığından, filogenetik analizde sitoplazmik ve kas tipi aktinler arası çözümleme için, dış grup olarak, insan kas tipi ve sitoplazmik aktinler birlikte kullanıldı. Filogenetik ağaçta iki ana klad olduğu ve bu iki ayrı kladda sitoplazmik ve kas tipi aktin dizilerinin kümелendiği görüldü. *G. rarilineata* aktininin ise sitoplazmik aktinlerle kümелendiği görüldü.

Çalışmada *G. rarilineata* aktini insan aktinleriyle karşılaştırıldığında sitoplazmik aktinlere benzerlik göstermiş ve filogenetik analizde sitoplazmik aktinlerle kümelenmiş olmakla birlikte, tam boyutlu olarak elde edilemediğinden kesin kategorizasyonu mümkün değildir. Nükleotid dizilemelerinde, dizilemesi yapılan ürünlerin özellikle uç bölgelerindeki okumalar, çoğunlukla, veri olarak kullanılabilecek güvenilirlikte değildir. Bu sebeple genlerin tam boyutlu

dizilemeleri yapılırken, 5' ve 3' uçlarının çoğaltımı ve dizilenmesi daha zor hale gelmektedir. 3' bölgenin çoğaltımı için kullanılan oligo (dT) ve 5' bölge için kullanılan çeşitli adaptörler, dizileme sırasında kaybedilecek veriyi telafi edebilecek uzunlukta olmadığından, özellikle bu bölgelerden daha güvenilir okumalara ihtiyaç duyulduğunda, ilgili bölgelerin dizileme öncesinde klonlanması bir gereklilik haline gelmektedir. Çalışmamızda aktinlerde en fazla çeşitlilik görülen N-terminal bölgesi kısmen dizilenmiş olmakla birlikte, dizilenen bölgenin eksik kalan 66. amino asit pozisyonuna kadar tamamlanması, barındırdığı 3 diagnostik amino asit pozisyonunun değerlendirilebilmesi yönünden önemlidir. 3' ucunda bulunan bölge daha az çeşitlilik göstermekle birlikte tam boyutlu amino asit dizisinin eldesi için ek çalışmalar gereklidir.



KAYNAKLAR

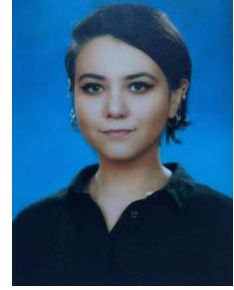
- Adema, C.M., 2002, Comparative study of cytoplasmic actin DNA sequences from six species of Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora), *Journal of Molluscan Studies*, 68 (1), 17-23.
- Affenzeller, S., Haar, N., Steiner, G., 2017, Revision of the genus complex *Gibbula*: an integrative approach to delineating the Eastern Mediterranean genera *Gibbula* Risso, 1826, *Steromphala* Gray, 1847, and *Phorcus* Risso, 1826 using DNA-barcoding and geometric morphometrics (Vetigastropoda, Trochoidea), *Organisms Diversity & Evolution*, 17 (4), 789-812.
- Bajusz, C., Borkuti, P., Kristo, I., Kovacs, Z., Abonyi, C., Vilmos, P., 2018, Nuclear actin: ancient clue to evolution in eukaryotes?, *Histochemistry and Cell Biology*, 150 (3), 235-244.
- Barco, A., Evans, J., Schembri, P.J., Taviani, M., Oliverio, M., 2013, Testing the applicability of DNA barcoding for Mediterranean species of top-shells (Gastropoda, Trochidae, *Gibbula* sl), *Marine Biology Research*, 9 (8), 785-793.
- Bieler, R., 1992,. Gastropod phylogeny and systematics, *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23 (1), 311-338.
- Bhattacharya, D., Ehling, J., 1995, Actin coding regions: gene family evolution and use as a phylogenetic marker, *Archiv für Protistenkunde*, 145 (3-4), 155-164.
- Brown, K.M., Lydeard, C., 2010, *Mollusca: Gastropoda*, Ecology and classification of North American freshwater invertebrates, In: Thorp, J.H., Covich, A.P. (ed.), Chapter 10, Academic Press, Elsevier, San Diego, USA, ISBN: 978-0-12-374855-3, 277-306.
- Bryant, M.J., Flint, H.J., Sin, F.Y., 2006, Isolation, characterization, and expression analysis of three actin genes in the New Zealand black-footed abalone, *Haliotis iris*. *Marine Biotechnology*, 8 (2), 110-119.
- Bryant, M.J., 2004, Isolation, characterisation and molecular evolution of the actin gene family of the New Zealand black-footed abalone, *Haliotis iris*.
- Carlini, D.B., Reece, K.S., Graves, J.E., 2000, Actin gene family evolution and the phylogeny of coleoid cephalopods (Mollusca: Cephalopoda), *Molecular Biology and Evolution*, 17 (9), 1353-1370.
- Daniel, H.M., Sorrell, T.C., Meyer, W., 2001, Partial sequence analysis of the actin gene and its potential for studying the phylogeny of *Candida* species and their teleomorphs, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (4), 1593-1606.
- Delicado, D., Ramos, M.A., 2012, Morphological and molecular evidence for cryptic species of springsnails [genus *Pseudamnicola* (*Corrosella*) (Mollusca, Caenogastropoda, Hydrobiidae)], *ZooKeys*, (190), 55-79.

- Erickson, H.P., 2007, Evolution of the cytoskeleton, *Bioessays*, 29 (7), 668-677.
- Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., Robinson, R.C., 2015, The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments, *Journal of Cell Science*, 128 (11), 2009-2019.
- Hawkins, S.J., Watson, D.C., Hill, A.S., Harding, S.P., Kyriakides, M.A., Hutchinson, S., Norton, T.A., 1989, A comparison of feeding mechanisms in microphagous, herbivorous, intertidal, prosobranchs in relation to resource partitioning, *Journal of Molluscan Studies*, 55 (2), 151-165.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., Dewaard, J.R., 2003, Biological identifications through DNA barcodes, *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, biological sciences*, 270 (1512), 313-321.
- Hightower, R.C., Meagher, R.B., 1986, The molecular evolution of actin, *Genetics*, 114 (1), 315-332.
- Ivanov, M., Todorvska, E., Radkova, M., Georgiev, O., Dolashki, A., Dolashka, P., 2015, Molecular cloning, characterization and phylogenetic analysis of actin gene from the marine mollusk *Rapana venosa* (class *Gastropoda*), *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4, 687-700.
- Kano, Y., 2008, Vetigastropod phylogeny and a new concept of Seguenzioidea: independent evolution of copulatory organs in the deep-sea habitats, *Zoologica Scripta*, 37 (1), 1-21.
- Kovilur, S., Jacobson, J.W., Beach, R.L., Jeffery, W.R., Tomlinson, C.R., 1993, Evolution of the chordate muscle actin gene, *Journal of Molecular Evolution*, 36 (4), 361-368.
- Ma, H., Mai, K., Liufu, Z., Xu, W., 2007, Cloning and characterization of an actin gene of *Chlamys farreri* and the phylogenetic analysis of mollusk actins, *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 25(3), 304-309.
- Ma, H., Xu, W., Mai, K., Liufu, Z., Chen, H., 2004, Cloning and characterization of an abalone (*Haliotis discus hannai*) actin gene, *Journal of Ocean University of China*, 3 (2), 145-149.
- Mounier, N., Gouy, M., Mouchiroud, D., Prudhomme, J.C., 1992, Insect muscle actins differ distinctly from invertebrate and vertebrate cytoplasmic actins, *Journal of Molecular Evolution*, 34 (5), 406-415.
- Patwardhan, A., Ray, S., Roy, A., 2014, Molecular markers in phylogenetic studies-a review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 2 (2), 1-9.
- Perrin, B.J., Ervasti, J.M., 2010, The actin gene family: function follows isoform, *Cytoskeleton*, 67 (10), 630-634.
- Simiczjew, A., Pietraszek-Gremplewicz, K., Mazur, A.J., Nowak, D., 2017, Are non-muscle actin isoforms functionally equivalent?, *Histology and Histopathology*, 32 (11), 1125-1139.

- Sin, F.Y., Bryant, M.J., Johnstone, A., 2007, Molecular evolution and phylogeny of actin genes in *Haliotis species* (Mollusca: Gastropoda), *Zoological Studies*, 46 (6), 734.
- Stoddard, P.R., Williams, T.A., Garner, E., Baum, B., 2017, Evolution of polymer formation within the actin superfamily, *Molecular Biology of the Cell*, 28 (19), 2461-2469.
- Uribe, J.E., Williams, S.T., Templado, J., Buge, B., Zardoya, R., 2017, Phylogenetic relationships of Mediterranean and North-East Atlantic Cantharidinae and notes on Stomatellinae (Vetigastropoda: Trochidae), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 64-79.
- Vandekerckhove, J., Weber, K., 1984, Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins: the evolution of the different vertebrate muscle actins, *Journal of Molecular Biology*, 179 (3), 391-413.
- Vedula P., Kashina, A., 2018, The makings of the ‘actin code’: regulation of actin’s biological function at the amino acid and nucleotide level, *Journal of Cell Science*, 8;131 (9).
- Wahlberg, M.H., Johnson, M.S., 1997, Isolation and characterization of five actin cDNAs from the cestode *Diphyllbothrium dendriticum*: a phylogenetic study of the multigene family, *Journal of Molecular Evolution*, 44 (2), 159-168.
- Wang, Z., Wu, Z., Jian, J., Lu, Y., 2008, Cloning and expression of an actin gene in the haemocytes of pearl oyster (*Pinctada fucata*, Gould 1850), *Marine Genomics*, 1 (2), 63-67.
- Wanninger, A., Wollesen, T., 2019, The evolution of molluscs, *Biological Reviews*, 94 (1), 102-115.
- White, M.E., Crother, B.I., 2000, Gene conversions may obscure actin gene family relationships, *Journal of Molecular Evolution*, 50 (2), 170-174.
- Williams, S.T., 2012, Advances in molecular systematics of the vetigastropod superfamily Trochoidea, *Zoologica Scripta*, 41 (6), 571-595.
- Williams, S.T., Donald, K.M., Spencer, H.G., Nakano, T., 2010, Molecular systematics of the marine gastropod families Trochidae and Calliostomatidae (Mollusca: Superfamily Trochoidea), *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54 (3), 783-809.
- Williams, S.T., Karube, S., Ozawa, T., 2008, Molecular systematics of Vetigastropoda: Trochidae, turbinidae and trochoidea redefined, *Zoologica Scripta*, 37 (5), 483-506.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Şeyma EREN
Doğum Yeri	Fatih
Doğum Tarihi	27.05.1990
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	536 396 86 35
E-Posta Adresi	seymaeren.iu@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	01.06.2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Zooloji Programı