



**REKOMBİNANT *Chlamydomonas reinhardtii* SUŞLARI  
KULLANILARAK ISI ŞOKU YANITINA BAZI FİZİKSEL VE  
KİMYASAL PARAMETRELERİN ETKİSİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Tuba SEVGİ**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**REKOMBİNANT *Chlamydomonas reinhardtii* SUŞLARI KULLANILARAK ISI  
ŞOK YANITINA BAZI FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELERİN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Tuba SEVGİ**

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
(Danışman)

DOKTORA TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2019

## TEZ ONAYI

Tuba SEVGİ tarafından hazırlanan "REKOMBİNANT *C.reinhardtii* SUŞLARI KULLANILARAK ISI ŞOK YANITINA BAZI FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**Başkan** : Prof. Dr. Aysun ERGENE  
Kırkkale Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Prof. Dr. Elif DEMİRKAN  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat  
Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKİLİÇ  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat  
Fakültesi,  
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Gökçe TANER  
Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa  
Bilimleri Fakültesi,  
Biyomühendislik Anabilim Dalı

İmza  


**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Figen ERSOY  
Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İmza  


Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN  
Enstitü Müdürü

.../.../...

**U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;**

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

**beyan ederim.**

**12/07/2019**

**Tuba SEVGİ**

## ÖZET

Doktora Tezi

REKOMBİNANT *Chlamydomonas reinhardtii* SUŞLARI KULLANILARAK ISI ŞOK YANITINA BAZI FİZİKSEL VE KİMYASAL PARAMETRELERİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

**Tuba SEVGİ**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada ısı şok yanıtında etkili olduğu düşünülen çeşitli kimyasal ve fiziksel parametreler moleküler araçlardan faydalanılarak *C.reinhardtii* üzerinde araştırılmıştır. Sürekli ekspresyona sahip 160 adet, ısıyla indüklenebilir ekspresyona sahip 96 adet olmak üzere toplamda 256 adet transformant elde edilmiş ve bu transformantlar ARS aktivitesi bakımında kalitatif ve kantitatif olarak taranmıştır. Çalışmalara seçilen  $\beta$ Tub II-32 ve HSP70A III-1 transformantları ile devam edilmiştir. Fiziksel parametre olarak sıcaklık, ışık şiddeti ve UV-B radyasyonun, kimyasal parametre olarak ise tuzluluğun, kalsiyumun ve kalsiyum şelatlayıcıları ve bloklayıcıların etkisi araştırılmıştır. Sıcaklığın etkisini incelemede hücreler 23 °C'den 35 °C, 37 °C, 40 °C ve 42 °C'ye kaydırılmış ve hücrelerin 35°C' ye dahi çıkarıldığında ısı şok yanıtının indüklendiği görülmüştür. Kalsiyumun 100 mM'ın üstünde ARS aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir. Kalsiyum şelatlayıcıları olan EGTA ve BAPTA varlığında ısı stres yanıtının tetiklendiği gözlenmiştir. 100  $\mu$ M lantan ve 250  $\mu$ M gadolinyumun yükselen ARS aktivitesini düşürmede etkili olduğu saptanmıştır. Ancak verapamilin etki göstermediği belirlenmiştir. 2 000 lux ve üzeri ışık şiddetinin ise ARS aktivitesini arttırdığı saptanmıştır. UV-B uygulamasının ve tuzluluğun ARS aktivitesine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Tüm ARS enzim aktivite sonuçları RT-qPCR sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, paralel sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Rekombinant *C. reinhardtii* ile elde edilen bu veriler bitki stresi ve ekolojik çalışmalar için önem taşıyabilir.

**Anahtar Kelimeler:** *Chlamydomonas reinhardtii*, ısı şok yanıtı, arilsülfataz, HSP70A promotörü,  $\beta_2$ TUB promotörü

**2019, ix + 91 sayfa**

## ABSTRACT

PhD Thesis

INVESTIGATION OF EFFECTS OF SOME PHYSICAL AND CHEMICAL  
PARAMETERS ON THE HEAT SHOCK RESPONSE USING RECOMBINANT  
*Chlamydomonas reinhardtii* STRAINS

**Tuba SEVGİ**

Bursa Uludağ University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Biology

**Supervisor:** Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, various chemical and physical parameters which could be effective in heat shock response were investigated on *C.reinhardtii* by using molecular tools. In total 256 transformants were obtained, among them 160 transformants had continuous expression while 96 of them had heat-inducible expression and these transformants were screened for ARS activity qualitatively and quantitatively. Further studies were performed with selected transformants  $\beta$ Tub II-32 and HSP70A III-1. As physical parameters the effect of temperature, light intensity and UV-B radiation; as chemical parameters salinity, calcium and calcium chelators and blockers were investigated. To investigate the effect of temperature, the cells were shifted from 23 °C to 35 °C, 37 °C, 40 °C and 42 °C. The heat shock response was induced even at 35 °C. It was determined that above 100mM of calcium concentration ARS activity was increased. In the presence of calcium chelators EGTA and BAPTA, heat stress response was triggered. 100 $\mu$ M lanthanum and 250  $\mu$ M gadolinium were found effective in decreasing ARS activity. However, verapamil was not effective. It was found that light intensity of 2 000 lux and above increased ARS activity. UV-B and salinity had no effect on ARS activity. All ARS enzyme activity results were compared with the results of RT-qPCR and partially parallel results were obtained. These data obtained with recombinant *C. reinhardtii* might be important for plant stress and ecological studies.

**Key words:** *Chlamydomonas reinhardtii*, heat shock response, arylsulfatase, HSP70A promoter,  $\beta_2$ TUB promoter

**2019, ix + 91 pages**

## ÖNSÖZ

Engin tecrübe ve bilgi birikimiyle beni yönlendiren, tüm çalışmalarımdaya deneyimlerimden faydalanmamı sağlayan, her konuda ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, mesleki ve manevi açıdan iyi bir bilim insanı olarak yetişmem için emek harcayan çok kıymetli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN'a,

Çalışmamdaya kullandığım suşları ve plasmidleri temin etmemi sağlayan Technische Universität Kaiserslautern, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Sistem Biyolojisi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Michael SCHRODA'ya,

116Z892 nolu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a,

Güleryüzleri, dostlukları ve yardımlarıyla yanımda olan sevgili Dr. Aynur AYBEY, Baran ENES GÜLER, Büşra ÖZALPAR ve Maoulida ABDOU'ya,

Hayatımın her anında yanımda olduğunu hissettirerek bana güven veren, bu süreçte de sonsuz sevgisi ve hoşgörüsü ile her türlü desteğini benden esirgemeyen canım eşime,

Aramızda mesafeler olmasına rağmen hayallerimi gerçekleştirmemde bana her zaman destek olan ve bugüne gelmemde en büyük emeğin sahibi canım annem, babam ve kardeşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

12/07/2019

Tuba SEVGİ

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	5
2.1. Mikroalgler.....	5
2.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ve hücre yapısı.....	8
2.3. Mikroalgleri etkileyen çevresel faktörler.....	15
2.3.1. Işık şiddeti.....	16
2.3.2. UV şiddeti.....	17
2.3.3. Sıcaklık.....	20
2.3.4. Tuzluluk.....	21
2.3.5. pH.....	22
2.3.6. Besin elementleri.....	23
2.3.6.1. Karbon.....	24
2.3.6.2. Azot.....	25
2.3.6.3. Fosfor.....	25
2.3.6.4. Metaller.....	26
2.4. Isı şok yanıtı ve ısı şok proteinleri.....	29
2.4.1. Isı şok proteini 70 ailesi (HSP70).....	31
2.4.2. Isı şok proteini 60 ailesi (HSP 60).....	34
2.4.3. Düşük moleküler ağırlıklı ısı şok proteinleri (SmHSPs).....	35
2.4.4. Diğer ısı şok proteinleri.....	36
2.5. Duyarlı bir raportör gen olarak arılsülfataz.....	37
2.6. $\beta$ -Tübülin.....	38
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal.....	39
3.1.1. Algal suşlar, bakteriyel suş ve plasmidler.....	39
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. Kültür şartları.....	40
3.2.2. Plasmidlerin <i>E.coli</i> hücrelerine transformasyonu.....	41
3.2.3. Plasmidlerin <i>E.coli</i> 'den izolasyonu ve konsantrasyonunun belirlenmesi.....	41
3.2.4. Plasmidlerin <i>C.reinhardtii</i> 'ye transformasyonu ve rekombinant suşların eldesi 42	42
3.2.5. Rekombinant suşlarda üremenin, arılsülfataz enzim aktivitesinin ve klorofil miktarının belirlenmesi.....	43
3.2.5.1. Arılsülfataz enzim aktivitesinin kalitatif tayini.....	43
3.2.5.2. Arılsülfataz enzim aktivitesinin kantitatif tayini.....	43
3.2.5.3. Klorofil konsantrasyonunun belirlenmesi.....	45
3.2.5.4. Üremenin belirlenmesi.....	45
3.2.6. Fiziksel ve kimyasal parametrelerin ısı şok yanıtına etkisi.....	45
3.2.6.1. Isı stresi.....	45
3.2.6.2. Işık stresi.....	46



3.2.6.3.	UV-B radyasyonu .....	46
3.2.6.4.	Kalsiyum .....	47
3.2.6.5.	Tuzluluk .....	47
3.2.7.	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile transkripsiyon seviyesinde ekspresyonun tespiti .....	48
3.2.8.1.	Rekombinant <i>C.reinhardtii</i> suşlarından RNA ekstraksiyonu .....	48
3.2.8.2.	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) .....	48
3.2.9.	Agaroz jel elektroforezi .....	49
4.	BULGULAR .....	50
4.1.	<i>C.reinhardtii</i> 'nin transformasyonu .....	50
4.2.	Fiziksel ve kimyasal parametrelerin ısı şok yanıtına etkisi .....	54
4.2.1.	Isı stresi .....	54
4.2.2.	Işık şiddeti .....	56
4.2.3.	UV-B radyasyonu .....	58
4.2.4.	Farklı kalsiyum konsantrasyonunun, şelatlayıcıların ve kalsiyum iyon kanalı bloklayıcıların etkileri .....	58
4.2.4.1.	Kalsiyum konsantrasyonu .....	58
4.2.4.2.	Kalsiyum şelatlayıcıları .....	59
4.2.4.3.	Kalsiyum iyon kanalı bloklayıcıları .....	60
4.2.5.	Tuz konsantrasyonları .....	61
4.3.	Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) ile transkript düzeyinde analizler ...	63
	TARTIŞMA ve SONUÇ .....	65
	KAYNAKLAR .....	74
	ÖZGEÇMİŞ	90

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde oranı
°C	Santigrat derece
B	Beta
cm	Santrimetre
CaCl <sub>2</sub>	Kalsiyumklörür
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	Karbonat iyonu
dk	Dakika
g	Gram
H	Hidrojen
H <sub>2</sub> O	Su
H <sup>+</sup>	Hidrojen iyonu
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Karbonik asit
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Bikarbonat iyonu
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dipotasyumhidrojenfosfat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Potasyumdihidrojenfosfat
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nm	Nanometre
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Disodyumhidrojenfosfat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyumdihidrojenfosfat
OH <sup>-</sup>	Hidroksit iyonu
O	Oksijen
ppm	mg çözünen/litre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
s	Saniye
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	Sülfat iyonu
W	Watt
V	Volt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrogram
µM	Mikromolar

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
amiRNA	Yapay mikro ribonükleik asitler
Amp	Ampisilin
APS	Amonyumpersülfat
ARG7	Arjininsüksinat liyaz
ARS	Arilsülfataz
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BAPTA	1,2-bis(o-aminofenoksi)etan-N,N,N',N'-tetraasetik asit
$\beta$ TUB	Beta Tubilin
C $\beta$ LP	<i>Chlamydomonas</i> $\beta$ -subunit-like polypeptide
CL	Sürekli ışık
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CDJ	DnaJ homoloğu J domain proteinleri
Chl	Klorofil
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EGTA	trietlen glikol diamin tetraasetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
FA	Yağ asidi
FAR	Fotosentetik aktif radyasyon
HS	Isı şoku
HSPs	Isı şok proteinleri
HSR	Isı şok yanıtı
HSF	Isı şok faktörleri
HSE	Isı şok elementleri
JDP	J-domain proteinleri
LB	Luria-Bertani Besiyeri
NADH	Nicotinamide adenine dinucleotide indirgenmiş formu
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate indirgenmiş formu
NEF	Nükleotid değişim faktörleri
PG	Fosfatidilgliserol
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	Ribonükleik asit girişimi
rRNA	Ribozomal ribonükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RT-qPCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
TAP	Tris asetat fosfat besiyeri
TEMED	Tetramethylethylenediamine
tRNA	Transfer ribonükleik asit
UV	Ultraviyole
XSO <sub>4</sub>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfat

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Mikroalglerin karakteristik absorpsiyon spektrumu: .....	6
Şekil 2.2. Alg üreme fazları. ....	6
Şekil 2.3. İnterfaz evresindeki bir <i>Chlamydomonas</i> hücresinin gösterimi.....	9
Şekil 2.4. <i>C.reinhardtii</i> 'nin eşeyssel döngüsü.....	15
Şekil 2.5. UV dalga boyu ve ozon absorpsiyonu .....	19
Şekil 2.6. HSP70'lerin fonksiyonel döngüsü: .....	33
Şekil 3.1. Arilsülfataz standart eğri grafiği .....	44
Şekil 4.1. %1,2 Agaroz jel elektroforezinde kesilmiş plasmidlerin kontrolü. ....	50
Şekil 4.2. pCB412 ve pJD55 plasmidinin kotransformasyonu ile elde edilen koloniler:51	
Şekil 4.3. pCB412 ve pCB803 plasmidinin kotransformasyonu ile elde edilen koloniler: .....	51
Şekil 4.4. pCB412 ve pJD55 plasmidlerinin aktarıldığı klonlarda ARS aktivitesinin kalitatif olarak taranması.....	52
Şekil 4.5. pCB412 ve pCB803 plasmidlerinin aktarıldığı klonlarda arilsülfataz aktivitesinin kalitatif olarak taranması. Mavi renk ARS(+) olarak değerlendirilmiştir. .	52
Şekil 4.6. ARS (+) transformantlarının 23°C ve 40°C'deki ARS aktivite değerleri.....	53
Şekil 4.7. 35°C'de HSP70A III-1 ve $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C).....	54
Şekil 4.8. 37°C'de HSP70A III-1 ve $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C).....	55
Şekil 4.9. 40°C'de HSP70A III-1 ve $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C).....	55
Şekil 4.10. 42°C'de HSP70A III-1 ve $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C).....	56
Şekil 4.11. Farklı Işık Şiddetlerindeki (0-10 000 Lux) ARS Aktiviteleri.....	57
Şekil 4.12. UV-B'nin farklı periyotlarda (0, 2, 6, 12 saat) ARS aktivite değerleri. (Kontrol, UV-B uygulanmadan önce).....	58
Şekil 4.13. Farklı CaCl <sub>2</sub> konsantrasyonlarındaki (0-500mM) ARS aktivitesi değerleri. 59	
Şekil 4.14. Farklı EGTA konsantrasyonlarındaki (0-50 mM) ARS aktivitesi değerleri. 59	
Şekil 4.15. Farklı BAPTA konsantrasyonlarındaki (0- 2mM) ARS aktivitesi değerleri.60	
Şekil 4.16. Farklı lantan konsantrasyonlarındaki (0-300 $\mu$ M) ARS aktivitesi değerleri.60	
Şekil 4.17. Farklı gadolinyum konsantrasyonlarındaki (0-350 $\mu$ M) ARS aktivitesi değerleri.....	61
Şekil 4.18. Farklı verapamil konsantrasyonlarındaki (0,10,100 $\mu$ M) ARS aktivitesi.....	61
Şekil 4.19. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0,25-150 mM) ARS aktivitesi. ....	62
Şekil 4.20. RT-qPCR arilsülfataz aktivitesi ve relatif transkript değerleri (%) .....	64

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan <i>C.reinhardtii</i> suşlarının ve plasmidlerin özellikleri .	39
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri.....	40
Çizelge 3.4. Kullanılan primerler.....	49
Çizelge 4.1. <i>E.coli</i> 'de çoğaltılan ve izole edilen plasmidler .....	50
Çizelge 4.2 Transformantların numaralandırılması. ....	53
Çizelge 4.3. Farklı ışık şiddetlerindeki (0-10 000 Lux) zamana göre ARS aktivite değerleri.....	57
Çizelge 4.4. Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0,25-150 mM) ARS aktivitesi değerleri.....	62
Çizelge 4.5. RNA izolasyonu konsantrasyonları ve saflık değerleri .....	63



## 1. GİRİŞ

Küresel ısınma son yıllarda kendini ısı dalgaları şeklinde göstermekte ve üretimde verimi tehlikeye sokmaktadır. Üretim verimliliğini etkileyen her bir etken aynı zamanda insan popülasyonu ve refahını da etkilemektedir. Üretimde önemli bir yer tutan bitkiler ısı değişimlerine sezonluk ve günlük olarak maruz kalırlar. Hayvanlardan farklı olarak hareketsiz olduklarından ürün verimliliğini doğrudan etkileyen bu olumsuz değişimlerden kaçamazlar (Sung ve ark. 2003). Gelecekte artan hava sıcaklıklarıyla birlikte daha sıcak iklimsel koşullarda ısı dalgalarının daha güçlü, uzun süreli ve daha sık olduğu ön görülmektedir (Meehl ve Tebaldi 2004). Bu yüzden, bitkilerin ısı stresini nasıl algıladığı ve ısı stresine nasıl cevap verdiği büyük önem taşımaktadır.

Bugüne kadar ısı şok algılama mekanizmasında iki model öne sürülmüştür, bunlar “katlanmamış protein modeli” ve “membran akışkanlığı modeli”dir. “Katlanmamış protein modeli”nde katlanmamış proteinlerin (unfolded proteinlerin) ısı şok yanıtını tetiklediği önerilmektedir (Shi ve ark. 1998, Kim ve Schöfl 2002, Voellmy ve Boellmann 2007, Yamada ve ark. 2007). “Membran akışkanlığı modeli”nde ise plazma membranının ısı şokunda birincil yanıtçı olduğu önerilmektedir (Morimoto 1998, Baniwal ve ark. 2004, Paszkowski ve Martienssen 2012).

Isı şok yanıtı bütün organizmalarda korunumlu olarak bulunur ve hücreleri tehlikeli koşullara karşı korur (Jolly ve Morimoto 2000). Isı hasarına karşı korunmak için ısı şok proteinleri (HSPs)’ni kodlayan genlerin ifadesi sayesinde hücrenel bir direnç mekanizması oluşmaktadır (Sung ve ark. 2003). Isı şok yanıtı bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, ağır metaller, oksidanlar ve toksik kimyasallar gibi çok çeşitli çevresel stres koşullarına karşı bir direnç sağlar (Morimoto 1998).

Isı şok yanıtının ana ürünü ısı şok proteinleridir (Heat shock proteins [HSPs]), genellikle moleküler şaperon ve proteazları içerirler (Finka ve ark. 2011, Schmollinger ve ark. 2012). HSPs süper ailesi moleküler ağırlık ve fonksiyonlara göre 6 majör aileye ayrılmıştır; HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s, HSP40s ve küçük HSPs (Westerheide ve Morimoto 2005, Meher 2018,). Bu proteinlerin stres koşullarında, düzenleyici olarak, protein homeostazisinde ve biyogenezinde rolü bulunmaktadır (Hartl ve ark. 2011). Isı

stresi yokken HSPs oligomerler şeklindedir, ısı şokuna yanıt olarak HSPs birbirinden ayrılırlar ve hidrofobik yüzeyleri yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak tehlikeli protein agregatlarının oluşumunu inhibe ederler (Nakamoto ve Vigh 2007).

Çevresel streslerin kombinasyonları sürdürülebilir tarımın en büyük sorunlarından. Bu sorunların çözümünde karmaşık bir sistem olan bitki yerine, bitki model organizması olarak daha basit, tek hücreli bir mikroalg olan *Chlamydomonas reinhardtii* kullanılmaktadır. *C.reinhardtii* tek hücreli, 2 flajelası olan hareketli bir yeşil algdir. 1950'lerden beri bitki model organizması olarak hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılmaktadır (Harris 2001). *C.reinhardtii*'yi bir model sistem olarak kullanarak bitki ısı stres yanıtının temel mekanizmalarını incelemenin çeşitli avantajları vardır: (i) net şekilde tanımlanmış koşullarda üretilebilir; (ii) ısı stresi ile kuraklık stresini birbirinden ayırt etmeyi mümkün kılar; (iii) ısı stresinin kültür içerisindeki her bir hücreye homojen olarak uygulanması mümkündür; (iv) kültür içerisindeki her bir hücre aynı tipte ancak hücre siklusu açısından farklı evrede olabilir, bu farklı evrede olma durumunu hücrelerin eş zamanlı olmadan üretimiyle ortadan kaldırılabilmek mümkündür; (v) genel olarak *Chlamydomonas* gen ailesi toprak bitkilerinden oldukça küçük ve çalışılması basittir (Schroda ve ark. 2015). Dolayısıyla, *Chlamydomonas* ile ısı şok yanıt mekanizmasını çalışmak bitki ısı şok yanıtını aydınlatmada kolay ve etkili bir yöntemdir. Son on yıl boyunca geliştirilen genetik teknikler *C.reinhardtii*'nin bütün genomlarını (nükleer, kloroplastik ve mitokondrial) manipülasyona uygun hale getirmiştir (Fuhrmann ve ark. 1999). *Chlamydomonas*'ın basit hücre döngüsü, mutant suşlarının kolay izolasyonu sayesinde rekombinant suş eldesi oldukça hız kazanmıştır. Günümüzde yabancı suşlar yerine verimli raportör genler, dominant seçici işaretçiler ve güçlü promotor sistemleri kullanılarak elde edilen rekombinant *C.reinhardtii* suşlarından yararlanılmaktadır.

Bitkilerde bilinen ısı şoku yanıtlarının genel özelliklerinin aynı zamanda *Chlamydomonas* için de geçerli olabileceği düşünülmektedir. Bitkilerde ısı şok yanıtı katlanmamış proteinler tarafından tetiklenirken, fosforilasyon ise ısı şok faktörlerinin aktivasyonunda önemli bir rol oynar. Nükleer kodlu proteinlerin sentezi (çoğunlukla şaperonlar ve fosfatazlar) ise stres yanıtını ayarlar (Schmollinger ve ark. 2013). Yapılan çalışma *Chlamydomonas*'ta ısı şoku yanıtının oluşmasında sıcaklık farklarının mı,

yoksa sıcaklığın kendisinin mi ısı şok yanıtını tetikleyici bir etki olduğunun, ısı şoku yanıtının bitkilerde olduğu gibi “katlanmamış protein modeli” ne göre mi yoksa “membran akışkanlığı” modeline göre mi tetiklendiği konusunda literatüre katkı sağlayacaktır. Bitkilerde ısı şoku sinyal transdüksiyonunda bir ikincil mesajcı olarak bazı araştırmacılar tarafından etkili olduğu rapor edilen kalsiyumun (Gong ve ark. 1998, Saidi ve ark. 2009, Gao ve ark. 2012, Zheng ve ark. 2012) *C.reinhardtii*'deki etkisi henüz tam olarak kanıtlanmadığından bu konuda da literatür bilgisi eksiktir. Kalsiyumun etkili olup olmadığı çeşitli kalsiyum bağlayıcıları ve kalsiyum iyon kanalları bloklayıcıları kullanarak araştırılmıştır.

Isı şok yanıtı (HSR) bakteri, maya, meyve sineği ve memelilerde oldukça ayrıntılı olarak çalışılmasına rağmen, bu kavramlar bitki sistemlerine uygulanamaz (Mittler ve ark. 2012, Verghese ve ark. 2012, Velichko ve ark. 2013,). Bunun en büyük nedeni ısı stres metabolizmasında merkez rolü üstlenen plastidlerin en az 1300 protein içermesi ve bu durumun bir ökaryotik hücre olan bitki hücrelerine ek bir komplekslik katmasıdır (Zybaylov ve ark. 2008, Ferro ve ark. 2010). Genel olarak gen aileleri *Chlamydomonas*'ta yüksek bitkilere göre çok daha küçüktür. Örneğin, beş ana şaperon sistemi olan Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 ve sHsps üyeleri, *Arabidopsis*'te toplamda 74 gen tarafından kodlanırken, *Chlamydomonas*'da sadece 39 gen tarafından kodlanmıştır (Schroda 2004). 8 saatlik kısa üretim süresinden dolayı da büyük miktarlarda *Chlamydomonas* biyokütlesinin toplanabileceği kolaylık ve hızlilik ile proteinlere biyokimyasal yaklaşımlar daha kolaydır (Harris 2008). Ayrıca çok hücreli gelişim ve evriminde şaperonların rolünü inceleyen diğer alglerle yakından ilişkili olması da ona bir avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle, *Chlamydomonas* bitki moleküler şaperon fonksiyonları ve stres yanıt yollarını incelemek için ideal bir model organizmadır.

Bu çalışmada *C.reinhardtii* kullanılarak ısı yanıtının oluşmasında halen kapalı olan bazı tarafların açığa çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla *C.reinhardtii*'de ısı şok yanıtını tetiklemede fiziksel parametre olarak sıcaklık ve ışık şiddetinin, kimyasal parametre olarak ise kalsiyumun ve tuzluluğun etkisi araştırılmıştır. Ayrıca UV-B radyasyonunun etkileri de incelenmiştir. Çalışmada indüklenebilir HSP70A promotörü, sürekli eksprese olabilen  $\beta_2$ TUB promotörü ve Arilsülfataz raportörü kullanılarak rekombinant



*C.reinhardtii* suşları elde edilmiştir. Seçilen iki adet rekombinant suş ve kontrol suş ile ısı şok yanıtını tetikleyen parametreler ortaya çıkarılmıştır. Diğer yandan RT-qPCR çalışmalarıyla moleküler düzeyde analizleri yapılarak arilsülfataz aktivite sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

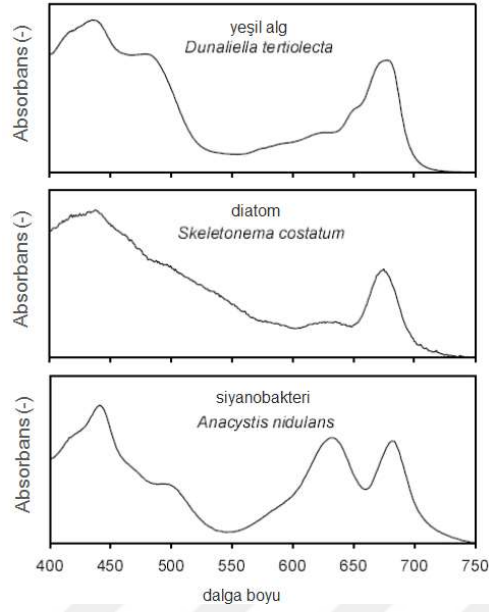


## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Mikroalgler

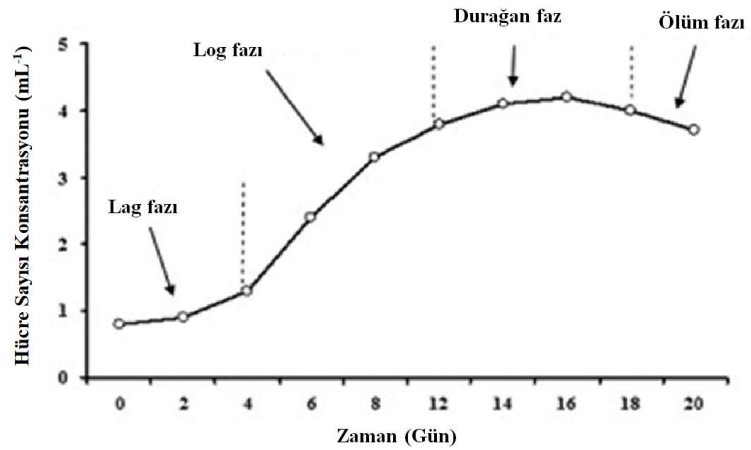
Mikroalgler fotosentetik, yüksek büyüme oranlarına sahip prokaryotik veya ökaryotik organizmalardır. Prokaryotik mikroalgler olan siyanobakteriler (Cyanophyceae), ökaryotik diğer grupların yanı sıra yeşil algleri (Chlorophyta) ve diatomları (Bacillariophyta) içerir (Mata, 2010). Mikroalgler oksijenik fototrofik mikroorganizmalar olup güneş ışığını kullanarak enerjice zengin bileşiklerin içerisindeki karbondioksiti metabolize ederler ve oksijen açığa çıkarırlar. Bu organik bileşikler mikrobiyal büyümenin yapıtaşlarını oluşturur. Işıkla sürdürülen bu biyomas büyümesi prosesine fotosentez denir. Güneş, dalgaboyu aralığı çok geniş olan bir spektrum içerisinde enerji yaymaktadır. Bu ışık spektrumunun 400-700nm arasındaki dalga boylarını içeren kısmı görünür bölge olarak tanımlanmakta ve "fotosentetik aktif radyasyon (FAR)" olarak bilinmektedir. Bu aralık 700-760nm arasındaki uzak kırmızı ışınlarına kadar genişleyebilmektedir. Bütün fototrofik organizmalarda olduğu gibi alglerin fotosentezi de ışık enerjisinin yakalanmasına bağlıdır.

Mikroalgler ışık enerjisini, fotonları absorblayabilme ve kimyasal bağlar kurarak kimyasal enerjiye depolayabilme yeteneğine sahiptir. Şekil 2.1' de bir yeşil algin (Chlorohyta), bir diatomun (Chrysophyta) ve bir siyanobakterinin (Cyanophyta) karakteristik absorbsiyon spektrumlarını gösterilmiştir (Kromkamp ve Limbeek 1993). Absorbsiyon pikleri klorofil tarafından absorblama yapıldığı için 650 ile 700 nm arasında (kırmızı bölge) değişmektedir. Aksesuar pigmentleri denilen karotenoidler genellikle mavi bölgede (400-500nm) absorblama yaparlar ve uyarım enerjisini klorofillere transfer ederler, böylece daha geniş bir dalgaboyu aralığında absorbladıklarından fotosentezi verimli kılarlar.



**Şekil 2.1.** Mikroalglerin karakteristik absorpsiyon spektrumu:

Genel olarak, mikroalglerin üremesi dört fazdan oluşur (Şekil 2.2); gecikme fazı (lag), üssel (log veya exponential) faz, durağan faz (stationary) ve ölüm (lysis) fazı. Bir homojen alg kültürü genellikle birbirinden ayrı olmayan ve uzunluğu büyüme koşullarına bağlı olarak değişebilen bir üreme modeli izler (Moazami et al. 2012).



**Şekil 2.2.** Alg üreme fazları.

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

Üreme eğrisinin aşamalarındaki renk farklılıkları gözle algılanabilir, ancak bunların tümü net olarak ayırt edilemez. Algal kültürler çok soluk bir yeşil olarak başlar ve yoğunlaştıkça daha koyu yeşil olurlar. Bu noktada fazlarda bir fark tespit etmek zordur, kültür ölüm fazına girdiğinde sarımsı kahverengiye dönüşmeye başlar. Hücreler daha çok öldükçe, kültür giderek daha az yeşil ve daha fazla kahverengi hale gelmektedir. Algler üredikçe fotosentez sırasında ortama serbest bırakılan hidroksit molekülleri ( $\text{OH}^-$ ) nedeniyle ortamın pH'sını artırır. Ortamdaki su ( $\text{H}_2\text{O}$ ), karbonik asit ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) oluşturmak için havada bulunan karbondioksit ( $\text{CO}_2$ ) ile birleşir ve hidrojen iyonları ( $\text{H}^+$ ) ve bikarbonat ( $\text{HCO}_3^-$ ) iyonlarına ayrışır. Algler, karbonu bikarbonat formunda alır ve fotosentez yoluyla, oksijen ( $\text{O}_2$ ) ve  $\text{OH}^-$  moleküllerini serbest bırakır ve çevresel pH'yı yükseltir (Short 2012).

## 2.2. *Chlamydomonas reinhardtii* ve hücre yapısı

Empire : Eukaryota

Alem : Plantae

Bölüm : Chlorophyta

Sınıf : Chlorophyceae

Takım : Chlamydomonadales

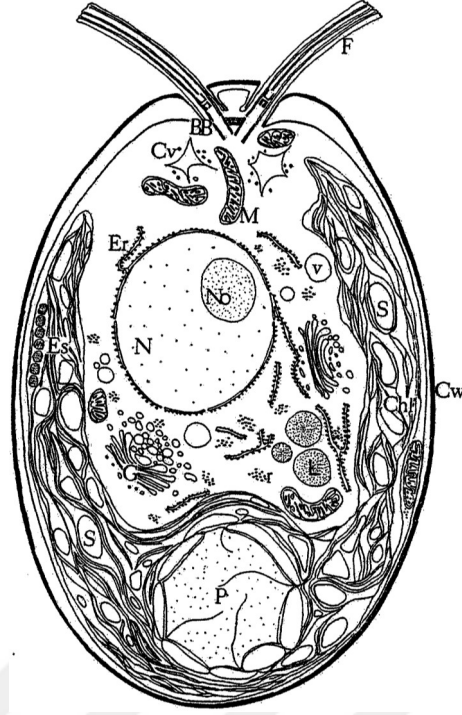
Familya: Chlamydomonadaceae

Cins : Chlamydomonas

Tür : *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard

Geçmişte *Chlamydomonas* türleri sadece morfolojik kriterlere dayalı olarak tanımlanmıştır. Cins iki anterior flagella, bir veya daha fazla pirenoidi çevreleyen bir bazal kloroplast ve ayrı bir hücre duvarı ile tek hücreli bir klorofittir (Harris 2001). *Chlamydomonas* hücresi hidroksprolince zengin glikoproteinlerden oluşan hücre duvarıyla çevrilidir ve neredeyse hücre hacminin 2/3'lük bir kısmını tek ve büyük kadeh şeklinde bir kloroplast oluşturur (Neupert ve ark. 2012) (Şekil 2.3).

Türler, genel boyut ve vücut şekli, kloroplast ve pirenoidlerin şekli ve konumu, flajella uzunluğu, flajella boşluklarının sayısı, konumu ve ışık mikroskobu seviyesinde görülebilen yapısal özellikler arasındaki farklardan ayırt edilmiştir. Ettl (1970), dokuz ana morfolojik gruba ayırdığı toplam 459 tür tanımlamıştır. Bu türlerin birçoğu kültür koleksiyonlarında bulunmasına rağmen, sadece birkaç tanesi laboratuvar araştırma organizmaları olarak önemli role sahiptir. *C.reinhardtii* *Chlamydomonas*'ın baskın laboratuvar türü olarak ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni, esas olarak tek karbon kaynağı olarak asetat ile fotosentez yapmadan üreyebilme yeteneğinden dolayıdır.



**Şekil 2.3.** İnterfaz evresindeki bir *Chlamydomonas* hücresinin gösterimi.

Hücre uzunluğu, 10 µm; BB, bazal cisimler; Chl, kloroplast; Cv, kontraktıl vakuol; Cw, hücre duvarı; Er, endoplazmik retikulum; Es, stigma; F, flajella; G, Golgi aparatı; L, lipit gövdesi; Mi, mitokondri; N, çekirdek; No, nükleolus; P, pirenoid; r, ribozomlar; S, nişasta tanesi; v, vakuol.

*C. reinhardti*, 1950'lerden beri hücre ve hücre moleküler biyolojisi çalışmalarında bir bitki modeli olarak kullanılmaktadır (Harris, 2008). Tek kloroplasta sahip olması ve fotosentez aparatının yüksek oranda korunmuş olması, *Chlamydomonas*'ın, özellikle fotosentez, kloroplast biyogenezi ve kloroplast gen ekspresyonunun nükleer kontrolü alanında çalışmayı kolaylaştırmıştır (Herrin ve Nickelsen 2004, Eberhard ve ark. 2008). Fotototrofik veya heterotrofik olarak büyüyebildiğinden ökaryotik flagella fonksiyonları kolaylıkla incelenebilir. Dolayısıyla uzun yıllardır ökaryotik fotosentezi incelemek için kullanılmaktadır (Merchant ve ark. 2007). Araştırmacılar farklı çevresel streslerin ve bu streslere organizmaların tepkilerini incelemek için *C.reinhardtii*'yi kullanmışlardır (Hema ve ark. 2007). *Chlamydomonas* flagellasının yapısı, çalışması ve altta yatan moleküler mekanizmaları üzerine yapılan araştırmalar memelilerde bazal cisimler ile ilgili hastalıklar üzerine önemli bilgiler sağlamıştır (Snell ve ark. 2004). Kazanılan teknikler birçok bitkiyle ilgili konuda araştırmaların bu model organizma kullanılarak yapılmasını sağlamıştır. *Chlamydomonas* genom sekanslaması 2007 yılında

tamamlanmış, yayınlanmış ve şu anda kullanıma açıktır. Günümüzde yabancı tür, mutant suşlar ve transformasyon çalışmaları için plasmid yapılarını içeren araştırmacıların kullanımına açık çevrim içi veritabanları mevcuttur. Daha yüksek bitki model organizmaları yerine basit tek hücreli yeşil alglerle çalışmayı destekleyen ortak motivasyon, mikrobiyal bir sistemin (hızlı kültürleme, kolay teknikler) ve gen ailesinin daha az karmaşık olmasının getirdiği bir avantajdır. Son on yıl boyunca gelişen genetik teknikler *C.reinhardtii*'nin genomları (nükleer, kloroplastik ve mitokondrial) ile yapılan birçok bilimsel araştırmayı mümkün kılmıştır. Ayrıca, kimyasal ve insersiyonel mutagenез için var olan metodlar, RNA interferans, amiRNAs ile gen susturulması metodları *C.reinhardtii* 'ye önemli bir pozisyon sağlamıştır (Merchant ve ark. 2007, Neupert ve ark. 2012). Önde gelen bir örnek, optik ışık yoğunluklarına (fototaksi) doğru yönlendirmek üzere, flajellamsı yönelim modülasyonundan sorumlu olan bir *Chlamydomonas* stigma proteini olan Channelrhodopsin'dir. *Chlamydomonas*'daki bu proteinin derinlemesine karakterizasyonu, şimdi "optogenetik" olarak adlandırılan sinirbilimler içinde tamamen yeni bir alan oluşturmuştur. Channelrhodopsin, bir ışık sinyalini, tek bir protein içinde bir iyon kanalına doğrudan ileterek, nöronlarda akson potansiyellerinin çok hızlı indüklenmesine olanak sağlamıştır (Nagel 2005, Yizhar ve ark. 2011).

### **Hücre çeperi**

Yabancı tipte *C.reinhardtii* hücresi (Şekil 2.3), çapı yaklaşık 10 µm ve hidroksiprolin açısından zengin glikoproteinlerden oluşan bir çepere sahiptir. *C.reinhardtii* hücre çeperi selüloz içermemektedir, yedi temel katmandan oluşmaktadır (Woessner ve Goodenough 1994). Bazı çeper bileşenleri için genler klonlanmış, dizilenmiş ve hücre çeperi biyogenezi defekte edilmiş birçok mutant izole edilmiştir. Bu mutantların çoğu, çeperin prekürsör proteinlerini normal miktarlarda yapmakta, fakat onları komple duvarlara monte edememektedir (Voigt ve ark. 1997). Hücre çeperi mutantları, transformasyon için oldukça yaygın bir kullanım bulmuşlardır; transformasyon işlemi bu hücre çeperi defekte hücreler ile çok daha verimli bir şekilde sağlanmaktadır.

## **Nukleus**

Hücre nukleusu *Chlamydomonas* hücrelerinde oldukça belirgindir. Nükleer membran, endoplazmik retikulumun bir uzantısı şeklindedir ve yakınlarında 1-4 golgi cisimciği bulunmaktadır. Kromozom sitolojisi zayıf olup metafaz hücrelerinde ışık mikroskopunda sadece sekiz ayrı kromozom görülür (Hails ve ark. 1993). Vegetatif hücreler normalde haploiddir, fakat oksotrofik işaretleyiciler kullanılarak kararlı diploidler seçilebilir. Nükleer genom büyüklüğünün yaklaşık  $1 \times 10^8$  baz çifti olduğu tahmin edilmektedir. Denatürasyon çalışmalarında genel olarak yaklaşık %62 oranında GC içeriği bakımından zengin olduğu bulunmuştur (Harris 1989, Rochaix 1995).

## **Kontraktıl vakuoller**

*C.reinhardtii* hücrelerinin ön ucunda iki kontraktıl vakuol yer alır. Yaşayabilmek için hiperosmotik ortama ihtiyaç duyan mutantlar vakuol yapısı ve fonksiyonunun genetik kontrolünü sağlamada bir başlangıç noktası sağlayabilir (Luykx ve ark. 1997). Tuza duyarlı mutantlar da izole edilmiştir, plazma membranı boyunca iyon aktarımını etkilediği diğer yandan doğrudan vakuol fonksiyonunun etkilenmediği düşünülmektedir (Prieto ve ark. 1996).

## **Mitokondri**

Mitokondri sitozol boyunca dağılır ve elektron mikrograflarında uzun veya dallanmış yapılar olarak görülür. Kloroplast kontaminasyonundan arındırılmış mitokondrilerin saflaştırılmasının zorluğu *Chlamydomonas* mitokondrisi üzerine sınırlı biyokimyasal araştırmalara neden olmuştur (Bennoun ve ark. 1995, Eriksson ve ark. 1999).

## **Kloroplast**

Tek kadeh şekilli kloroplast hücrenin üçte ikisini işgal eder ve kısmen çekirdeği çevreler. Tilakoid membranlar, bileşimi ve fonksiyonel organizasyonu yabanıl tip ve mutant *Chlamydomonas* suşlarında kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve tanımlanmıştır (Rochaix ve ark. 1998). Kloroplastta bulunan ayırt edici bir cisim olan pirenoid, CO<sub>2</sub>



fiksasyon bölgesi ve fotosentezin karanlık reaksiyonlarının gerçekleştiği kısımdır. Nişasta gövdeleri pirenoidi çevreler ancak bazı koşullar altında kloroplast boyunca dağılmış olarak da görülebilirler. Pirenoid varlığı, sayısı ve düzenlenmesi geleneksel taksonomide *Chlamydomonas* cinsi içindeki türlerin karakterlerini belirlemede önemlidir. İncelenen tüm *Chlamydomonas* türlerinin kloroplast genomları çoğu kara bitkisinde olduğu gibi bir tekrar yapısına sahiptir, ancak gen düzeni bitkilerden belirgin bir şekilde farklıdır (Boudreau ve ark. 1994).

*Chlamydomonas* kloroplastı hem fotosentezi hem de biyogenezi incelemek için mükemmel bir model sistem olarak çok uzun zamandır araştırmalarda kullanılmaktadır. Bu sayede klorofil sentezinin genetik kontrolünün araştırılması yönünde yeni bir araştırma alanı doğmuştur. 1960'larda Levine'in Harvard'daki laboratuvarında fotosentetik elektron transfer zincirinin genetik diseksiyona uygun olduğunu gösteren bir dizi çalışma yapılmıştır. *C.reinhardtii*'nin fotosentetik olmayan mutantları izole edilmiş ve tanımlanmıştır. Bu mutantların çoğu, belirli süreçlere (su oksidasyonu, fotosentetik elektron taşınması, ATP sentezi, CO<sub>2</sub> fiksasyonu) maruz bırakılmış, ancak spesifik proteinlerdeki lezyonların belirlenmesi o zaman mevcut olan teknoloji ile mümkün olamamıştır. İlk yıllarda yapılan araştırmalar, nükleer genlerdeki mutasyonlarla sınırlı kalmıştır. 1979'da, mutagenizden önce kloroplast genomunun kopya sayısını azaltmak için 5-florodeoksiüridin kullanarak fotosentetik olmayan mutantları seçmek için yöntemlerin geliştirilmesi ile bir ilerleme sağlanmıştır (Shepherd ve ark. 1979). Kloroplast biyogenezi ve fotosentez fonksiyonlarını etkileyen 50'den fazla nükleer gen lokusu mutasyonlarla işaretlenmiş ve neredeyse tüm yapısal genler de tanımlanmıştır. *Chlamydomonas*'ın kloroplastta kodlanan genlerin ekspresyonunu düzenleyen nükleer genleri tanımlamak için kullanılması onu önemli bir model haline getirmiştir. *Chlamydomonas* şu anda kloroplast ve fotosentezi araştırmak için sıklıkla kullanılmaktadır (Mayfield ve ark. 1995, Xiong ve ark. 1998, Komine ve ark. 2000).

## **Flajella**

İki anterior flajella 10 ila 12µm uzunluğunda ve hücre çevresindeki özel yaka bölgelerine doğru uzanır durumdadır. Flajella aksonunun yapısı tanımlanmış ve 250'den fazla protein bileşeni iki boyutlu elektroforez ile çözülmüştür. *Chlamydomonas* flajella

fonksiyonu ve bağlanması üzerine araştırmalar açısından en iyi organizmalar arasında olmuştur. Hareketlilik kusurları olan mutantlar, ilk kez *C. moewusii* ve *C.reinhardtii*'de izole edilmiştir. Bu mutantların sayesinde flajella taksonomisinin başlıca bileşenlerinin neredeyse tamamını etkileyen mutasyonlar tespit edilmiştir. *C.reinhardtii*'de flajella düzenegi ve/veya işlevini etkileyen 75'ten fazla genetik lokus tanımlanmış, flajella bileşenleri için 40'tan fazla gen klonlanmış ve dizilenmiştir (Cole 1999, Pazour ve ark. 1999, Pazour ve ark 2000).

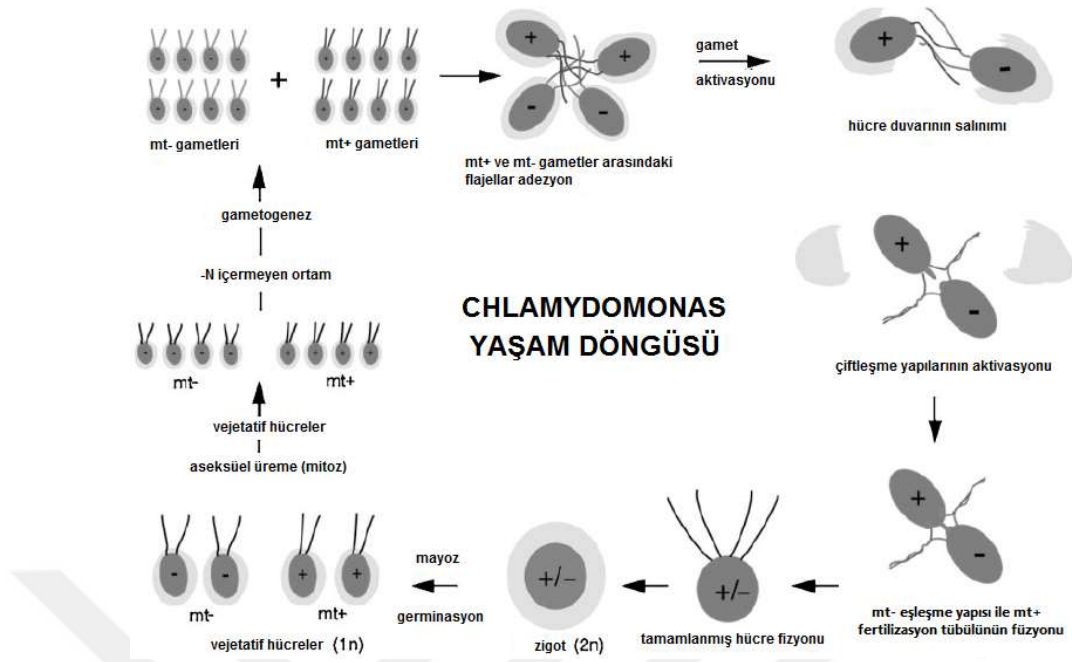
### **Stigma ve fototaksi**

Stigma, yüksek konsantrasyondaki karotenoid pigmentler nedeniyle işık mikroskobunda parlak turuncu görünür. Elektron mikroskobunda ise hücre ekvatorundaki kloroplast membranının hemen içinde yer alan elektron-yoğun granüllerinin bir bölgesi olarak görünmektedir. Stigmadaki karotenoid içeren granüllerin, işığı doğru fotoreseptre yönlendirebilmek amacı ile hareket ettiği düşünülür ve bu granüller rodopsin homologu olarak tanımlanırlar (Hegemann 1997, Deininger ve ark. 2000). Hücreleri tek yönlü işığa göre yönlendiren bir anten işlevi görürler. Stigma yapısından yoksun olan mutantlarda fototaksinin etkinliği azalmakta ancak fotoreseptör vasıtasıyla işığı algılayabilmektedir. *Chlamydomonas*'ta iki ayrı foto-yanıt gözlemlenmiştir: ilki fototakside sabit tek yönlü bir işığa karşı yönelimli hareketler ve ikincisi ise ani işık flaşlarına karşı fotofobik yanıt veya durma yanıtıdır (Schaller ve ark. 1997). Fototaktik fakat fotofobik olmayan yanıtlar gösteren mutantların analizi, fotofobik yanıtın kalsiyum bağımlı ya hep ya hiç elektrik akımı ile indüklendiğini, bu indüksiyonun ise flajellar membrandaki fotoreseptör aracılı depolarizasyon tarafından gerçekleştirildiğini göstermiştir (Matsuda ve ark 1998).

### ***C.reinhardtii*'nin yaşam döngüsü**

*C.reinhardtii* yabanıl tipi, içeriği tanımlanmış sıvı veya agar ortamda, nötr pH'ta kolaylıkla üreyebilir ve ek vitamin veya kofaktör gibi herhangi bir gereksinime ihtiyaç duymaz (Harris 1989). Asetat, yabanıl tip suşlar tarafından bir karbon kaynağı olarak kullanılabilir, karanlıkta da üreyebilirler ve fotosentez yapabilme özelliği bloke edilen suşlar asetat sağlandığında canlı kalabilir. Ancak işıktaki büyüme asetatlı veya asetatsız

karanlıktaki üremeden daha hızlıdır. Optimal üreme sıcaklığı 20-25°C arasındadır. Yeterli ışıkta ( $\pm 200\ 400$  Einstein / m<sup>2</sup>s) ve 25°C 'de, ortalama 6 - 8 saatte bir hücre sayısı iki katına çıkmaktadır. 12:12, 14:10 veya 16:8 ışık:karanlık döngüsünde üretildiğinde, hücreler ışık fazı boyunca G1'de kalır, genellikle karanlıkta ardışık olarak iki veya bazen üç mitotik bölünme gerçekleşir. Dört tane yavru hücre ortak bir ana hücre çeperi içinde tutulur ve belirli bir litik enzimin salgılanması üzerine aynı anda serbest bırakılır (Harper 1999). Işık ve besin kültürden çıkarılsa bile bölünme devam eder. Belirli bir döngüde yer alan birbirini izleyen bölünmelerin sayısı, G1 fazında erişilen hücre boyutuna bağlıdır (Goto ve Johnson 1995). *C.reinhardtii*'de mitoz gelişimi 1968'de Johnson and Porter tarafından tarif edilmiştir (Harris 1989). O zamandan bu yana gelişen bilgisayar destekli analizler ve immünofloresan teknikler mitoz sırasında sitoplazmik mikrotübüllerdeki, aktinlerdeki ve kloroplasttaki değişikliklerin anlaşılmasını sağlamıştır (Ehler ve Dutcher 1998, Harper 1999). *C.reinhardtii* hücreleri haploittir ve iki adet genetik olarak sabitlenmiş eşleşme türleri vardır artı (mtC) ve eksi (mti) olarak adlandırılırlar. Eşleme lokusu, hücre tanıma ve füzyonunda, zigospor olgunlaşmasında, organel genlerinin eşleme kontrolünde ve kalıtımında etkili olup yaklaşık 1 megabaz gen içeren kompleks bir bölgedir. (Campbell ve ark. 1995, Goodenough ve ark. 1995, Kurvari ve ark. 1998). Azottan yoksun bırakıldığında, her iki eşey tipi de eşeysel açıdan yetkin gametlere farklılaşır (Anonim 2019) (Şekil 2.4). Artı ve eksi gametler, başlangıçta seksüel aglutinin proteinlerinin aracılık ettiği bir reaksiyonla flajella uzunlukları boyunca eşleşir. Flajella eşleşmesi, yoğun olarak araştırılan bir cAMP aracılı sinyal iletim kaskadını başlatır (Quarmby 1994, Wilson ve ark. 1999). Eşleşmeyi flajellar uçlarda morfolojik bir değişim (aktivasyon) ve hücre çeperinin bir gamete spesifik litik enzim tarafından çözülmesi takip eder (Harris 1989). Eşleşme partnerlerinin füzyonu, hücrelerin ön uçlarında eşeye özgü yapılarda başlar ve anteriordan arkaya doğru lateral olarak devam eder. Yeni oluşmuş diploid zigot, bir saat sonra dört flajellalı bir hücre olarak hareket etmektedir (Wilson ve ark. 1997, Wilson ve Snell 1998).



**Şekil 2.4.** *C.reinhardtii*'nin eşeysel döngüsü

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

### 2.3. Mikroalgleri etkileyen çevresel faktörler

Mikroalgleri başarılı bir şekilde yetiştirmek için mikroalg türleri arasında değişebilen özel çevre koşulları gereklidir. Mikroalg büyümesini etkileyen faktörler arasında ışık şiddeti, sıcaklık, O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, tuzluluk, çeşitli makro ve mikro nütrientler (N, P, K, vb.); toksinler gibi abiyotik faktörler; diğer mikroalg türleri ile abiyotik maddeler için rekabet eden bakteriler, mantarlar, virüsler gibi biyotik faktörler; kültürasyon ortamının karıştırılması, kültürasyon ortamının yerininin genişliği ve derinliği gibi operasyonel faktörler yer almaktadır (Mata ve ark. 2010).

Karbon, hidrojen ve oksijen alg büyümesi için gerekli olan mineral olmayan gruptaki nütrientlerdir. Makronütrientler arasında azot, fosfor, sülfür, potasyum ve magnezyum bulunur. Demir ve manganez gibi mikronütrientler küçük miktarlarda gerekli iken (30–2,5 ppm), kobalt, çinko, bor, bakır ve molibden gibi eser elementler ise 4.5-2.5 ppm oranında gereklidir (Walker 1954). Çevresel koşullar (özellikle ışık ve sıcaklık) ve mineral olmayan gruptaki nütrientlerin, makronütrientlerin ve mikronütrientlerin mevcudiyeti, mikroalglerin biyokimyasal bileşimini büyük ölçüde etkiler (Kalacheva ve ark 2002, Fábregas ve ark. 2004). pH ve mevcut toksik metaller gibi diğer faktörler de alg büyümesini ve metabolizmayı etkileyen önemli faktörlerdendir.

### **2.3.1. Işık şiddeti**

Işık, mikroalglerin fotosentezi için enerji giriş kaynağıdır. Işık erişilebilirliği ve yoğunluğu, mikroalg kültürünün büyüme performansını etkileyen önemli parametrelerden biridir. Işık yoğunluğu düşük bir seviyede olduğunda yeterli büyüme yoktur (Alabi ve ark. 2009). Yoğunluk arttıkça, büyüme fotosentez hızının maksimum olduğu ışık doyma noktasına kadar artabilir. Bu noktadan sonra büyüme hızında artış görülmeyecek, ışık yoğunluğu arttıkça fotoinhibisyona neden olacaktır (Henley 1993). Fotoinhibisyonu önlemek için ışık şiddeti çok yüksek olmamalıdır. Mikroalg kültür konsantrasyonu yüksek olduğunda ışığın kültüre derinden nüfuz etmesi mümkün olmaz ve sadece üst katman mevcut ışığı emebilir, kalan kısmı karanlıkta bırakabilir - buna gölgelendirme denir. En üst tabaka hafif doyma ve inhibisyon ile karşılaşabilir. Mikroalg kültür konsantrasyonu düşük olduğunda ise, mikroalg hücreler, gölgelenmeden yoksun olacağından her mikroalg hücresi ışığı yakalayabilir, bu da fotoinhibisyona neden olabilir (Alabi ve ark. 2009). Çoğu mikroalg, güneş ışığı yoğunluğunun yaklaşık %20'sinde hafif doyma noktasına ulaşır. Uygun karıştırma bu sorunlara bir çözüm olabilir. Hücrelerin hareket etmesini ve böylece fotosentezin etkin bir şekilde gerçekleşmesini sağlar (Pulz 2001, Torzillo 2003).

Işık yoğunluğu, alglerin fotosentez üzerindeki etkisi sebebiyle büyümesini etkiler (Stockenreiter ve ark. 2013). Artan ışık şiddeti büyüme hızını, suşu ve kültür sıcaklığını etkiler. Algin üreme hızı doyma noktasında maksimum olup ışık şiddetinin düşmesi veya artmasıyla birlikte düşer. Alglerdeki fotoadaptasyon / fotouyumluluk süreci, ışığın

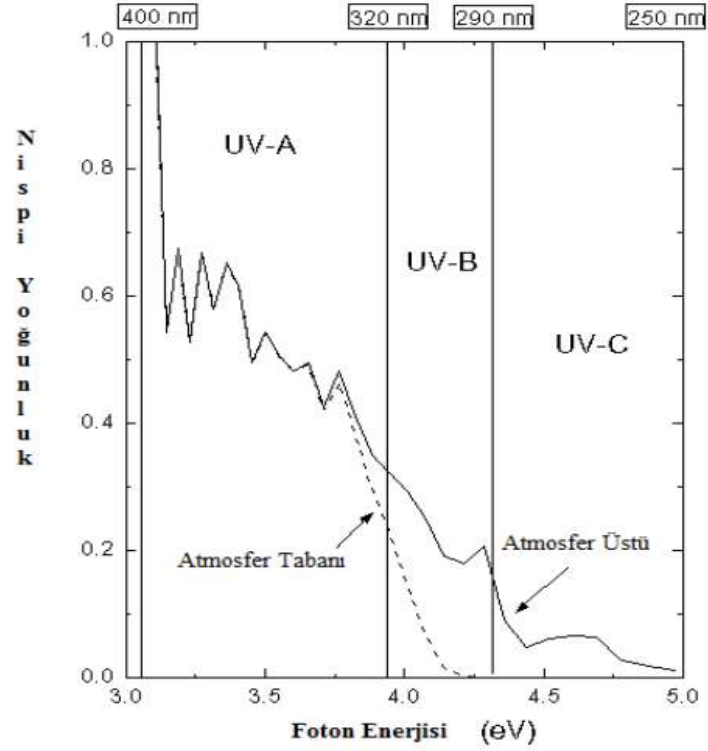
mevcudiyetine ve fotosentez etkinliğindeki artışa göre hücrelerde değişikliklere yol açar (Dubinsky ve ark. 1995). Adaptasyon, pigmentlerin tipleri ve miktarlarındaki değişiklikler, büyüme hızı, karanlık solunum hızı veya esansiyel yağ asitlerinin mevcudiyeti gibi çoklu mekanizmalarla gerçekleşebilir. Morfolojik fotouyumluluğa hücre hacmindeki değişiklikler, tilakoid membranların sayısı ve yoğunluğu eşlik eder (Berner ve ark 1989). Algler, kloroplast membranlarının doygunlaşması ile ışık sınırlamasının üstesinden gelir (Mock ve Kroon 2002). Doymunluk limitlerinin üzerindeki ışık yoğunluğu artışı fotoinhibisyona neden olur (You ve Barnett 2004) Bunun nedeni, yüksek ışık yoğunluğunun neden olduğu kloroplast lamelinin bozulması (Brody ve Vatter 1959) ve karbondioksit fiksasyonunda yer alan enzimlerin inaktivasyonudur (Iqbal ve Zafar 1993). Işık şiddeti alglerin hücresel bileşimini de etkiler. Işığın belirli bileşenlerinin, klorofil sentezi, foto-hasar onarımı ve hücre bölünmesi dahil olmak üzere hücresel mekanizmasının işleyişini etkilediği bilinmektedir. Örneğin, *C.reinhardtii* hücrelerinin bölünmesi için mavi ışığın gerekli olduğu gösterilmiştir (Voigt ve Münzner 1994). Mavi ışığın büyüme hızı üzerindeki etkisinin olduğu birçok çalışma tarafından kanıtlanmıştır (Borodin 2008). Mavi ve kırmızı ışığın büyümeye ve polisakkarit üretimini artırmaya yardımcı olduğu gözlenmiştir (You ve Barnett 2004). Emerson ve Lewis ayrıca, *Chlorella*'nın fotosentezi için en çok mavi ve kırmızı ışığın etkili olduğunu bildirmişlerdir (Emerson ve Lewis 1943). Bununla birlikte düşük yoğunluklarda bile monokromatik mavi ışığın üst üste binmesi lipid, sükroz ve nişasta oluşumunda önemli bir düşüşe neden olmuştur (Miyachi ve Kamiya 1978).

### 2.3.2. UV şiddeti

Radyasyon bilinen ilk mutajenik ajandır. Fiziksel mutajenik radyasyonların iki formu vardır; iyonize radyasyon ve iyonize olmayan radyasyon. X-ışınları ya da gama radyasyonları gibi iyonize radyasyonlar hücrede moleküllerden elektronları koparmak için yeterli enerjiye sahiptirler. Elektronlar moleküllerden ayrıldığında, serbest radikaller adını alan iyonlar oluşur. Bu serbest radikaller hücredeki DNA ya da RNA gibi çoğu diğer moleküle oksidasyonla zarar verebilir. Ultraviyole (UV) gibi iyonize olmayan radyasyonlar ise moleküllerdeki elektronları uyararak mutajenik etki gösterirler. DNA molekülündeki elektronların uyarımı genellikle DNA'daki komşu iki

primidin (özellikle timin) arasında ekstra bağ oluşumuyla sonuçlanır. Radyasyonun dalga boyuna rağmen, radyasyonun artmasıyla dışarıya verilen enerji azalır. Örneğin; İyonize radyasyon genellikle 1 nm (nanometre)'den az dalga boyuna ve 100 eV (elektron volt)'dan fazla enerjiye sahiptir. İyonize olmayan radyasyon ise 100-390 nm arasında dalga boyuna ve 100 eV'dan az enerjiye sahiptir. Bu nedenle, iyonize radyasyonlar iyonize olmayan radyasyonlardan daha tehlikeli olarak kabul edilir. İyonize ve iyonize olmayan radyasyonlar gıda endüstrisi ve laboratuvarlarda, klinik ortamlar içerisinde mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek için kullanılmaktadır. İyonize olmayan radyasyon olan Ultraviyole (UV), mutasyonları indükleyen, DNA'da hasar oluşturan ve tümör gelişimine neden olabilen güçlü genotoksik etkilere sahiptir. UV'nin başlıca doğal kaynağı güneştir ve güneşsel UV'nin cilt kanserlerinin ana nedenlerinden biri olduğu bilinmektedir (Anonim 2013). Ultraviyole ışık (UV; 215–400nm), hücrelerdeki fotosentetik mekanizmaya verdiği hasar nedeniyle algleri de olumsuz etkiler.

UV ışığının UVA, UVB ve UVC olmak üzere üç genel türü vardır; insan vücudunu bronzlaştıran UVA (320–400 nm), cilt üzerinde güçlü karsinojenik etki gösteren UVB (280–320 nm), germisidal (antiseptik, mikrop öldürücü) etki yapan UVC (200–280 nm) gibi farklı mutajenik özelliklere sahiptir. Yeryüzüne ulaşan güneş ışığının UV bileşenleri UVA ve UVB (290–400 nm)'den oluşmaktadır, UVC ise yeryüzüne ulaşmadan ozon tabakası tarafından absorblanır (Anonim 1999), (Şekil 2.9).



**Şekil 2.5.** UV dalga boyu ve ozon absorpsiyonu

UVC, UVA ve UVB'den daha kısa dalga boyuna ve yüksek enerjiye sahip olduğundan, potansiyel olarak en zararlı UV formudur ve bakteri, virüs, protozoa, maya, küf ve alg gibi mikroorganizmalara karşı öldürücü etkiye sahiptir. 254 nm'de UVC en büyük antimikrobik etkinliğe sahiptir (Tran ve Farid 2004). UV-B (215–380nm), benzer yoğunluklarda bile UV-A radyasyonuna (380-400nm) kıyasla hücrelerde daha fazla hasara neden olur (Fernanda 2012). UV-A reaktif oksijen ve hidroksil radikallerinin üretimini arttırarak dolaylı hasara neden olurken UV-B radyasyonu hücresel DNA'ya doğrudan zarar verir. Orta düzeyde UV-A fotosentezi uyarabilirken UV-B yoğunluğa bakılmaksızın fotosentezi olumsuz etkilemektedir. UV radyasyonunun neden olduğu hasarı en aza indirmek için alg koruyucu hücre duvarlarının gelişimini, karotenoidlerin ve diğer pigmentlerin sentezini arttırmaktadır (Xue ve ark. 2005, Fernanda 2012, Rastogi ve Incharoensadki 2013).



### 2.3.3. Sıcaklık

Sıcaklık, alg üreme hızını, hücre büyüklüğünü, biyokimyasal bileşimi ve besin gereksinimlerini etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir. Özellikle dış mekan kültür sistemleri için bir başka önemli sınırlayıcı faktördür. Optimal üreme sıcaklıklarının altında, üreme oranı artan sıcaklıkla artar, ancak türe veya suşa özgü olmakla beraber optimumun üzerinde belirgin bir şekilde azalır (Renaud ve ark. 2002). Optimal aralığın altında ve donmanın üstünde olan sıcaklıklar mikroalgi öldürmez ve birçok mikroalg 15°C ye kadar olan daha düşük sıcaklıklara kolayca dayanabilir (Mata ve ark. 2010). Genellikle ideal üreme sağlamak için sıcaklık 20 ile 30°C arasında kalmalıdır (Chisti 2007). Sıcaklık ayrıca fotoinhibisyonda önemli bir rol oynayabilir. Bazı sıcaklığa bağlı fotoinhibisyon mekanizmaları öne sürülmüştür. Bunlar şu mekanizmaları içerir: (i) düşük sıcaklık, daha düşük bir CO<sub>2</sub> fiksasyon oranına bağlı olarak belirli bir foton akış hızında azaltılmış elektron taşınmasına neden olur; (ii) düşük sıcaklık aktif oksijen türlerini inhibe eder, bu da PSII'yi koruyarak fotoinhibisyonu azaltma ile sonuçlanır; ve (iii) düşük sıcaklık, fotoinhibisyon sırasında bozulan D1 proteininin sentezini inhibe eder ve sonuç olarak PSII onarım döngüsünü engeller (Vonshak and Torzillo 2004). Sıcaklık değişimi ile en sık gözlenen değişikliklerden biri, yağ asitlerinin lipid membrandaki doymamışlık seviyesindeki değişiktir (Thompson 1996, Harwood 2004, Guschina ve Harwood 2009). Optimalin ötesinde sıcaklık artışı protein sentezini azaltır ve sonuç olarak düşük üreme oranlarına neden olur (Konopka ve Brock 1978). Morris ve ark.(1974), bir deniz diatomu olan *Phaeodactylum tricornutum*'un üremesini incelemiş ve protein sentezinin gece metabolizmasının önemli bir bileşeni olduğu gerçeği nedeniyle, sıcaklıkların daha düşük olduğu gecelerde protein sentez hızlarında önemli bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Rhee ve Gotham (1981), *Scenedesmus* sp.'da artan sıcaklık ile birlikte, protein sentezinin (birim RNA başına protein sentezi oranı bakımından) verimliliğinin azaldığını belirlemişlerdir. Ayrıca sıcaklığın, alg hücreindeki nişasta içeriğini de etkilediği bildirilmiştir. Nişastalar, ışık reaksiyonlarında oluşan enerji bakımından zengin fosfat bağları (yani ATP) kullanılarak fotosentez döngüsünün karanlık reaksiyonlarında fosforlanmış metabolitlerle sentezlenir. Artan sıcaklık, nişastada bozunmaya neden olur (Mitsui 1977, Nakamura ve Miyachi 1982). Nakamura ve Miyachi (1982), sıcaklığın 20°C'de ototrofik olarak

büyüyen *Chlorella vulgaris*'deki nişasta bozunması üzerindeki etkisini incelemişler ve bu çalışmada 20°C'de 30 dakika ve 38°C'de 10 dakika boyunca maruz bırakıldığında sukrozda artış (% 57) nişastada ise önemli bir azalma olduğunu (%17) bildirmişlerdir. Sıcaklık karotenoidlerin oluşumu üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir. Karotenoidler, fotosentezde kullanılmak üzere ışık enerjisini emer. Ayrıca klorofilin fotohasardan korunmasını sağlarlar (Armstrong ve Hearst 1996). Fotosentez reaksiyon merkezinde ya enerji transferi sürecine katılarak ya da reaksiyon merkezini oto-oksidasyondan koruyarak hayati bir rol oynarlar. Algal türlerindeki karotenoid birikimi, yüksek sıcaklıklarda kaydedilen artmış oksidatif ve fotohasar etkileri nedeniyle sıcaklık ile artar (Tjahjono 1994, Liu ve Lee 2000). Tjahjono ve ark. (1994) *Haematococcus pluvialis*'de 20-30°C'lik bir artışta astaksantin oluşumunda da üç kat bir artış olduğunu bildirmişlerdir (Liu ve Lee 2000).

#### **2.3.4. Tuzluluk**

Tuzluluk, alg hücrelerine ait biyokimyasal bileşimi değiştiren bir başka önemli faktördür (tuzluluk, aksi belirtilmedikçe, esas olarak sodyum klorür konsantrasyonunu işaret etmektedir). Alglerin doğal seviyelerine göre daha düşük veya daha yüksek tuzluluk seviyelerine maruz bırakılması üreme hızını ve bileşimini değiştirebilir. Alg hücreleri için çok yüksek tuzluluk derecesi zararlıdır, çünkü yüksek tuzluluk besiyeri ile hücreler arasındaki su basıncından dolayı alglerin şekil ve yapılarını değiştirebilir (Mata ve ark. 2010). Örneğin yüksek tuzluluk, alg lipid içeriğini artırır (Fabregas ve ark. 1984, Ben-Amotz ve ark. 1985, Renaud ve Parry 1994, Zhila ve ark. 2011). Taze bir su yosunu olan *Botryococcus braunii* kültürlerinde NaCl düzeyini arttırmak, üreme hızında, karbonhidrat içeriğinde ve lipid içeriğinde artışa neden olmuştur; bununla birlikte, en yüksek biyokütle konsantrasyonu en düşük tuzluluk seviyesinde elde edilmiştir (Rao ve ark. 2007). 0.5 M NaCl'de yetiştirilen *Botryococcus braunii*'nin lipid içeriğinin NaCl ilavesiz ortamlara kıyasla daha yüksek olduğu başka bir çalışma ile desteklenmiştir, ancak protein, karbonhidratlar ve pigment düzeyleri daha düşüktür (Ben-Amotz ve ark. 1985).

### 2.3.5. pH

Alg kùltivasyonunda en önemli faktörlerden biri pH olup, CO<sub>2</sub> ve temel besin maddelerinin çözünlürlüğünü belirlediğinden algal metabolizma üzerine önemli etkiye sahiptir (Chen ve Durbin 1994). Alg türleri farklı pH değerlerine toleranslıdır ancak genellikle en uygun pH 6-8'dir. 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 pH değerleri ile ortamda *Chlorella vulgaris*'i yetiştirmişler ve alglerin üreme özelliklerinde büyük bir fark olmadığı sonucuna varmışlardır. Algler tarafından inorganik karbonun kullanılmasına bağlı olarak kültür ortamlarının pH'sı önemli ölçüde artabilir. Maksimum algal üreme nötral pH'da olmasına rağmen en iyi pH değeri algin üremeye adapte olduğu başlangıç pH değeridir. Besiyerindeki pH'yı değiştirmek metabolik inhibisyon sebebi ile algal üremeyi engelleyebilir (Zeng ve ark. 2011). Pruder ve Bolton (1979), düşük pH'ya (6.5) adapte olan *T. pseudonana* hücrelerinin pH 8.8'de daha düşük bir büyüme hızına sahip olduğunu gözlemlemiştir. Normal üreme hızı, HCl eklenerek pH düşürüldükten sonra geri kazanılabilmektedir. Benzer sonuçlar Chen ve Durbin (1994) tarafından rapor edilmiş, fotosentetik hız ve alg gelişimi pH 9.0'da minimumken, pH 8.3'e düşürüldüğünde karbon alım hızı artmıştır. pH özellikle sudaki karbonu kullanan türlerin nispi konsantrasyonlarının başlıca belirleyici faktörüdür. Yüksek pH CO<sub>2</sub>'den gelen karbonun varlığını sınırlar ve algal üremeyi baskılar (Chen ve Durbin 1994). Yüksek pH'ta algin kulanacağı karbon karbonat formunda mevcuttur (Nielsen 1975). Alkalın pH ana hücrelerin hücre duvarlarının esnekliğini artırır, hücre duvarının kırılmasını önler ve spor salınımı inhibe olur, böylece hücre döngüsünün tamamlanma süresi uzar (Guckert ve Cooksey 1990). Alkalın pH, dolaylı olarak, trigliserit birikiminde artışa, ancak hücre döngüsü inhibisyonundan dolayı membrana bağlı polar lipidlerde bir azalmaya neden olur. *Chlorella*'daki membran lipidlerinin alkali pH koşullarında daha az doymamış olduğu gözlenmiştir (Guckert ve Cooksey 1990). Diğer taraftan, *Chlorella saccharophila* ve *Euglena mutabilis* gibi aside toleranslı algler, değişen hücre dışı pH'a yanıt olarak hücre içi pH değerini değiştirebilir. *Chlorella saccharophil*, 5.0-7.5 olan bir dış pH değerinde, pH 7.3 olan hücre içi değerini korumuştur; ancak pH'ın 3.0'e düşürülmesi, hücresel pH'nın 6.4'e düşmesine neden olmuştur (Gehl ve Colman 1985). *Dunaleilla acidophila* gibi bazı algler, yüksek konsantrasyonlarda H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'ün neden olduğu ozmotik dengesizliği önlemek için gliserol biriktirirken (Fuggi ve ark. 1988) ve *Chlamydomonas* sp. ve *Pinnularia braunii* var. *amplikepala* (bir asidofilik diatom) ise

yüksek asidik koşullar altında (pH 1) triaçilgliseridler gibi depolama lipidlerini biriktirirler. Asidik koşullar altında gözlemlenen bir başka adaptasyon, doymuş yağ asidi içeriğinde bir artışın olup, membran akışkanlığının azalmasıdır (Tatsuzawa ve ark 1996). Benzer bir durum toplam yağ asidi içeriğinin pH 7'de % 2'den pH2.7'de %2.4'e çıktığı *Chlamydomonas* sp.'de bildirilmiştir, bu da istatistiksel olarak anlamlı bir artıştır (Poerschmann ve ark. 2004). Moroney ve Tolbert (1985), pH'ın *C.reinhardtii*'nin karbon alımı üzerindeki etkilerini incelediklerinde daha düşük pH'ta (<6.95) fotosentez için etkin bir CO<sub>2</sub> kullanımı gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. HCO<sub>3</sub>'ün hakim olduğu yüksek dış pH (6.95–9.5) 'da ise karbonu verimli bir şekilde biriktirememişler ve fotosentetik aktiviteyi sürdürmek için yüksek karbonat kaynağı gerektiğini bildirmişlerdir (Ramanan ve ark. 2012).

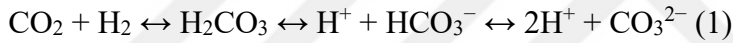
### 2.3.6. Besin elementleri

Genel olarak, mikroalg bileşimi CH<sub>1.7</sub>O<sub>0.4</sub>N<sub>0.15</sub>P<sub>0.0094</sub> (Oswald 1988) 'dir. Bu nedenle, makrobesinler azot ve fosfor içermelidir. Ayrıca Fe, Mg, Mn, B, Mo, K, Co ve Zn gibi eser metallere de ihtiyaç duyulmaktadır. Besin sınırlamasındaki önemli değişiklikler, hangi besinin hangi dereceye kadar sınırlı olduğuna bağlı olarak alglerin biyokimyasal bileşiminde önemli varyasyonlara neden olabilir. Genel olarak, alglerin büyüme oranı, en uygun sıcaklık ve pH koşullarında nütrientlerin alım oranı ile orantılıdır (Titman 1976). Azot ve fosfat, alg hücrelerinin büyümesi ve metabolizması için iki önemli makroelement olup proteinlerin ve nükleik asitlerin oluşumu için temel bir elementtir. Hücrelerdeki ATP gibi temel moleküllerin ayrılmaz bir parçası olan fosfat ise başka bir önemli nütrient olup tüm canlı hücreler için gerekli makro moleküller olan DNA ve RNA omurgasının bir parçasını oluşturmaktadır (Harris 1986). Bu önemli besinlerin sınırlanması organizmanın metabolik yollarını önemli ölçüde değiştirebilir. Örneğin, azot ve fosfor açlığı lipid metabolizmasını membran lipit sentezinden nötral lipid depolanmasına kaydırır. Bu da, yeşil alglerin toplam lipid içeriğini artırır (Hu 2004). Birçok çalışma mikroalg kültüründe N veya P eksikliğinin veya sınırlamasının çoğu tür için lipid birikimini ve dönüşümünü geliştirebileceğini bildirmiştir (Khozin-Goldberg ve Cohen 2006, Devi ve Mohan 2012, Feng ve ark. 2012). Ito ve ark. (2012), azot eksikliği koşullarının algli hücrelerdeki aminoasitlerin miktarının 1 / 20'ye veya daha

azına düşmesine neden olabildiğini ve nötr lipit miktarının ise büyük ölçüde arttığını bildirmişlerdir.

### 2.3.6.1. Karbon

Karbon, hidrojen ve oksijen mineral olmayan üç temel nütrientlerdir. Alg kültürleri için ortamdaki hidrojen ve oksijenin bolluğu hücrel büyüme veya metabolizma için bir sorun teşkil etmez. Karbon, tedarik edilmesi gereken diğer önemli besinlerden biridir. Fotosentez, dolayısıyla da alg büyümesi ve üremesi için gereklidir. Alglar tarafından fikse edilen karbon solunum için, bir enerji kaynağı olarak ve hücrelerin oluşumunda bir hammadde olarak kullanılır (Berman-Frank ve Dubinsky 1999). Algler, fotosentez yapmak için inorganik bir karbon kaynağı gerekir. Karbon, ototrofik büyüme için CO<sub>2</sub>, karbonat veya bikarbonat formunda; heterotrofik büyüme için asetat veya glikoz formunda kullanılabilir. Sudaki CO<sub>2</sub>, pH, sıcaklık ve besin içeriğine bağlı olarak bu formların herhangi birinde mevcut olabilir:



pH artışı ile karbonat artarken, moleküler CO<sub>2</sub> ve bikarbonat azalır (Chen ve Durbin 1994). Deniz suyunun ortalama pH'sında (8.2), toplam CO<sub>2</sub>'nin % 90'ı HCO<sub>3</sub> şeklinde bulunurken sadece % 1'i moleküler CO<sub>2</sub> halinde, geri kalanı ise bikarbonat halindedir (Moss 1973, Nielsen 1975). Riebesell ve ark. (2000) *Emiliana huxleyi*'nde CO<sub>2</sub> konsantrasyonunun lipid dağılımı üzerindeki etkisini incelemişler, CO<sub>2</sub>'nin çoklu doymamış yağ asitleri ve alkenonların bileşimi üzerindeki önemli bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Yağ asidi içeriğindeki benzer artış ve CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarındaki artış ile gelen doymamışlık Tsuzuki ve ark. (1990) tarafından rapor edilmiştir. *Spirulina platensis* siyanobakterisi ile yapılan bir başka çalışmada, yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarının hücrelerdeki protein ve pigmentlerin nispi konsantrasyonlarını azalttığı ancak karbonhidrat içeriğini artırdığı bildirilmiştir. Hücre bileşimindeki bu değişikliğe maksimum biyokütle veriminde azalma eşlik etmiştir (Gordillo ve ark. 1998).

### 2.3.6.2. Azot

Makro elementlerden biri olan azot, en fazla gereksinim duyulan element olup aminoasitler ve nükleik asitler dahil birçok hücre bileşenini oluşturmaktadır. Bu nedenle azot eksikliği büyümeyi önemli ölçüde engeller. Alg hücrelerindeki tüm yapısal ve fonksiyonel proteinlerin temel bir bileşenidir ve hücre kuru ağırlığının %7 ila %20'sini oluşturur (Hu 2004). Genellikle kültür ortamlarına nitrat, amonyak veya üre olarak konulur. Algler tarafından alınan inorganik azot, biyokimyasal olarak aktif bileşiklere hızlı bir şekilde asimile edilir ve değişen fizyolojik ihtiyaçları karşılamak için hücreler içinde geri dönüştürülebilir (Fujita 1988). Alg kültüründeki azot eksikliğinin başlıca etkileri, protein içeriğinde eşzamanlı bir azalma ile artmış biyosentez, lipid birikimi (Thompson 1996) ve trigliseritleri (Takagi ve ark. 2000, Stephenson ve ark. 2010) içerir (Lynn ve ark 2000, Heraud ve ark. 2005). Bu da, büyüme oranı yerine daha yüksek bir lipid/protein oranı ile sonuçlanır (Converti ve ark. 2009). Azotça yoksun kültürlerde yetişen algler fotosentetik olarak fikse edilen karbonu karbonhidrat sentezine yönlendirirler (Hu 2004). Azotça yoksunluğun diğer etkileri arasında karbondioksit fiksasyonunda, klorofil içeriğinde ve doku üretimindeki azalma sayılabilir (Richadrson ve ark. 1969, Kolber ve ark. 1988). Holm-Hansen ve ark. (1959), kültüre amonyum ilavesiyle *Chlorella pyrenoidosa*'nın amino asit içeriğinde bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Nitrojen eksikliği olan koşullar altında, *Spiriluna platensis* hücreleri normal ve yüksek CO<sub>2</sub> konsantrasyonlarında bile düşük karbon fiksasyon kapasitesi göstermiştir (Gordillo ve ark. 1998). Azot yoksunluğu ayrıca hücrelerin enzim dengesini değiştirir, bu da lipidlerin sentezinde ve klorofil sentezinde bir azalmaya yol açarak fazla karotenoidlerin oluşumuna neden olur (Round 1984). *Dunaliella* sp. ve *Haematococcus pluvialis*, azotça yoksun koşullar altında üretildiğinde, yüksek miktarda karotenoid ve astaksantin birikirler (Ben-Amotz ve Avran 1990).

### 2.3.6.3. Fosfor

Fosfor, hücrelerin büyümesi ve gelişimi için gerekli olan önemli bir bileşendir (Hu 2004). Fosfor besisi ortamında fosfor tuzları (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) şeklinde bulunmaktadır. Bu tuzlar fosfor kaynağı olarak kullanılmanın yanında tampon özelliğinden yararlanılarak besin ortamının pH dengesinin kurulmasını

sağlamaktadır (Sukatar 2002). Fosfor tipik olarak algin kuru ağırlığının %1'ini oluşturur (Borchardt ve Azad 1968), eklenen fosfatın metal iyonları ile oluşturduğu kompleksler biyoyararlanımda eksikliklere neden olabileceğinden daha fazla gerekebilir. Fosfor, bitki hücrelerinde solunum ve fotosentezin ara molekülü şeker-fosfat dahil, hücre membranını oluşturan fosfolipidler gibi önemli maddelerin de bileşenidir. Hem bitki hem de mikroalglerin enerji metabolizmasında ve nükleotidlerin yapısında bulunur. Azot yerine fosforun birçok besi ortamı için mikroalglerin birincil sınırlayıcı besin maddesi olduğu gösterilmiştir (Larned 1998). Fosfor sınırlamasının en hızlı etkileri arasında, substrat sentezinde, rejenerasyonunda ve karbon fiksasyonu için gerekli olan ışık kullanım oranında olan azalma sayılabilir (Barsanti ve Gualtieri 2005). Fosfor sınırlaması lipit birikimine yol açar. Kloroplastlarda membran lipidlerini oluşturan dört majör gliserolipidden biri olan, hücre büyümesi, klorofil-protein kompleksi düzeylerinin korunması ve PSII kompleksinin normal yapı fonksiyonu için gerekli olan fosfatidilgliserol (PG), *Chlamydomonas reinhardtii*'de düzeyinin fosfor sınırlaması ile azaldığı gözlenmiştir (Sato ve ark. 2000).

#### 2.3.6.4. Metaller

İz metaller (eser metaller), çok küçük miktarlarda (<4 ppm) alg hücrelerinde bulunan metallerdir ancak fikofizyolojinin temel bileşenleridir. Demir (Fe), manganez (Mn), kobalt (Co), çinko (Zn), bakır (Cu) ve nikel (Ni), çeşitli metabolik fonksiyonlar için alglerin ihtiyaç duyduğu en önemli altı iz metaldir (Bruland ve ark. 1991). İz metallerin sulu konsantrasyonu, metallerin biyoyararlanımının bir göstergesi olmadığı için, alglerin iz metale ulaşması büyük ölçüde serbest iyon konsantrasyonuna bağlıdır. İz metallerdeki eksiklikler, algin büyümesini sınırlayabilirken, aşırı veya yüksek metal konsantrasyonları (toksikite eşliğinin üstünde) üremeyi engelleyebilir, fotosentezi bozabilir, antioksidanları tüketebilir ve hücre membranına zarar verebilir. Kalsiyum mikroalg için önemli bir elementtir. Aynı zamanda hücre bölünmesini de etkiler ve genel morfogenezi etkileyen ikincil bir habercidir. Kalsiyum kalsifikasyon sürecine de katılır. Mikroalgal biyokütledeki kalsiyum içeriği % 0,2 ile % 1,4 arasında değişiklik gösterir, ancak %8'e de ulaşabilir. Sucul ortamlardaki kalsiyum esas olarak  $Ca^{+2}$  formundadır ve aktif taşıma veya pasif difüzyonla alınır. Uzun süre boyunca artan hücre içi  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunun üremeye olumsuz etkisi vardır. Üreme ortamında yüksek

konsantrasyondaki kalsiyum yüksek pH'larda presipite olur ve ortamın alkalinitesini düşürür. Kalsiyum kültürlerine  $\text{CaCl}_2$  olarak eklenir, ancak  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  gibi diğer bazı formlar da kullanılabilir (Markou ve ark. 2014).

Isı stres mekanizmasında *Chlamydomonas*'da kalsiyumun rolü değerlendirildiğinde ilk olarak bitkileri ele almak gerekmektedir. Bitkilerin ısı stresini nasıl algıladığı konusu hala tartışmalıdır. Memeli hücrelerinde elde edilen veriler ise çeşitli stres koşulları altında ortaya çıkan proteotoksik stresin, strese duyarlı şaperon-HSF kompleksleri düzeyinde algılandığıdır. Memelilerde, HSP90, HSF'nin trimerizasyonunu önleyerek, stressiz koşullar altında bir baskılayıcı olarak görev yapar. HSP90 / HSP70 şaperonları içeren protein kompleksleri daha yüksek bitki türlerinde de tanımlanmıştır. Bu görüşe yakın bir süre önce Goloubinoff (2011) stresinin plazma membranında hücre dışı  $\text{Ca}^{+2}$ 'un  $\text{Ca}^{+2}$  geçirgen kanallarından girişi ile algılandığını öne sürmüştür. Bu hipoteze göre, sıcaklık değişimlerinden veya membranlardan kaynaklanan membran akışkanlığındaki değişiklikler kanalı açar ve  $\text{Ca}^{+2}$  akışı bir kalmodulin bağımlı kinazı aktive eder. CNGC (siklik nükleotit kapılı kalsiyum kanalları) familyasının sıcaklığa duyarlı  $\text{Ca}^{+2}$  kanalları *Arabidopsis thaliana* ve *Physcomitrella* patentlerinde tanımlanmıştır. *Arabidopsis*'te cAMP seviyelerinin ısı şokunda arttığı ve böylece CNGC6'nın aktivasyonuna yol açtığı gösterilmiştir. HSF aktive edildiğinde, ısı stresi genlerinin ekspresyonuna aracılık eder. HSP'lerin uyarılması, hücrenin protein homeostazisini geri kazanmasına izin verir, bu sırada HSF inaktive edilir ve cevap zayıflatılır (Schmollinger ve ark. 2013). Hücre dışı kalsiyumun HSR'ye aracılık etmedeki rolüyle ilgili *Chlamydomonas* ile elde edilen sonuçlar tutarsız olup daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Schroda ve ark. 2015).

Bazı  $\text{Ca}^{+2}$  şelatlayıcıları EGTA (Egtazik asit [INN, USAN]), BAPTA (1,2-bis [o-aminofenoksi] etan-N, N, N', N'-tetraasetik asit), bazı  $\text{Ca}^{+2}$  bloklayıcıları ise Verapamil, Gadolinium, Lantan'dır. EGTA (etilen glikol-bis ( $\beta$ -aminoetil eter) -N, N, N', N'-tetraasetik asit), bir şelatlama maddesi olan bir aminopolikarboksilik asittir. Renksiz bir katı olup daha iyi bilinen EDTA ile benzerdir. EDTA'ya kıyasla, magnezyum için daha düşük bir afiniteye sahipken, kalsiyum iyonları için ise daha seçicidir (Bett ve ark. 2002). BAPTA ise kalsiyum spesifik bir aminopolikarboksilik asittir. Dört karboksilik asit fonksiyonel grubunun varlığı, iki kalsiyum iyonunun bağlanmasına izin verir.



Karboksilat ligandlarının geniş esnekliği, kalsiyum ve diğer metal iyonlarının koordinasyonu için kritik öneme sahiptir (Ricci ve ark. 1998) Verapamil çeşitli ticari isimlerle satılan bir ilaç olmakla beraber, yüksek tansiyon, anjina (kalbe yeterli kan akışı olmadığı için gerçekleşen göğüs ağrısı) ve supraventriküler taşikardinin tedavisi için kullanılmaktadır. Ayrıca, migren ve küme baş ağrısının önlenmesinde de kullanılabilir (Merison ve Jacobs, 2016). Dihidropiridin olmayan kalsiyum kanalı bloklayıcı ilaç ailesinde yer almaktadır (Anonim, 2019). Gadolinyum, Gd sembolüne ve atom numarası 64'e sahip kimyasal bir elementtir. Gadolinyumun yüksek derecede toksik olduğu rapor edilmiştir, ancak MRI kontrast ajanları şelatlı bileşiklerdir ve çoğunun insanda kullanılacak kadar güvenli olduğu kabul edilmektedir. Hayvanlarda serbest gadolinyum iyonlarının toksisitesi, kalsiyum-iyon kanalına bağlı birçok işlemle etkileşime girmesinden kaynaklanmaktadır. %50 ölümcül doz yaklaşık 100–200 mg/kg'dir (Ramalho ve ark. 2016). Lantan, La sembolü ve 57 numaralı atomdan oluşan kimyasal bir elementtir. Havaya maruz kaldığında yavaş yavaş kararmaya başlar. Lantan lantanidlerin ve stabil grup 3 elementlerin en büyük atom yarıçapına sahiptir, bu nedenle de aralarında en reaktif olanıdır. Havayla temasta yavaş yavaş kararır ve lanthanum (III) oksit,  $La_2O_3$ 'ü oluşturmak için kolayca yanar (Meija ve ark. 2016).

Demir, alglerde fotosentez, solunum, üreme ve hücresel işleyiş için önemli bir eser metaldir. Fotosentez ve azot asimilasyonunda redoks katalizörü olarak görev yapar ve fotosentetik organizmalarda elektron transport reaksiyonlarına aracılık eder (Terry 1986). Demir sınırlaması, fotosentetik elektron transferine önemli ölçüde baskı yapar ve NADPH oluşumunda bir azalmaya neden olur. Demirdeki azalma ferredoksinin de hücresel bolluğunu azaltarak fonksiyonel bir eşdeğeri olan flavodoksinin ikamesini zorlar (McKay ve ark. 1999, Straus 2004). Ferredoksinin katalitik kapasitesi flavodoksininden çok daha fazla olduğundan sorun olabilir (Raven 1984). Demir sınırlaması ayrıca hücrede klorofil konsantrasyonunu da azaltır (Greene ve ark. 1992). *Chlorella vulgaris* kültürlerinde yüksek demir konsantrasyonlarının lipit içeriğini arttırdığı gözlenmiştir (Liu ve ark. 2008). Ayrıca demir içeriğindeki azalmanın karotenoid kompozisyonunu ise azalttığı tespit edilmiştir (Van Leeuwe ve Stefels 1998).

Çok az miktarlarda bile birçok metabolik süreci engelleyebilen bazı esansiyel olmayan metallerin (örneğin Cd, Pb ve Cr) yanında (Kennish 1992), fazlalığı da toksisiteye

neden olabilen bazı esansiyel iz elementler (örneğin Zn ve Cu) vardır (Campanella 2001). Alglerin hücre yüzeyleri, metal iyonları için yüksek afiniteye sahip ve esas olarak karboksilik, sülfhidril ve fosfat grupları nedeniyle net bir negatif yük taşıyan bir dizi fonksiyonel grup içerir (Crist 1990). Bu gruplar hücre zarından hücrenin içine metal iyonlarını taşıyan bağlayıcı bölgelerdir. Cu, Ni ve Fe, eşik konsantrasyonları aşıyorsa, alglar için toksik etkiye sebep olurlar. Cu bu metallerin en toksiklerinden biridir. Toksik metaller karbon fiksasyonunu engelleyebilir ve besin alımını geciktirebilir (Rai 1993). Bakır iyonlarının *Asgerionella glacialis* (deniz diatomu) ve *Chlorella pyrenoidosa* (tatlı su yosunu) 'da hem hücre bölünmesini hem de fotosentezi inhibe ettiği gözlenmiştir (Stauber ve Florence 1987).

#### **2.4. Isı şok yanıtı ve ısı şok proteinleri**

Isı şok yanıtı, ilk olarak, sineklerin ısı işleminden sonra *Drosophila melanogaster* kromozomlarının (heat shock puffs) özel bir bölümünün genişlediğini gözlemleyen Feruccio Ritossa (1962) tarafından keşfedilmiştir. Daha sonra bu kromozom segmentlerinin özel bir protein sınıfı olan ısı şok proteinlerini kodladığı anlaşılmıştır. *Drosophila* kromozomlarının puff bölgelerinde kodlanan proteinler, ilk kez Tissieres ve ark. (1974) tarafından tanımlanmış ve çevre sıcaklığındaki ani artışa bağlı olarak sentezlerinin artması nedeniyle “ısı şok proteinleri (HSPs)” olarak adlandırılmışlardır. Daha sonrada bu protein grubunun sadece çevre sıcaklığındaki artışa bağlı olarak değil, ağır metaller, oksidanlar, bakteriyel/viral enfeksiyonlar ve toksik kimyasallar gibi stres koşullarında da arttığı tespit edilmiştir (Morimoto 1998). O zamandan bu yana, çok sayıda araştırmacı ısı şok yanıtının bütün organizmalarda korunumlu olarak bulunduğunu ve organizmayı bu stres faktörlerine karşı koruduğunu göstermişlerdir (Lindquist 1986, Morimoto 1993, Jolly ve Morimoto 2000). Çevresel stresler hızlı ve doğrudan hasarlara veya sürekli ve dolaylı hasara neden olabilir. Stresin doğrudan hasar vermesi organizmayı kısa sürede etkileyen sorunlara neden olması şeklinde gerçekleşir. Stresin dolaylı yoldan hasar vermesi ise organizma için bir probleme neden olurken diğer yandan da organizmanın stresini uzatan ve hasarı artıran bu problemi çözmesini de engeller. Hasar görmüş bir fotosentetik mekanizma aynı zamanda bunun onarımını önleyen protein sentezinin inhibisyonuna da neden olur, bu dolaylı hasara bir örnek olarak verilebilir. (Allakhverdiev ve ark. 2008).

Isı şok proteinleri protein bozunma mekanizmasını hedefleyerek birçok sinyal transdüksiyon yolunu ayarlarlar (Hartl ve Hayer-Hartl 2002, Hartl ve Hayer-Hartl. 2009). Isı şok proteinlerinin (HSP'ler) uyarılması ile sonuçlanan ısı stresi yanıtı (HSR), ısı şok faktörlerinin (HSF'ler) aktivitesi ile transkripsiyonel seviyede düzenlenmektedir (Voellmy ve Boellmann 2007, Kotak ve ark. 2007, Akerfelt ve ark. 2010, Anckar ve Sistonen 2011, Mittler ve ark. 2012.). Memelilerde, ısı şok faktörleri (HSF), HSF genlerinin promotörlerindeki ısı şok elementlerine (HSE) bağlanarak nükleusta trimerizasyon, fosforilasyon ve translokasyon içeren çok adımlı işlemleri aktive eder (Morimoto 1998). Çoklu serin residülerinin hiperfosforilasyonu HSF'lerin transkripsiyonel olarak etkin hale gelmesini sağlar (Cotto ve ark. 1996). HSP'lerin indüklenmesi ise hücrenin HSF'sini inaktive ederek tepkinin hafifletilmesini ve protein homeostazisinin geri kazanılmasını sağlar (Shi ve ark. 1998). Yüksek bitkilerdeki HSF ailesinin en az 21 üyeli kompleksliği (Nover ve ark. 2001) bitkilerde ısı şok yanıtının (HSR) çözülebilmesini karmaşıklştırmıştır (Hahn ve ark. 2011). Buna karşılık *Chlamydomonas reinhardtii* ise tek bir standart HSF'ye sahip olması, bitki sınıfındaki A grubu HSF'lerinin tüm karakteristik özelliklerini sergilemesi ve HSR'nin kilit bir düzenleyicisi olması sebebiyle bitki ısı şok yanıtının temel prensiplerini incelemek için ilgi çekici bir modeldir (Schulz-Raffelt ve ark. 2007, Schmollinger ve ark. 2010).

HSR'nın ana ürünü, başlıca moleküler şaperon ve proteazlardan oluşan, ısı şok proteinleri (HSPs) olarak adlandırılan bir protein kümesidir. Isı şok proteinleri, moleküler ağırlığı ve fonksiyonu (örn., HSP100, HSP90 ve HSP70) referans alınarak sınıflandırılır ve gruplandırılır (Gerloff-Elias ve ark. 2006). HSP süper ailesi moleküler ağırlıklarına göre 6 majör aileye ayrılmıştır; HSP100s, HSP90s, HSP70s, HSP60s, HSP40s ve küçük HSPs (Westerheide ve Morimoto 2005). Bu proteinlerin bazıları sadece stres koşullarında mevcut olsa da, birçoğu protein biyogenezini ve protein homeostazisini korumaya çalışmaktadır (Hartl ve ark. 2011). Örneğin ısı stresi yokken HSPs büyük oligomerler şeklinde bulunurken ve ısı şokuna yanıt olarak birbirinden ayrılır ve hidrofobik yüzeyleri yanlış katlanmış proteinlere bağlanarak tehlikeli protein agregatlarının formasyonunu inhibe eder (Nakamoto ve Vigh 2007). Aynı zamanda hücre içinde sürekli bulunan ve diğer proteinlerin doğru katlanması ve birleştirilmesi gibi temel işlevlere yardımcı olan şaperon HSP'ler vardır. Bazı HSP'ler ise zararlı protein toplanmasını ve etkileşimlerini önlemeye yardımcı olurlar ve denatüre proteinler

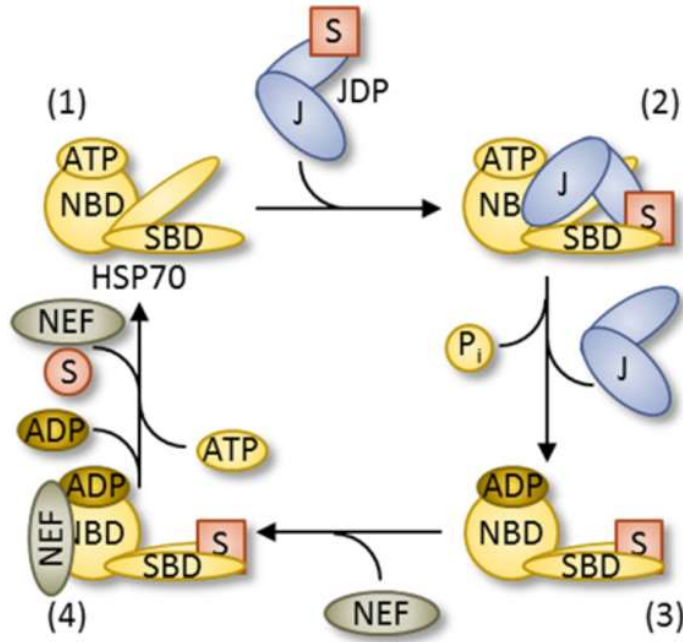
için kalkan görevi görürler. Bu HSP'ler diğer proteinlerle etkileşime girmez, stres sonrası proteinlere yeniden katlanma ve yeniden birleşme yönünde öncülük ederek strese girmiş hücrelerin onarımına yardımcı olurlar (Parsell ve Lindquist 1993). Hücrenin farklı çevresel streslere nasıl tepki verdiği konusunda bazı farklılıklar olsa da, yanıtlar arasında birçok ortak nokta ve etkileşim vardır. Örneğin bir hücrenin ısı stresi onarım mekanizmalarını doğru bir şekilde uyarması için bazen ışık gerekir, ancak yüksek ışık seviyeleri ısı stresinin zararını arttırabilir. Hücreler güçlü ışığa maruz kalmadan önce sıcaklığa karşı artmış termotolerans veya daha yüksek sıcaklıklara maruz kalmadan önce ışığa karşı artmış tolerans kazanabilirler (Allakhverdiev ve ark. 2008). Birçok farklı ısı şok proteini hücre fonksiyonunda önemli roller oynasa da, özellikle HSP70'lerin hücre stresinde önemli bir rolü olduğu tespit edilmiştir. HSP70 ailesinin üyeleri, hemen hemen tüm organizmalarda ve bir ökaryotik hücrenin her bileşeninde bulunurlar. Örneğin *C.reinhardtii*'de, tanımlanan üç HSP70 vardır: sitozolda bulunan HSP70A; kloroplastta bulunan HSP70B; ve mitokondride bulunan HSP70C (Schroda, 2004).

Moleküler şaperonlar yaşam döngüleri boyunca neredeyse tüm hücrel proteinleri yönlendirirler. Yeni oluşan zincirleri, ribozomdan ortaya çıktıkça kalabalık hücrel ortamdan korurlar. Çok domainli proteinlere özellikle nativ formlarına katlanırken yardımcı olurlar, protein komplekslerinin birleşme ve ayrılmalarına aracılık ederler, membrandan protein geçişlerini kolaylaştırırlar, protein agregatlarını parçalara ayırıp denatüre proteinleri nativ formuna geri döndürürler ve katlanamayan proteinleri proteolitik degradasyonu sağlayan mekanizmalara gönderirler. Bu nedenle, birçok şaperonun ısı şoku sırasında geri kazanılan protein homeostazisine ilişkin yürüttüğü özgün işlev, protein fonksiyonunu düzenleyerek birçok temel hücrel ve gelişimsel süreçte önemli roller oynamasıdır (Frydman 2001, Hartl ve Hayer-Hartl 2009).

#### **2.4.1. Isı şok proteini 70 ailesi (HSP70)**

HSP70 ailesinin şaperonları pek çok proteinin sadece stres koşullarında değil, aynı zamanda normal ortam koşullarında katlanmasına da yardım eder. Hücrelerde tanımlanan HSP70 sınıfının şaperonlarının protein kalite kontrolü için çeşitli fonksiyonları vardır. Yeni sentezlenmiş polipeptid zincirlerinin katlanmasına yardımcı

olur, hücre membranları boyunca proteinleri translokasyona sokar, protein komplekslerini birleştirir, parçalara ayırır veya değiştirir. Bir N-terminal ATPaz domaini (~45 kDa) ve bir C-terminali substrat-bağlama domaini (~25 kDa), tüm HSP70 proteinlerinin korunmuş çekirdeğini oluşturur. Substratlar ve ATPaz aktivitesi için afinite ise özel koşaperonlar tarafından düzenlenir (Şekil 2.5). ATP, ATPaz domaininin nükleotid bağlama cebine bağlandığında substrat bağlanma alanı substrata karşı ufak bir afinite ile açık konformasyona zorlanır. J-domain proteinleri (JDP) olarak adlandırılan koşaperonların özgün bir sınıfı ise HSP70'ler için yüksek afiniteye sahiptir. Bu koşaperonlar kendi substratlarına bağlanır, katlanmaya yardımcı olmak için HSP70 koşaperonlarına transfer edilir ve böylece HSP70'ler ile etkileşime girer. JDPs'in geniş substrat yelpazesini organize ettiği ve sonuç olarak da HSP70'lerin fonksiyonlarını belirlediği düşünülmektedir. JDPs, HSP70'lerin substrat bağlama domainine farklı substratlar sağlamasının yanı sıra HSP70'lerin ATPaz aktivitesini de stimüle eder. ATP'nin hidrolizi HSP70'leri kapalı bir konformasyona doğru değişikliğini indükler. Bu konfigürasyon, substratın sıkı bir şekilde bağlanmasına yol açar. ADP durumunda, koşaperonların ikinci önemli sınıfı olan nükleotid değişim faktörleri (NEF) HSP70'ler için yüksek bir afinite sergilemektedir. Birkaç NEF türü, bakteriyel GrpE, ökaryotik Bag1, Bag2, Hsp110 / Grp170 ve HspBP sınıfı olarak tanımlanabilir. Tüm NEF'ler, ATPaz domaininin benzer yapılarını stabilize ederek ADP salınım hızını ve HSP70'lerin ATP bağlamasını arttırmaktadır.



**Şekil 2.6.** HSP70'lerin fonksiyonel döngüsü:

Öncelikli olarak ATP HSP70'in nükleotid bağlayan domainine bağlanır, Substrat bağlayan domain (SBD) açık konformasyondadır(1). J-Domain proteinleri (JDP) katlanmamış substratları (S) HSP70'lerin SBD'sinin bünyesine katar (2). ATP hidrolizi substrata sıkı bağlanmayı sağlar (3). Daha sonra bağlanan Nükleotid değişim faktörleri (NEF) ATP tarafından ADP'nin yerdeğiştirmesini ve katlanmış substratların salınımını indükler.

Genel olarak, HSP70'lerin substratları, bazik amino asitler ile desteklenen 4-5 amino asit uzunluğunda bir hidrofobik parça ile tanınır. Gömülü hidrofobik çekirdekler protein katlamasının önemli bir itici gücünü oluşturur, HSP70'lerin bağlanmalarını sağlar. HSP70s'ler kloroplast dahil olmak üzere ökaryot hücrenin tüm bölümlerinde bulunur. Geçmişte, araştırmalar özellikle mitokondri, sitozol ve ER'ye yoğunlaşmıştır, özellikle stromadaki plastidik HSP70sleri anlamak içinse çok az araştırma gerçekleştirilmiştir (Schroda 2004). Şimdiye dek en iyi çalışılmış HSP70 sistemi *C.reinhardtii*'de gerçekleştirilmiştir (Nordhues ve ark. 2010). *C.reinhardtii*'de stromada lokalize olan sadece bir adet majör HSP70 bulunmaktadır ve HSP70B olarak isimlendirilmiştir (Drzymalla ve ark. 1996).

*Chlamydomonas*'ın kloroplastında en az beş farklı J-domain proteinleri vardır ve bunlar 1'den 5'e kadar DnaJ homologları (CDJ) olarak adlandırılırlar. Bu proteinlerden dördü daha fazla ilgi çekmiştir. CDJ1, JDP sınıf I içerisinde gruplanır ve J-domainine ek olarak glisin ve sisteince zengin bölgeler ve dört çinko domain ihtiva eder. Sınıf I JDP'lerin genellikle katlanmamış substratlar ulaştırdığına ve geniş bir substrat spektrumuna sahip olduğuna inanılmaktadır. CDJ1'in aksine, CDJ2 glisince ve çinko domainleri açısından zengindir ve bu nedenle de J domain proteinleri sınıfı içinde gruplanırlar. CDJ2, VIPP1 ile spesifik bir fonksiyona sahip bir JDP gibi görünmekte ve HSP70B'ye önde gelen bir substrat olarak sunulmaktadır. VIPP1, hücrede monomerler, dimerler ve yüksek molekül ağırlıklı oligomerler olarak mevcuttur. Yaklaşık 28-37 nm çapında çentik halkalar şeklinde olup çubuk şeklindeki komplekslere monte olabilir. HSP70B'nin, bu oligomerik komplekslerin montajını ve demontajını katalize ettiği gösterilmiştir. CDJ3-5 ise JDP sınıf III proteinleridir, fakat J-domainine ek olarak bir 4Fe / 4S kümesini barındıran bir bakteriyel ferredoksin domaini içerir. HEP2 ise HSP70B'nin kloroplast içerisine taşınmasında ve nativ forma katlanmasında gereklidir. Bunun tersine, mitokondriyal homolog HEP1, ATPaza ve ADP durumundaki HSP70s mitokondriyal bağlayıcı domainlerine bağlanır ve şaperon döngüsü sırasında kendi kendine agregasyonunu önler (Sichting ve ark. 2005, Blamowska 2010). HSP70B'nin HSP90 sınıfı bir şaperon olan HSP70C ile etkileştiği de bulunmuştur. Hücrenin diğer bölümlerinde, özellikle ER ve sitozol, HSP70-HSP90 kompleksleri oldukça fazla bulunur ve özellikle, reseptörler, transkripton faktörleri ve kinazlar gibi sinyallemede yer alan proteinlerin düzenlenmesi için önemlidirler (Pratt ve Toft 2003).

#### **2.4.2. Isı şok proteini 60 ailesi (HSP 60)**

Tip I şaperoninler olarak da adlandırılan Hsp60 ailesinin şaperonları, bakterilerde, mitokondri ve kloroplastlarda bulunur. Her biri yaklaşık 60 kDa'lık yedi alt birim içeren iki yığılmış halka halinde toplanırlar. Bakterilerde, şaperonin, GroEL olarak adlandırılırken, plastid ve mitokondriyal formlar, ısı şoku ile indüklenebilirliği hesaba katılarak Cpn60 veya Hsp60 olarak adlandırılır (Viitanen ve ark. 1995). Şaperonin, bakteri içinde GroES olarak adlandırılan 10-kDa alt ünitelerden meydana gelir. Mitokondri ve plastidlerde ise Hsp10 ve Cpn10'dan oluşan bir heptamerik halkadan oluşturan bir koşaperonin ile işbirliği yapar. Bakteriler ve mitokondriler sadece bir tür

şaperonin ve koşaperonin içerirken, plastidler çeşitli tiplere sahiptir. Tetradekamerik çift halkanın 60-kDa alt birimin sadece yaklaşık %50 özdeşliği paylaşan a veya b tipi olabilir. b-alt birimleri, homotetradekamerlere otomatik olarak parçalanabilirken, a-altbirimleri sadece b-alt birimlerinin varlığında oligomerize olur (Dickson ve ark. 2000). İki tip koşaperoninin geleneksel Cpn10 (Koumoto ve ark. 2001) ve bir 21 kDa alt birimi veren iki Cpn10 domaininin baştan sona füzyonu olarak tarif edilen Cpn20'den meydana geldiği belirtilmiştir (Bertsch ve ark. 1992). Protein katlanması şaperonin ve koşaperonin halkaları tarafından oluşturulan kapalı boşluk içinde ATP bağımlı aktif-bağlanan ve aktif-katlanmış durumlar arasında gerçekleşir. Şaperoninler tarafından katlanmayı gerektiren en ünlü kloroplast proteini, Rubisco büyük alt birimi olarak bilinir (Boston ve ark. 1996).

#### 2.4.3. Düşük moleküler ağırlıklı ısı şok proteinleri (SmHSPs)

Küçük ısı şok proteinlerinin moleküler ağırlığı 15 ile 42 kD arasında değişmektedir (Al-Whaibi 2011). Küçük ısı şok proteini (sHSP) süper familyasına ait proteinler, dizi ve boyutta çeşitlilik gösterse de, karakteristik özellikleri şu şekildedir;

- (i) ~ 90 amino asit kalıntısı olan korunmuş bir  $\alpha$ -kristalin domaininden oluşur,
- (ii) büyük oligomerlerden oluşmuştur,
- (iii) dinamik bir kuaterner yapıya sahiptir,
- (iv) protein agregasyonunu baskılayan stres koşulları ve şaperon aktivitesi ile indüklenir (Haslbeck ve ark 2005).

sHSP'ler ısı şoku ile kuvvetli bir şekilde uyarılır ve kısmen denatüre olmuş proteinleri bağlar, böylece stres sırasında geri dönüşü olmayan protein agregasyonunu önler. sHSP'lerin en karakteristik özelliklerinden biri, büyük oligomerik yapılar olarak organize olma yetenekleridir (Haslbeck ve ark 2005). Genellikle fizyolojik koşullar altında bitki hücrelerinde bulunmayan sHSP' ler, kuraklık, tuzluluk, okside türler ve düşük sıcaklıklar dahil olmak üzere stres ile uyarılır (Sun ve ark 2002). Protein agregatlarındaki sHSP'lerin varlığı kompleksleşmiş ve denatüre olmuş proteinlerin nativ durumlarına geri dönüşünü katalize eden ClpB ve HSP70 gibi ATP'ye bağlı şaperonlara erişimi kolaylaştırmayı sağlar (Mogk ve ark. 2003). *Arabidopsis* en az 19 sHSP'ye sahiptir (Scharf ve ark. 2001). *Chlamydomonas*'daki sHSP'ler, *Arabidopsis*'teki sHSP'lerden herhangi birine göre daha homologdur, bu da çeşitliliğin, alg ve atalarının



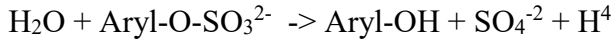
ayrışmasından sonra meydana geldiğini düşündürmektedir (Schroda 2004, Waters ve Rioflorido 2007, Waters ve ark. 1996). Buna karşılık, *Chlamydomonas*'daki HSP60/HSP10, HSP70/HSP70 koşaperonları ve HSP100 ailelerinin üyeleri, aynı hücre içi lokalizasyondaki *Arabidopsis* homologları ile diğer kompartmanlarda bulunan diğer ailelerine kıyasla daha yakından ilişkilidir (Schroda, 2004). Bunun sebebi, organel şaperon aileleri ele alındığında, mitokondri ve kloroplast genlerinin purple bakteri ve siyanobakteri atalarından aktarılan genlerden türetilmiş olmalarından ileri gelmektedir.

#### 2.4.4. Diğer ısı şok proteinleri

HSP90 sınıfı proteinler yaklaşık 80 ila 94 kDa arasında değişir. HSP90'ın sitoplazmik formlarına ek olarak, omurgalılar glukoz açlıklarına yanıt olarak eksprese olan bir ER-lokalize homologuna (GRP94 olarak da adlandırılır) sahiptir. *E. coli*'de HtpG geninin ürünü olan bir homologu ise ökaryotik HSP90'larla % 40 amino asit benzerliği göstermektedir (Lindquist ve Craig 1988). Son zamanlarda HSP90 ile homolojiye sahip proteinleri kodlayan genler bitkilerden de izole edilmiştir. Mısır, *Brassica* ve *Arabidopsis* HSP90 genlerinin DNA dizi analizi, proteinlerin diğer ökaryotlardan yaklaşık %70 oranında HSP90 ile aynı olduğunu göstermiştir (Neumann ve ark. 1989, Conner ve ark. 1990). Bitkilerde HSP90 proteini ile ilgili nonspesifik çalışmalar yapılmıştır. In vivo isaretili bitki dokularında toplam protein profillerinde kolaylıkla tanımlanabilir ve lizise uğramış hücrelerin çözünebilir fraksiyonunda geri kazanılabilir (Cooper ve Ho 1987, Lin ve ark. 1984, Neumann ve ark. 1989). Diğer ökaryotlarda, HSP90, strese girmemiş hücrelerin bol bulunan bir bileşenidir ve stres sırasında artar. HSP90 steroid hormon reseptörleri ile ilişkili olarak izole edilen memeli hücrelerinde yaygın olarak çalışılmıştır (Lindquist ve Craig 1988). Mevcut bir HSP90 fonksiyonu modeli hücrenin uygun reseptör aktive edici sinyalleri alana kadar bu reseptörleri (ve muhtemelen diğer proteinleri) spesifik konformasyonda muhafaza ettiğini göstermektedir (Lindquist ve Craig 1988, Rothman 1989, Schlesinger 1990). Bitkiler dahil olmak üzere birçok ökaryot çözünebilir bir hücresel yapı olan yaklaşık 110 kDa'lık bir yüksek moleküler ağırlıklı HSP'yi sentezlemektedir (Cooper ve Ho 1987). Bitkilerde, HSP110 sentezi diğer HSP'lerden daha geçicidir; en çok sentez esas olarak ısı stresinin ilk saatiyle sınırlıdır (Nagao ve ark. 1986).

## 2.5. Duyarlı bir raportör gen olarak arilsülfataz

Arilsülfataz enzimi, sülfatı aromatik bileşiklerden ayıran periplazmik bir enzimdir. Topraklardaki kükürtün %40'ından fazlası organik ester formundadır ve bunların yarısını arilsülfatlar oluşturmaktadır. Arilsülfatazlar, sülfat esterlerini hidrolizleyerek sülfat mineralizasyonunu gerçekleştirdiğinden oldukça önemlidir. Arilsülfataz (EC3.1.6.1)'ın katalizlediği hidroliz reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Açığa çıkan sülfat yüksek yapılı bitkiler ve toprak mikroorganizmalarının kullanımına hazır hale gelir. Sülfür yoksunluğuna yanıt olarak üretilen arilsülfataz *Neurospora crassa* ve *Aspergillus nidulans* gibi birçok ökaryotik organizmada ve siyanobakterileri de içeren birçok farklı bakteride tanımlanmıştır. Arilsülfataz ilk kez Hostos ve ark (1989) tarafından klonlanmış, periplazmik bir enzimdir. Arilsülfataz 67,6 kDa büyüklüğünde olup plazma membranı veya hücre duvarı ile ilişkidir ve hücre duvarından yoksun hücrelerde çevre ortamına neredeyse tamamen salgılanmaktadır (Hostos ve ark 1988) Aktivitesi tüm hücrelerde kromojenik substrat 5-bromo-4-kloro-3-indolil sülfat (XS04) ile kolayca test edilebilir, ürün mavi bir bileşiktir.  $\alpha$ -naftilsülfat ve ajan olarak bir diazonyum tuzu kullanılmasına dayanan 250 kat daha hassas bir kantitatif aktivite tayin yöntemi de geliştirilmiştir. Bu yöntemle göre 540 nm absorbansta kolaylıkla aktivite ölçmek mümkündür (Ohresser ve ark 1997).

Birçok alg gibi *C.reinhardtii* de çeşitli beslenme streslerine uyum sağlama kapasitesine sahiptir. Periplazmik, karbonik bir anhidraz üreterek ve inorganik karbon taşınım seviyesini yükselterek düşük CO<sub>2</sub>'e cevap verir. Fosfat yoksunluğuna cevaben de *Saccharomyces cerevisiae* gibi, çevreden fosfat almak için periplazmik fosfatazları salgılar. Sülfat yoksunluğu koşulları altında bölünmeyi durdurur, büyür, nişasta biriktirir, arilsülfataz üretir ve sülfatın daha hızlı taşınması için kapasitesini artırır (Hostos ve ark 1988).

*C.reinhardtii*'de mikroorganizmaya yabancı olan genlerin ekspresyonunda karşılaşılan zorluklar ve güçlü promotör sistemlerinin eksikliği, *C.reinhardtii*'deki moleküler

gelişmenin önündeki en büyük dezavantaj olmuştur. *C.reinhardtii*'ye yabancı raportör genlerin ve seçici işaretçilerin (selectable markers) kullanımı problemlere neden olmaktadır. Bu problemlerin çözümü için *Chlamydomonas*'ın kendi genleri seçici işaretçi (ARG7) ve raportör gen (ARS) olarak kullanılmıştır (Davies ve ark 1992, Ohresser ve ark 1997).

## 2.6. $\beta$ -Tübülin

$\beta$ -aktin (ACT), gliseral-dehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), 18S ribozomal RNA (18SrRNA), 25S ribozomal RNA (25SrRNA), poliubikuitin (UBQ), ubikuitin konjugatörü UBC gibi referans genler (housekeeping genes) birçok ekspresyon profili çıkarma çalışmalarında birçok bitki türünde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, referans genlerinin ifadesinin farklı deneysel koşullara ve ürünlere bağlı olarak değişebileceğini belirten çok sayıda çalışma vardır (Sinha ve ark. 2015). *C.reinhardtii*'de ise referans gen olarak sıklıkla kullanılan genlerden biri  $\beta$ -Tübülin'dir. Tübülin genleri bugüne kadar incelenen çoğu ökaryot multigen ailelerinde bulunur. Gen ailelerinin fonksiyonel önemi organizmadan organizmaya değişmektedir. Bazı durumlarda, çoklu genlerin varlığı, ailedeki bireysel genler için özel kontrol mekanizmalarının gelişmesine izin vermiştir. *Drosophila melanogaster*, tavuk ve sıçan dahil olmak üzere çok hücreli organizmalarda, çeşitli tübülin genleri dokuya veya gelişimsel aşamaya özgü ekspresyon sergiler. *C.reinhardtii*'de mikrotübüllerin ana bileşenidir. Biri beta zincirindeki değişebilir bir bölgeden, diğeri ise alfa zincirindeki değişmeyen bir bölgeden bağlanmak üzere. 2 mol GTP'ye bağlanır. *C.reinhardtii*'de  $\beta$ -1 ve  $\beta$ -2 olmak üzere 2  $\beta$ -tübülin geni vardır ve bunlar aynı proteini kodlar (Anonim, 2019).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Algal suşlar, bakteriyel suş ve plasmidler

Çalışmada Kaiserslautern Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoteknoloji ve Sistem Biyolojisi Bölümü (Kaiserslautern, Almanya) Prof.Dr. Michael Schroda'dan temin edilen 2 adet algal suş (cw15-302 ve C124) ve 3 adet plasmid (pCB412, pJD55, pCB803) kullanılmıştır. Bu plasmidler  $\beta 2TUB-ARS$  (BetaTubulin promotorlu Arilsülfataz) ve  $HSP70A-ARS$  (Heat Shock Protein70A (ısı şok protein70A) promotorlu Arilsülfataz) içermektedir.  $\beta 2TUB$  referans gen olarak kontrol amaçlı kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Ligasyon ürünlerinin çoğaltılması için kompetent *E.coli* DH5 $\alpha$  hücreleri (C2987I-NEB, ABD) kullanılmıştır (Kostner 2006).

**Çizelge 3.1.** Çalışmada kullanılan *C.reinhardtii* suşlarının ve plasmidlerin özellikleri

	<b>Karakteristik Özellikleri</b>	<b>Referans</b>
cw15-302	Hücre duvarı hasarlı suş ( <i>arg7</i> )	M. Schroda (Kaiserslautern Teknik Üniversitesi, Almanya)
C124 (kontrol)	Hücre duvarı olan suş	M. Schroda (Kaiserslautern Teknik Üniversitesi, Almanya)
pCB412	<i>ARG7</i> işaretçi gen içeren plasmid	(Schroda ve ark. 1999)
pJD55	$\beta 2TUB-ARS$ içeren plasmid (Sürekli ifade edilebilir)	(Schroda ve ark. 2000)
pCB803	<i>HSP70A-ARS</i> içeren plasmid (Isıyla İndüklenebilir)	(Schroda ve ark. 2000)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kültür şartları

Algal suşlar Tris-Asetat Fosfat (TAP) besiyerinde 150rpm çalkalamalı hızına sahip inkübatörde 23°C’de florasan lambalarla sağlanan sürekli beyaz ışık altında (1 000 lux, 14  $\mu\text{molE.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) üretilmiştir. Cw15-302 suşunun olduğu besiyerine 100mg/ml arjinin eklenmiştir.

*E.coli*, Luria-Bertani (LB) besiyerinde 37°C’de 150 rpm çalkalama hızına sahip inkübatörde üretilmiştir.

Çalışmada kullanılan besiyerlerinin içerikleri Çizelge 3.3’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri.

TAP (Tris-asetat fosfat)	5L
20 mM tris	12,1g tris base
7,5 mM NH <sub>4</sub> Cl	
0,34 mM CaCl <sub>2</sub>	125ml beijerinck tuzlar
0,41mM MnCl <sub>2</sub>	
1mM KPO <sub>4</sub>	5ml 1M KPO <sub>4</sub> pH7
184 $\mu$ M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
77 $\mu$ M ZnSO <sub>4</sub>	
26 $\mu$ M MnCl <sub>2</sub>	
18 $\mu$ M FeSO <sub>4</sub>	5ml iz element solüsyonu
7 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub>	
6 $\mu$ M CuSO <sub>4</sub>	
1 $\mu$ M (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	
17,5 mM asetik asit (asetik asit ile pH 7.0’a ayarlanır)	5 ml asetik asit
LB (Luria-Bertani (LB) broth)	g.L <sup>-1</sup>
Bacto-tripton	10
Yeast ekstrakt	5
NaCl	10
Agar	15

### 3.2.2. Plasmidlerin *E.coli* hücrelerine transformasyonu

Kompetent *E.coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine plasmidlerin transformasyonu Kostner (2006)'e göre gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 40 $\mu$ l *E.coli* DH5 $\alpha$  hücrelerine herbir plasmidden 1  $\mu$ l aktarılmıştır. 1 $\mu$ l içerisinde toplamda 100ng plasmid DNA'sı bulunmaktadır (plasmid DNA'sının konsantrasyonunu belirleme yöntemi için bkz 3.2.3.). Plasmid ve *E.coli* içeren solüsyonlar 4-5 kez hafifçe pipetaj yapılmış, buzda 30dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler kuru blokta (166-0562-BIORAD) 42°C'de 15 saniye boyunca ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra buz dolu bir kaba alınarak 5 dakika boyunca tutulmuştur. Buzda inkübe edilen ve plasmidleri başarılı bir şekilde içine aldığı düşünülen *E.coli* hücrelerinin üzerine 950 $\mu$ l SOC besiyeri (B9020S-NEB, ABD) eklenmiş ve kuru blokta 37°C'de 60 dakika beklenmiştir. Hızlı bir şekilde vorteksleme yapıldıktan sonra kültürden seri dilüsyonlar yapılarak seçici işaretçi olarak 100 $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> amfisilini içeren Lysogeny Broth<sub>Amp</sub> (LB<sub>Amp</sub>) katı besiyerine her bir dilüsyondan 100 $\mu$ l alınarak drigaski ile nazikçe yayılmış ve 24 saat 37°C'de etüvde (Memmert INE 500) inkübasyona bırakılmıştır. Bu seçici besiyerinde koloni şeklinde gelişen bakteriler ilgili plasmid DNA'sını içine almış bakteriler olarak değerlendirilmiştir.

### 3.2.3. Plasmidlerin *E.coli*'den izolasyonu ve konsantrasyonunun belirlenmesi

Plasmid DNA'yı içeren *E.coli* kolonisi öze yardımıyla alınarak 24 saat boyunca 37°C 5ml LB<sub>Amp</sub> besiyeri içeren deney tüplerinde 150rpm'de inkübasyona bırakılmıştır. Üremesi gerçekleşen *E.coli* hücrelerinin çoğalmasıyla birlikte her bir plasmidin (PCB412, PDJ55, PCB803) de çoğaltılması gerçekleşmiştir. Daha sonra her bir plasmid *E.coli* hücrelerinden NucleoSpin®RNA Plant (740588.50-Macherey Nagel, Almanya) kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzole edilen plasmidler DNA'larının konsantrasyonunu belirleyebilmek için UV-Vis spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Spektrofotometre cihazının sensör kısmına plasmid izolasyon kitinde bulunan elüsyon tamponundan 1,5 $\mu$ l damlatılarak cihaz kalibre edilmiştir. Daha sonra plasmid DNA örneklerinden 1,5 $\mu$ l alınıp sensör üzerine damlatılmış ve her bir plasmidin konsantrasyonları tayin edilmiştir. Plasmid DNA örneğinin kalitesini belirleyebilmek için OD<sub>260/280</sub> 1,8-2,0 arasında olması gerektiği göz önünde

bulundurulmuştur. 3.2.9’da belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforezi ile plasmidlerin saf bir şekilde izole edilmediğinin kontrolü yapılmıştır.

#### **3.2.4. Plasmidlerin *C.reinhardtii*’ye transformasyonu ve rekombinant suşların eldesi**

Hücre duvarı hasarlı suş olan cw15-302 (*arg7*<sup>-</sup>) 500ml’lik erlenlerde 150ml TAP besiyerine 0,22 filtreden geçirilmiş 100mg/ml arjinin eklenmiş ve üreme OD<sub>540</sub>’si 1,0 (~10<sup>6</sup> hücre/ml)’e gelene kadar sürekli ışık altında 150rpm ve 23°C’de inkübasyona bırakılmıştır. Başarılı bir kotransformasyon için her bir plasmid DNA’sı ilgili plasmide özgü restriksiyon enzimleri ile lineer (düz) hale getirilmiştir. Restriksiyon enzimleri olarak pCB412 için EcoRI (R3101S-NEB, ABD), pJD55 ve pCB803 plasmidleri için KpnI (R3142S-NEB, ABD) kullanılmıştır. 4 000 ünite olan enzimden 1µl alınarak 1µg plasmid DNAsı eklenmiş, 5µl 10X enzim tamponu eklendikten sonra nukleaz içermeyen ddH<sub>2</sub>O ile toplam reaksiyon hacmi 50µl’ye tamamlanmış, 1 saat boyunca 37°C’de kuru blokta reaksiyonun tamamlanması beklenmiştir. Reaksiyon sonucunda düz hale getirilen plasmidler 3.2.9’da belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforezi ile plasmidlerin restriksiyon enzimleri ile kesilip kesilmediğinin kontrolü yapılmıştır.

Cam boncuk transformasyon metodu (Glass bead transformation method) ile transformasyon gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir lineer plasmidin cw15-302 suşuna transformasyonu için cam boncuklar kullanılmış ve öncesinde boncuklar kromosülfürik asitle yıkanarak nötralize edilmiştir. Bu boncuklardan 300mg, 2ml’lik reaksiyon tüpleri içine alınarak otoklavda (121°C, 15 dk.) steril edilmiştir. OD<sub>540</sub>’si 1,0 olan cw15-302 (*arg7*<sup>-</sup>) kültürünün 25 mL’si santrifüj edilmiş (3500rpm, 5dk, 23°C) ve pelet 350 µl arjinin içermeyen TAP besiyerinde resüspanse edilmiştir. Süspanse kültür steril 300mg cam boncuk içeren 2ml’lik reaksiyon tüplerine konulmuştur. Daha sonra reaksiyon tüplerine kotransformasyon başına 1µg lineer hale getirilmiş plasmid DNA’ları eklenmiştir (pCB412, pJD55 [5:1-5:5] ve pCB41, pCB803 [5:1-5:5]). Lineer plasmidlerin birleşmelerini engelenmek amacı ile plasmid solüsyonları tüpün karşılıklı cidarından eklenmiştir. Daha sonra reaksiyon tüpleri 15 saniye yüksek hızda vortex cihazı ile karıştırılmıştır. Reaksiyon tüpündeki hücreler agarlı arjinin içermeyen TAP besiyeri içeren petri kaplarına drigaski ile nazik bir şekilde yayılmıştır. Petri kapları

23°C’de florasan lambalarla sağlanan sürekli beyaz ışık altında (1 000 lux, 14 µmol. E.m-2s-1) 2-3 hafta boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Petri kabında gözle görülebilir büyüklükteki koloniler arjinin içermeyen TAP besiyerleride 24 saat, 23°C’de üretilmiştir. Kalitatif olarak aril sülfataz aktivitesi kontrol edilmiştir. Bunun için ARS (+) transformantların oda sıcaklığında sürekli ışık altında (CL) ve 40°C’de 30 dakika ısı şokuna (HS) maruz bırakıldığındaki ARS aktivitesi değerleri saptanmıştır. Elde edilen verimli transformantlar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere sürekli ışık altında her 15 günde pasajlanarak inkübasyonla devamlılığı sağlanmıştır.

### **3.2.5. Rekombinant suşlarda üremenin, arilsülfataz enzim aktivitesinin ve klorofil miktarının belirlenmesi**

#### **3.2.5.1. Arilsülfataz enzim aktivitesinin kalitatif tayini**

Arjininsiz TAP agar besiyeri içeren petri kaplarının üzerine naylon membran yerleştirilmiş, transformantlar bu membran üzerine çizgi ekim yöntemi ile ekilmiş ve sürekli ışık altında 2-5 gün inokülasyonu sağlanmıştır. Üreme gösteren transformantların seçimi için steril pensle kaldırılan membranın altyüzeyine 10mM Tris-HCl içerisinde 5mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl sulfat (X-SO<sub>4</sub>) (pH7.5) olan solüsyonu spreylene ve oda sıcaklığında 1-24 saat bekletilmiştir (Davies ve ark. 1992). Isıyla indüklenebilir klonlarda (pCB412 ve pCB803 plasmidleri içeren) ARS(+) olanların tespiti ancak 15dk boyunca 40°C’de ısı şokuna maruz bırakıldıktan sonra tespit edilmiştir. Ortaya çıkan mavi renk arilsülfataz aktivitesinin varlığını gösterdiğinden dolayı bu klonlar ARS(+) olarak değerlendirilmiştir. ARS(+) sonuç gösteren klonlar pCB412 ve pJD55 plasmidlerini içermektedir.

#### **3.2.5.2. Arilsülfataz enzim aktivitesinin kantitatif tayini**

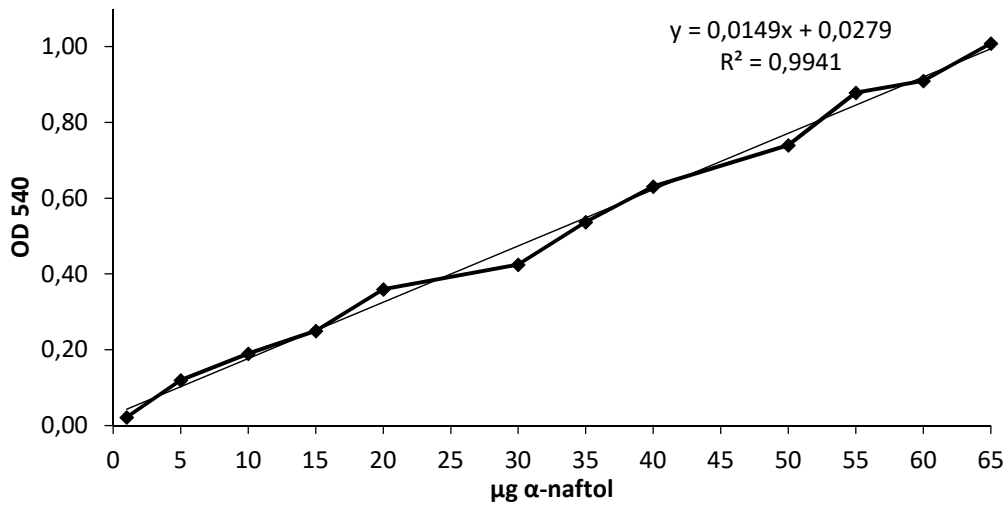
Sıvı kültürde ARS enzim aktivitesi ise Ohresser ve ark. (1997)’nin belirlediği yöntemle göre ölçülmüştür. Bu amaçla 30ml TAP besiyeri içeren 100 ml’lik erlenlere test edilmek istenen klonların inokülasyonu gerçekleştirilmiş ve hücre yoğunluğu yaklaşık ~10<sup>6</sup> hücre/ml’ye ulaşana dek birkaç gün inkübe edilmiştir. Enzim aktivitesinin belirlenmesi için 1ml kültür, önceden soğutulmuş 1,5ml plastik reaksiyon tüpüne alınmış ve 4°C, 12 500 rpm’de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifügasyon sonrası



süpernatant ham enzim (arilsülfataz) çözeltisi olarak kullanılmıştır. Süpernatanttan 400µl alınmış ve içerisinde 10µl 1M İmidazol, 80 µl Glisin-NaOH tamponu (2,5M Glisin içeren, NaOH ile pH 9.0'a ayarlanmıştır) ve 10 µl α-naftil sülfat tuzu bulunan 1,5ml plastik reaksiyon tüplerine eklenerek vortekslenmiş ve 1 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Enzim reaksiyonu 500µl durdurma solüsyonu (0,2M Sodyum Asetat ve %4 SDS solüsyonu Asetik Asit ile pH 4.8'e ayarlanmıştır) ile durdurulmuştur. Daha sonra, örneklere 10µl Fastbluesalt B solüsyonu (10mg/ml Fastbluesalt B) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Örnekler TAP besiyerine karşı OD<sub>540</sub>'da spektrofotometre ile ölçülmüştür. Enzim aktivitesi herbir örnekteki klorofil konsantrasyonuna göre standardize edilmiştir.

Arilsülfataz aktivitesi 37°C'de 1 saatte oluşan α-naftol konsantrasyonunun toplam klorofil miktarına göre belirlenmesi (µg α-naftol/µg klorofil x saat) ile saptanmıştır. Standart eğri α-naftol'ün farklı konsantrasyonları 1-65µg/mL kullanılarak hazırlanmıştır. Spektrofotometrik olarak OD<sub>540</sub>'da ölçülmüştür. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği lineer regresyon analiziyle çizilerek konsantrasyonu bilinmeyen örneğin α-naftol konsantrasyonu, standart grafiğinden elde edilen doğru denkleminin formülünden hesaplanmıştır (Şekil 3.2).

Eğri denklemi “ $y = 0,0149x + 0,0279$ ,  $R^2 = 0,9941$ ” olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.1. Arilsülfataz standart eğri grafiği

Kantitatif çalışma sonucunda sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenabilir örneklerden en iyi arilsülfataz aktivitesi gösteren birer adet transformant suş seçilmiş ve çalışmalara bu suşlar ile devam edilmiştir.

### 3.2.5.3. Klorofil konsantrasyonunun belirlenmesi

Klorofil konsantrasyonunun belirlenmesi Porra vd (1989)'e göre yapılmıştır. Klorofil konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla 200µl kültür örneği alınarak üzerine 800 µl %80lik aseton eklenmiş, vortekslenmiş ve örnek -20°C'de en az 30dk boyunca depolanmıştır. -20°C'den alınan örnekler 13 200rpm'de 3dk boyunca santrifüjlenmiştir. Süpernatant absorpsiyonu quartz küvette 750nm, 663nm'de spektrofotometrede ölçülmüş ve klorofil konsantrasyonu aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$\text{Chl}_{\text{total}} = \text{Chl}_a + \text{Chl}_b = [(A_{645} \times 0.01776) + (A_{663} \times 0.00734)] \times \text{seyreltme faktörü}$$

### 3.2.5.4. Üremenin belirlenmesi

Deneylerde kullanılacak hücre miktarının belirlenmesi amacıyla *C.reinhardtii*'nin 550nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu ölçüm mikroalg biyoması hakkında bilgi vermektedir. Tipik olarak 550nm'de optik densite (OD) değeri 1.0 olan kültür ~10<sup>6</sup> hücre/ml'yi göstermektedir (Li ve ark. 2015).

## 3.2.6. Fiziksel ve kimyasal parametrelerin ısı şok yanıtına etkisi

### 3.2.6.1. Isı stresi

Isı stresi çalışmaları Schroda ve ark (2000)'a göre yapılmıştır.

Isı şok kinetikleri denemeleri için 23°C'de sürekli ışık (CL) 1 500 Lux ve 150 rpm'de sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşlarının 3.2.5.4.'deki gibi hücre miktarı belirlenmiştir. Daha sonra toplamda ~10<sup>8</sup> hücre oda sıcaklığında 3500rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelet çalışmada kullanılmıştır. 100ml'lik erlenlerdeki 30ml TAP besiyerine peletler aktarılmıştır. Pelet besiyerine ilave edilir edilmez kronometre çalıştırılmış ve kinetik denemeleri yapılmıştır. Stres uygulanması 35, 37, 40, 42°C'de su banyosunda farklı periyodlar boyunca (0 (Kontrol), 1dk, 5dk, 10dk, 20dk, 30dk, 1sa, 2sa) yapılmıştır. Herbir çalışma

sonucunda örneklerde ARS aktivite tayinleri yapılmıştır. 0.dakika kontrol olarak alınmış ve elde edilen aktivite değerleri buna göre değerlendirilmiştir.

### **3.2.6.2. Işık stresi**

Işık stresi çalışmaları Nowicka ve Kruk (2012)'a göre yapılmıştır.

Işık şiddetinin etkisini incelemek için 23°C'de sürekli ışık (CL) 1 500 Lux ve 150 rpm'de sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşları 3.2.5.4.'deki gibi hücre miktarı belirlenmiştir. Daha sonra toplamda  $\sim 10^8$  hücre oda sıcaklığında 3 500rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelet çalışmada kullanılmıştır. 100ml'lik erlenlerdeki 30ml TAP besiyerine peletler aktarılmıştır. Besiyerindeki hücreler 0-10 000 Lux arasındaki farklı aydınlatmalar ve farklı periyodlar boyunca (0 [kontrol], 2, 6, 12, 24 saat) ışık stresine maruz bırakılmıştır. Herbir çalışma sonucunda örneklerde ARS aktivite tayinleri yapılmıştır. 0.dakika kontrol olarak alınmış ve elde edilen aktivite değerleri buna göre değerlendirilmiştir.

### **3.2.6.3. UV-B radyasyonu**

UV-B radyasyonun çalışmaları Liu ve ark. (2010)'ına göre yapılmıştır.

Işık şiddetinin etkisini incelemek için 23°C'de sürekli ışık (CL) 1 500 Lux ve 150 rpm'de sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşları 3.2.5.4.'deki gibi hücre miktarı belirlenmiştir. Daha sonra toplamda  $\sim 10^8$  hücre oda sıcaklığında 3 500rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelet çalışmada kullanılmıştır. 100ml'lik erlenlerdeki 30ml TAP besiyerine peletler aktarılmış UV'ye maruz bırakılmıştır. UV denemeleri ultraviyole lamba (UltraViole 254 nm, Intensity [ $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ], 60, Lamba-VL-130.G, 1x30W, Germination Lamp-Vilber) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Besiyerinde resüspanse edilen hücreler 23°C'de UV lambasına 10cm uzaklıkta 6 ve 12 saat periyodları boyunca maruz bırakılmıştır. UV mutasyonu sırasında fotoreaktivasyonun önlenmesi amacıyla UV çalışmaları karanlıkta yapılmıştır. Herbir çalışma sonucunda örneklerde ARS aktivite tayinleri yapılmıştır. 0. Dakika (kontrol) başlangıç olarak kabul edilmiş buradan elde edilen aktivite değerleri 6. ve 12. saatlerdeki aktivitelerle kıyaslanmıştır.

#### 3.2.6.4. Kalsiyum

Kalsiyumun ikincil bir mesajcı olarak ısı şok yanıtının oluşturulmasındaki olası etkilerinin belirlenmesi amacıyla, farklı kalsiyum konsantrasyonları (0mM, 100mM, 250mM, 500mM, 1M CaCl<sub>2</sub>); kalsiyum şelatlayıcıları olan EGTA (trietilen glikol diamin tetraasetik asit; 0mM [kontrol], 1mM, 50mM) ve BAPTA (1,2-bis[o-aminofenoksi]etan-N,N,N',N'-tetraasetik asit; 0mM, 1mM, 2mM); iyon kanalı bloklayıcıları lantan (0µM, 10µM, 75µM, 100µM, 150µM, 300µM), gadolinium (0µM, 100µM, 150 µM, 250µM, 300µM, 350µM) ve verapamil (0µM, 10µM, 100µM) kullanılmıştır. Farklı kalsiyum konsantrasyonlarının, kalsiyum şelatlayıcılarının ve iyon kanalı bloklarının etkisini araştırmak üzere 23°C'de sürekli ışık (CL) 1 500 Lux ve 150 rpm'de sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşları 3.2.5.4.'deki gibi hücre miktarı belirlenmişti. Daha sonra toplamda ~10<sup>8</sup> hücre oda sıcaklığında 3500rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelet çalışmada kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonda kalsiyum, kalsiyum şelatlayıcıları ve iyon kanalı bloklayıcıları içeren 30 ml TAP besiyerlerine ilave edilen peletler öncelikle 30 dakika boyunca 40°C'ye maruz bırakılmış ve ARS aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen ARS aktiviteleri 0mM (kontrol)'den elde edilen aktivite ile karşılaştırılmıştır.

#### 3.2.6.5. Tuzluluk

Tuzluluk oranının ısı şok sinyal metabolizmasına etkilerini incelemek üzere, 23°C'de sürekli ışık (CL) 1 500 Lux ve 150 rpm'de sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşları 3.2.5.4. belirtildiği şekilde üretilmiştir. Daha sonra toplamda ~10<sup>8</sup> hücre oda sıcaklığında 3 500rpm'de 3 dk boyunca santrifüjlenmiş ve pelet çalışmada kullanılmıştır. Farklı NaCl konsantrasyonlarını (0 mM [kontrol], 0,25mM, 1mM, 10mM, 50mM, 100mM, 150mM) içeren 30 ml TAP besiyerlerine peletler eklenmiştir. Herbir tuz konsantrasyonunda suşlar 2, 6, 12, 24, 36 saat boyunca tuz stresine maruz bırakılmıştır. Herbir süre sonunda ARS aktivite tayinleri yapılmıştır. Elde edilen ARS aktiviteleri 0mM (kontrol)'den elde edilen aktivite ile karşılaştırılmıştır.

Tüm deneyler 3'er kez yapılmış ve ortalaması alınmıştır.

### 3.2.7. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) ile transkripsiyon seviyesinde ekspresyonun tespiti

Çalışmadaki en çok stres yaratan fiziksel koşullarda transformantlar ve kontrol suş üretilerek gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (rt-qpcr) ile transkripsiyon seviyesinde HSP70A ve CβLP (*Chlamydomonas* β-subunit-like polypeptide)'nin ekspresyonun tespiti yapılmıştır. Ekspresyon seviyeleri arilsülfataz aktivite sonucu ile karşılaştırılmıştır.

#### 3.2.8.1.Rekombinant *C.reinhardtii* suşlarından RNA ekstraksiyonu

Sürekli eksprese olan ve ısıyla indüklenebilir rekombinant *C.reinhardtii* suşları ve kontrol olarak *C.reinhardtii* CC124 suşu 3.2.5.4. belirtildiği şekilde üretilmiştir. Üretilen suşlardan toplamda  $10^7$  hücre olacak şekilde buz dolu falkon tüpe aktarılmış ve 2dk, 4000rpm ve 4°C'de santrifüj yapılmıştır. Pelet tekrar 13 200rpm 4°C'de 2dk boyunca santrifüj edilmiş ve hücreler sıvı azotta ani bir şekilde dondurulmuştur. RNA Ekstraksiyonunda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam RNA, NucleoSpin® RNA Plant (740949.50-Macherey Nagel, Almanya) kitinde belirtilen talimatlar doğrultusunda ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminden sonra konsantrasyonları RNase-free distile su ile 200ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin RNA kalitesi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Elde edilen RNA ekstreleri -80°C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.2.8.2.Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR)

RT-qPCR için kullanılacak primerler  $\geq$  %90 primer verimliliğine, tek bir erime sıcaklığı ( $T_m$ ) eğrisine, %1,5 agaroz jelde tek bir banta ve amplikonun en doğru sekansına göre seçilmiştir (Çizelge 3.4). RT-qPCR çalışması one-Step RT-PCR (E5315S-NEB, ABD) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Master mix; nx2 $\mu$ M reverse ve nx2 $\mu$ M forward primer içeren solüsyon, nx25 $\mu$ l OneTaq One-Step Reaction Mix (2X), nx2 $\mu$ l OneTaq One-Step Enzyme Mix (25X) ile hazırlanmıştır.

96-kuyucuklu plakanın her bir kuyusuna 5 $\mu$ l RNA örnekleri eklendikten sonra 14 $\mu$ l master miks eklenmiştir. Plaka yapıştırma filmi ile kapatılmış ve Real-Time PCR cihazına (StepOnePlus) yerleştirilmiştir. Uygun program seçilerek reaksiyon koşulları 10dk 48°C, 10 dk 95°C; 15s 95°C; 60s 65°C olarak toplamda 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerin RNA kalitesi %1,5 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Kullanılan primerler

<b>Primer</b>	<b>Sekans</b>
<i>HSP70A<sub>For</sub></i>	GATCGAGCGCATGGTGC
<i>HSP70A<sub>Rev</sub></i>	TCCATCGACTCCTTGTCCG
<i>C<math>\beta</math>LP<sub>For</sub></i>	GCCACACCGAGTGGGTGTCGTGCG
<i>C<math>\beta</math>LP<sub>Rev</sub></i>	CCTTGCCGCCCGAGGCGCACAGCG

### 3.2.9. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz konsantrasyonu %1-2 arası kullanılmıştır. Agaroz TAE tamponu (40mM Tris, %1,14 Asetik asit, 10mM EDTA pH 8.0) içerisinde devamlı ısıtılarak çözülmüştür. DNA'nın deteksiyonu için jel en son konsantrasyonu 0.1 $\mu$ l/ml olacak şekilde 10.000x Gel Red (H1181-Diamond™, Promega, USA) ile boyanmıştır. Kuyucuklara yüklemmeden önce örneklere 6x yükleme tamponundan (%0.1 bromfenol mavisi, %0.1 ksilen siyanol, %30 gliserol) ekleme yapılmıştır. Jel 10V/cm'de yürütülmüş ve yürütme sonunda jel Ultraviyole (UV) altında görüntülenmiştir (Gen Box SDR, Gen Plaza Bioimage System).

## 4. BULGULAR

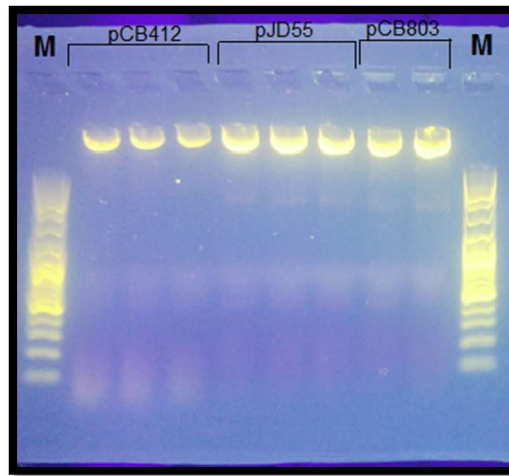
### 4.1. *C.reinhardtii*'nin transformasyonu

*ARG7* işaretçi genini içeren plasmid pCB412, sürekli eksprese gen olan  *$\beta$ TUB-ARS* içeren plasmid pJD55 ve ısıyla indüklenbilir *HSP70A-ARS* içeren plasmid pCB803 ile ayrı ayrı kompetent *E.coli* hücrelerine aktararak hücre içerisinde plasmidlerin çoğaltılması sağlanmıştır. Daha sonra plasmidler *E.coli* hücrelerinden plasmid iolasyon kiti (Macherey Nagel NucleoSpin) kullanılarak izole edilmiş ve izole edilen plasmid konsantrasyonları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Plasmidlerin saflık kontrolü agaroz jelde yapılmıştır.

**Çizelge 4.1.** *E.coli*'de çoğaltılan ve izole edilen plasmidler

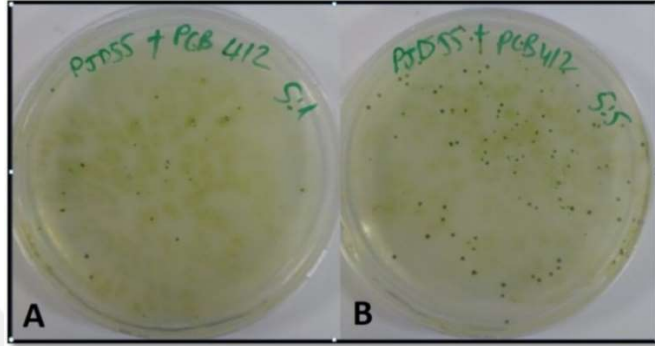
Plasmid	Konsantrasyon (ng/ $\mu$ l)
pCB412	232,1
pJD55	419,5
pCB803	447,7

İzole edilen plasmidler transformasyondan önce düze (lineer) hale getirilmiştir. Bunun için plasmidler restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Plasmidlerin düz hale gelip gelmediği %1,2 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiş ve plasmidlerin başarılı bir şekilde kesildiği görülmüştür (Şekil 4.1).



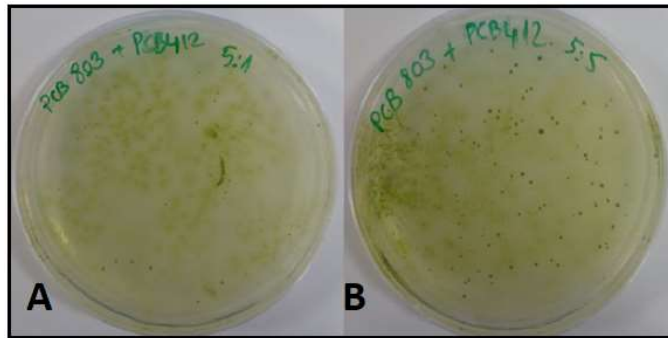
**Şekil 4.1.** %1,2 Agaroz jel elektroforezinde kesilmiş plasmidlerin kontrolü.

Lineer haline getirilen plasmidlerin hücre duvarı hasarlı ve klonlama için müsait olan *C.reinhardtii* suşuna cam boncuk transformasyon metodu ile aktarılması sağlanmıştır. 14 gün sonunda pCB412 ve pJD55 plasmidleri içeren *C.reinhardtii* suşları yeşil koloniler halinde TAP agar besiyeri üzerinde belirmiştir (Şekil 4.2). Plasmidler 5:1 ve 5:5 oranlarında kullanılmış, 5:5 oranında aktarıldığında daha çok rekombinant koloni elde edilmiştir (Şekil 4.2 A ve B).



**Şekil 4.2.** pCB412 ve pJD55 plasmidinin kotransformasyonu ile elde edilen koloniler: *ARG7* işaretçi genini içeren plasmid pCB412 ve sürekli eksprese olan *βTUB-ARS* içeren plasmid pJD55'in *C.reinhardtii* cw15-302 suşuna (A) 5:1 oranında, (B) 5:5 (v/v) oranında kotransformasyonu ile 23°C sürekli ışıkta 14 gün inkübasyon sonucunda oluşmuştur.

Diğer yandan *C.reinhardtii* suşuna transformasyon metodu ile aktarılan ve 14 gün sonunda pCB412 ve pCB803 plasmidleri içeren *C.reinhardtii* suşları yeşil koloniler halinde TAP agar besiyeri üzerinde belirmiştir (Şekil 4.3). Plasmidler 5:1 ve 5:5 oranlarında kullanılmış, 5:5 oranında aktarıldığında daha çok rekombinant koloni elde edilmiştir (Şekil 4.3 A ve B).



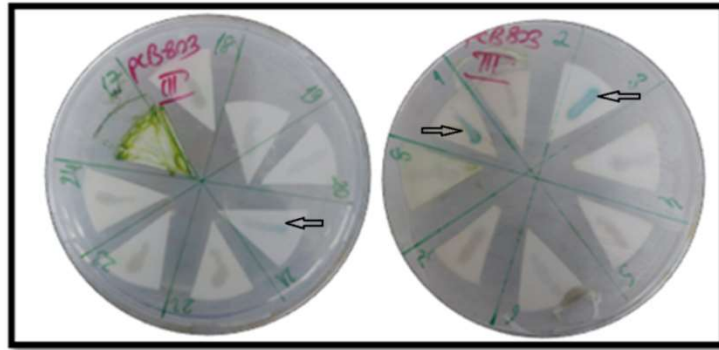
**Şekil 4.3.** pCB412 ve pCB803 plasmidinin kotransformasyonu ile elde edilen koloniler: *ARG7* işaretçi genini içeren plasmid pCB412'in ve ısıyla indüklenebilir *HSP70A-ARS* içeren plasmid pCB803'in *C.reinhardtii* cw15-302 suşuna (A) 5:1 oranında, (B) 5:5 (v/v) oranında kotransformasyonu ile 23°C sürekli ışıkta 14 gün inkübasyon sonucunda oluşmuştur.



14 gün sonunda elde edilen toplam 256 transformanttan sürekli ekspresyona sahip olarak 160 tane, ısıyla indüklenebilir ekspresyona sahip olarak 96 adet klon oluşumu gözlenmiştir. Bu beliren klonlar ya sadece pCB412'yi ya pCB412 ile pCB803'ü ya da pCB412 ile pJD55'i içerebilir. 14 gün sonunda sadece pCB412'yi içeren klonları elimine etmek için tüm klonlarda kalitatif olarak arilsülfataz enzim aktivitesi tayini yapılmıştır. Toplamda 10 adet ARS(+) klon tespit edilmiştir. Bunlardan sürekli eksprese olan 160 tane klondan sadece 7 klonda pozitif sonuç alınırken, ısıyla indüklenebilir 96 klondan ise yalnızca 3'ünde pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.4, Şekil 4.5).



**Şekil 4.4.** pCB412 ve pJD55 plasmidlerinin aktarıldığı klonlarda ARS aktivitesinin kalitatif olarak taranması. Mavi renk ARS(+) olarak değerlendirilmiştir.



**Şekil 4.5.** pCB412 ve pCB803 plasmidlerinin aktarıldığı klonlarda arilsülfataz aktivitesinin kalitatif olarak taranması. Mavi renk ARS(+) olarak değerlendirilmiştir.

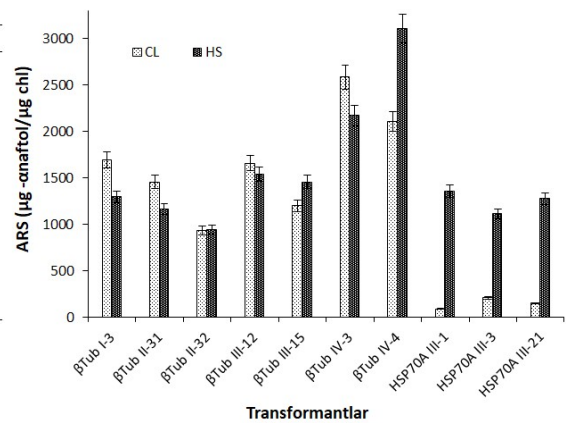
Çalışmada elde edilen 10 transformant Çizelge 4. 2'de numaralandırılmıştır.

**Çizelge 4.2** Transformantların numaralandırılması.

sürekli eksprese olan transformantlar	ısıyla indüklenebilir transformantlar
$\beta$ Tub I-3	HSP70A III-1
$\beta$ Tub II-31	HSP70A III-3
$\beta$ Tub II-32	HSP70A III-21
$\beta$ Tub III-12	
$\beta$ Tub III-15	
$\beta$ Tub IV-3	
$\beta$ Tub IV-4	

Denemeye alınan 10 transformant oda sıcaklığında sürekli ışık altında (CL) ve 40°C’de 30 dakika ısı şokuna (HS) maruz bırakılmış ve ARS aktiviteleri tayin edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre sürekli eksprese transformant olan  $\beta$ Tub II-32’nin her iki üretim koşulunda da enzim aktivitesi birbirine yakın bulunmuştur. Bu istenilen bir durumdur. Bu transformant kontrol olarak kullanılmıştır. Diğer yandan, elde edilen sonuçlara göre indüklenebilir transformant olan HSP70A III-1 ise her iki üretim koşulunda da enzim aktivitelerinin birbirine yakın olmadığı, çok fazla fark olduğu gözlenmiştir. Bu da bu transformant için istenilen bir durumdur. Sürekli eksprese olan transformant ( $\beta$ Tub II-32, Kontrol) ve indüklenebilir transformant (HSP70A III-1) seçilmiş, çalışmalara bu iki transformant ile devam edilmiştir (Şekil 4.6).

Transformantlar	CL altında ARS Aktivitesi	HS altında ARS Aktivitesi
$\beta$ Tub I-3	1690	1292
$\beta$ Tub II-31	1450	1162
<b><math>\beta</math>Tub II-32</b>	<b>930</b>	<b>936</b>
$\beta$ Tub III-12	1654	1538
$\beta$ Tub III-15	1195	1450
$\beta$ Tub IV-3	2580	2168
$\beta$ Tub IV-4	2100	3101
<b>HSP70A III-1</b>	<b>291</b>	<b>1354</b>
HSP70A III-3	315	1110
HSP70A III-21	345	1274



**Şekil 4.6.** ARS (+) transformantlarının 23°C ve 40°C’deki ARS aktivite değerleri.

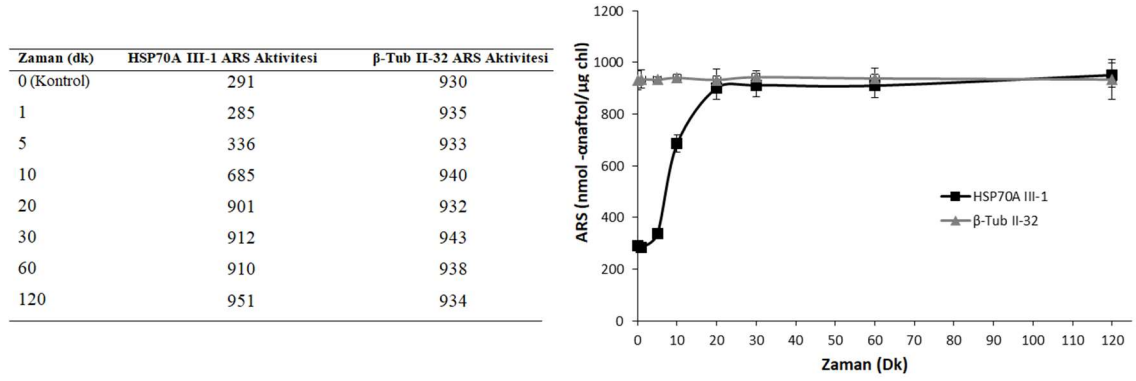
Transformantlar sürekli ışık altında (CL) 23°C’den 40°C’ye kaydırılarak 30 dk ısı şokuna (HS) maruz bırakılmış ve ARS aktiviteleri karşılaştırılmış ( $\mu\text{g-anaftol}/\mu\text{gchl}$ ).

## 4.2. Fiziksel ve kimyasal parametrelerin ısı şok yanıtına etkisi

### 4.2.1. Isı stresi

Sürekli ışık (1 500 Lux) altında 23°C’de  $\sim 10^6$  hücre/ml ‘ye ulaşan HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 (kontrol) transformantları farklı sıcaklıklarda (35°C, 37°C, 40°C ve 43°C) farklı periyodlar (0 [kontrol], 1dk, 5dk, 10dk, 20dk, 30dk, 1saat, 2 saat) boyunca maruz bırakılmış ve arilsülfataz aktiviteleri saptanmıştır.

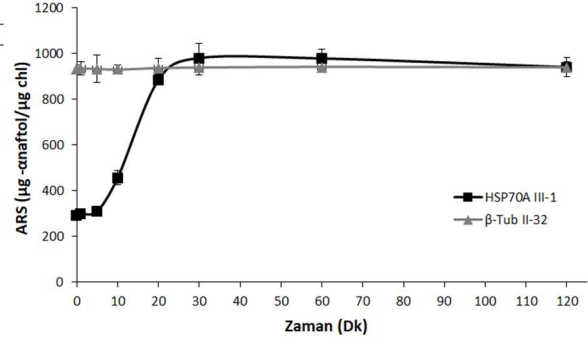
35°C’de indüklenbilir (HSP70A III-1) transformantının 10. dakikada stres yanıtı vermeye başladığı ve devam ettiği belirlenmiştir. Kontrole göre enzim aktivitesi artışı yaklaşık 2,5 kat artmıştır. Sürekli eksprese gen ( $\beta$ Tub II-32) içeren plasmid içeren transformantta (kontrol) ise beklendiği gibi tüm periyotlarda arilsülfataz aktivitesi sabit kalmıştır (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** 35°C’de HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C)

37°C’de HSP70A III-1 transformantının en yüksek arilsülfataz aktivitesi 120 dk’da elde edilmiştir(951  $\mu$ g- $\alpha$ naftol/ $\mu$ gchl). ARS aktivitesinde 0. dakikaya göre yaklaşık 3,5 kat bir artış olduğu gözlemlenmiştir. 30 dakikadan sonra arilsülfataz aktivitesinin aynı kaldığı, ancak ve 2 saat boyunca stres yanıtının devam ettiği tespit edilmiştir.  $\beta$ Tub II-32’de ise arilsülfataz aktivitesi ısı stres kinetiği periyotları boyunca aynı kalmıştır. (Şekil 4.8).

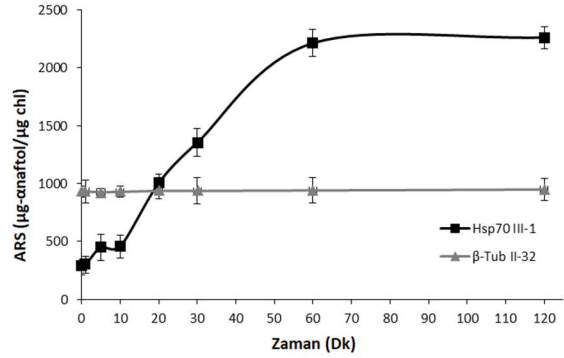
Zaman (dk)	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -Tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	291	930
1	299	934
5	310	932
10	456	929
20	885	936
30	980	938
60	978	941
120	940	939



**Şekil 4.8.** 37°C’de HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C)

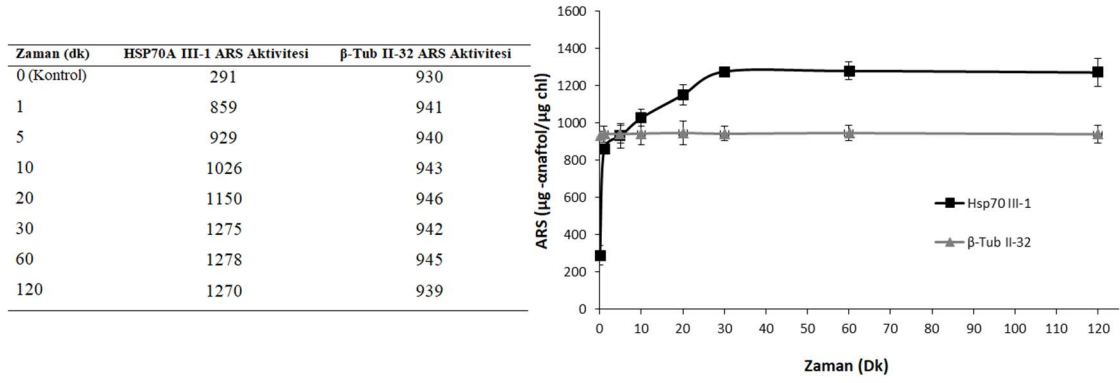
40°C’de yapılan kinetik çalışmalarda ise 5. dakikadan sonra aktivite artışı gözlenmiş, 120 dakikada en yüksek değere ulaşmıştır (2 260  $\mu\text{g-onaftol}/\mu\text{gchl}$ ). Başlangıç enzim aktivitesine göre 8 kat bir artış gözlenmiştir.  $\beta$ Tub II-32’de ise çok az bir artışla birlikte tüm periyod boyunca enzim aktivitesi sabit kaldığı ifade edilebilir (Şekil 4.9).

Zaman (dk)	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -Tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	291	930
1	298	931
5	450	926
10	456	928
20	1004	936
30	1354	936
60	2212	940
120	2260	948



**Şekil 4.9.** 40°C’de HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C)

42°C’de yapılan çalışmalarda HSP70A III-1 transformantı 1. dakikadan itibaren ARS aktivitesi göstermiş, 60 dakikada en yüksek değere ulaşmıştır (1 278  $\mu\text{g-onaftol}/\mu\text{gchl}$ ). ARS aktivitesi başlangıca göre yaklaşık 4,5 katına çıkmıştır.  $\beta$ Tub II-32 ‘de ise tüm periyod boyunca enzim aktivitesi sabit kaldığı belirlenmiştir (Şekil 4.10).



**Şekil 4.10.** 42°C’de HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 transformantlarının zamana bağlı (0-120dk) ARS aktivitesi. (Kontrol, 23°C)

Bütün kinetikler göz önüne alındığında 23°C’den 35, 37, 40 ve 42 °C’ye olan kaydırmaların (shift) ARS aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu saptanmıştır. ARS’deki bu artış hücrenin ısıya maruz kalmasından dolayı strese girerek plasmiddeki ARS’ye bağlı promotor bölgedeki HSP70A genini ve HSP70A’ya bağlı yolaklardaki ilgili diğer ısı şok proteinlerini ekspre etmesinden kaynaklandığı düşünülebilir.

#### 4.2.2. Işık şiddeti

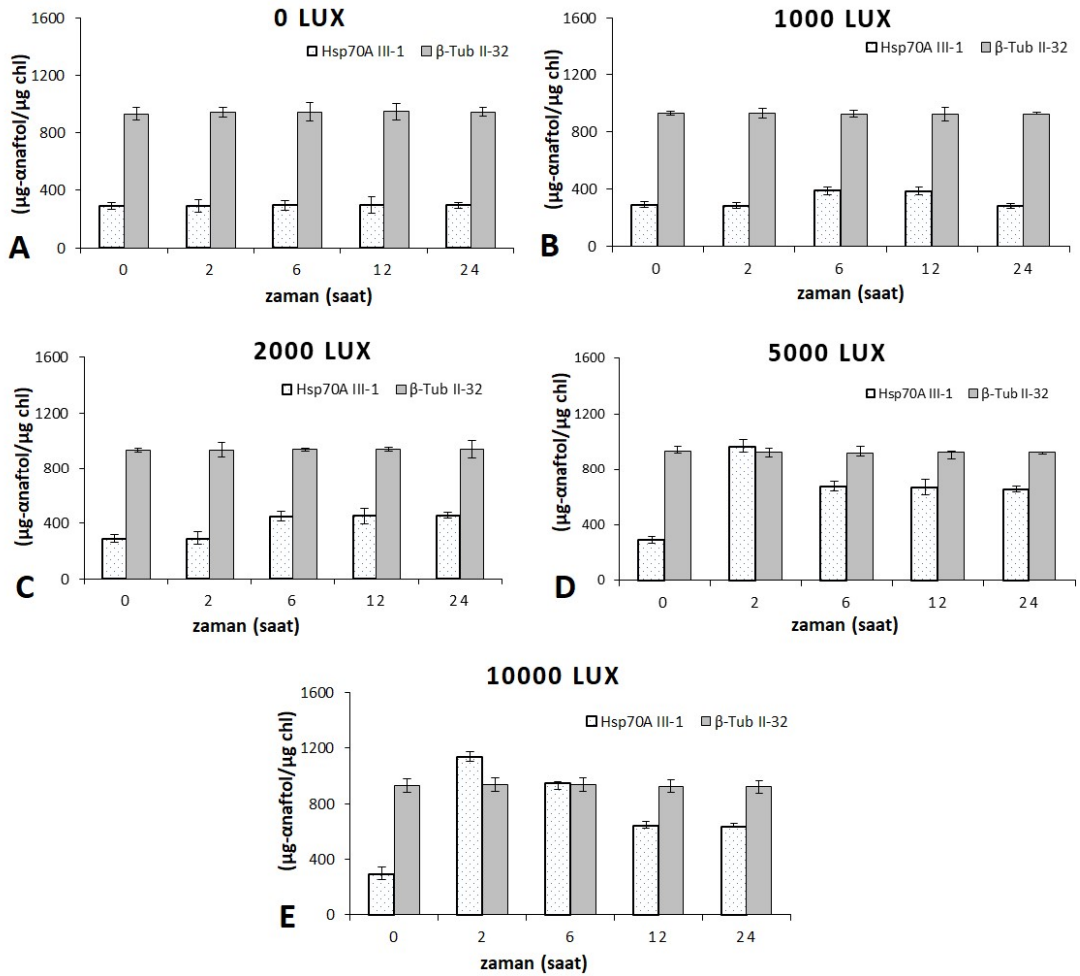
Işık şiddetinin etkisini incelemek üzere 23°C’de sürekli ışık (1500 Lux) altında  $\sim 10^6$  hücre/ml’ye ulaşan HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 (kontrol) transformantları 0, 1 000, 2 000, 5 000 ve 10 000 Lux düşük ve yüksek aydınlatma koşullarında 2, 6, 12, 24 saat gibi farklı periyodlara maruz bırakılmış ve her bir periyod sonunda ARS aktiviteleri saptanmıştır.

Düşük aydınlatma olan 0 Lux’da HSP70A III-1 transformantında ARS aktivitesi sabit kalırken ve 1 000’da ARS aktivitesinde hafif bir artış olmuş (6 ve 12. saat) ancak 1 gün sonunda yaklaşık olarak başlangıç değerine ulaşmıştır. 2 000 Lux ve üzeri yüksek aydınlatmalarda aktivitenin kademeli olarak arttığı saptanmıştır. 2 000 Lux’da en fazla aktivite artışı 6 saat sonunda saptanmıştır. 12 ve 24 saat sonunda ise zamanla enzim aktivitesi artışı az miktarda da olsa artmaya devam etmiştir. 5 000 Lux’da 2 saat sonunda ARS aktivitesi yaklaşık 3,5 katına çıkmıştır. 10 000 Lux en fazla ARS artışının saptandığı ışık şiddetidir. 2 saat sonunda yaklaşık 4 kat bir artış gözlenmiş bu değer 6.

saat sonunda da hemen hemen korunmuştur.  $\beta$ Tub II-32 transformantı ise tüm aydınlatmalarda aynı arilsülfataz değerlerine sahiptir (Çizelge 4.3, Şekil 4.11).

**Çizelge 4.3.** Farklı ışık şiddetlerindeki (0-10 000 Lux) zamana göre ARS aktivite değerleri.

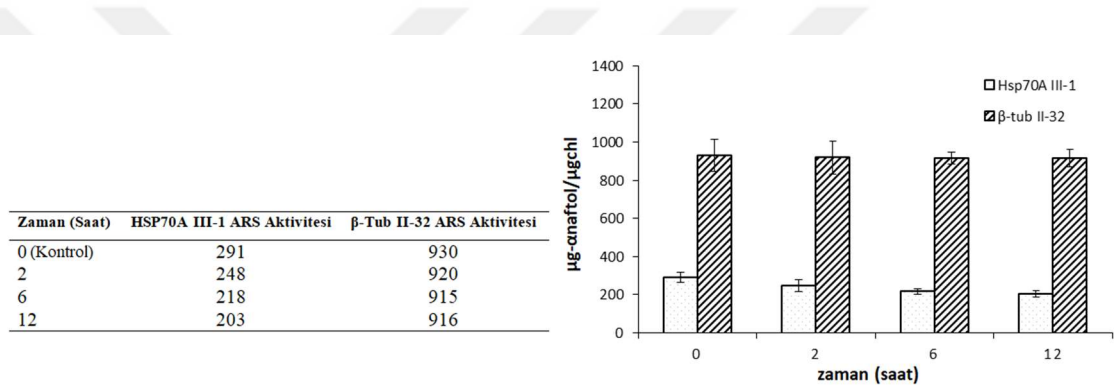
		Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{g-anaftol}/\mu\text{g chl}$ )					
		Işık Şiddeti (Lux)	0. s	2. s	6. s	12. s	24. s
<b>HSP70A III-1</b>	0		291	292	296	297	297
	1000		291	285	388	387	283
	2000		291	292	450	455	458
	5000		291	970	678	672	655
	10000		291	1131	947	636	634
<b>B-Tub II-32</b>	0		930	941	945	946	943
	1000		930	930	926	925	927
	2000		930	935	937	940	941
	5000		930	926	922	923	924
	10000		930	936	938	925	920



**Şekil 4.11.** Farklı Işık Şiddetlerindeki (0-10 000 Lux) ARS Aktiviteleri. (A) 0 Lux , (B) 1 000 Lux, (C) 2 000 Lux, (D) 5 000 Lux, (E) 10 000 Lux.

### 4.2.3. UV-B radyasyonu

UV-B radyasyonun etkilerini saptamak üzere 23°C’de sürekli ışık (1 500 Lux) altında ~10<sup>6</sup> hücre/ml’ye ulaşan HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 (kontrol) transformantları UV lambası ile kültür arasında 10 cm uzaklık olacak şekilde 2, 6 ve 12 saat gibi farklı periyotlarda UV ışığına maruz bırakılmış ve herbir periyod sonunda arilsülfataz aktiviteleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda her iki transformantta da arilsülfataz aktivitesinde az bir düşüş görülmüştür. 12 saat sonunda aktivite değerleri HSP70A III-1 için 203 ve  $\beta$ -Tub II-32 için 916  $\mu$ g- $\alpha$ naftol/ $\mu$ gchl olarak saptanmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. UV-B’nin farklı periyotlarda (0, 2, 6, 12 saat) ARS aktivite değerleri. (Kontrol, UV-B uygulanmadan önce)

### 4.2.4. Farklı kalsiyum konsantrasyonunun, şelatlayıcıların ve kalsiyum iyon kanalı bloklayıcıların etkileri

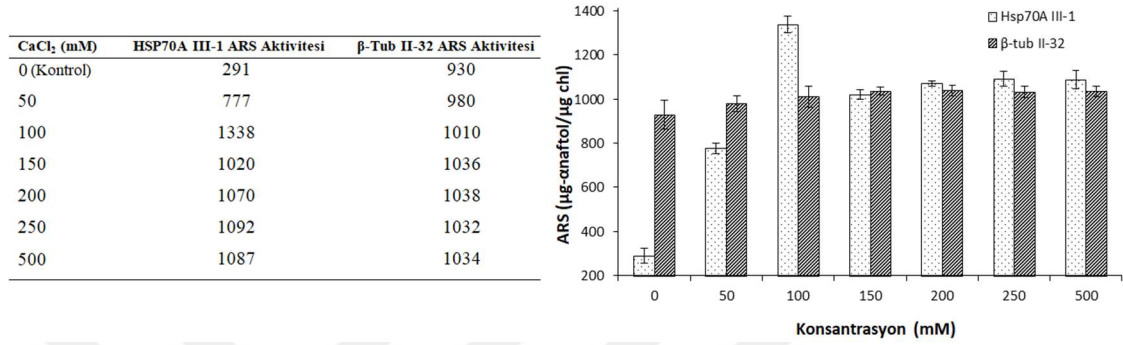
Kalsiyumun ikincil bir mesajcı olarak ısı şok yanıtının oluşturulmasındaki olası etkilerinin belirlenmesinde farklı kalsiyum konsantrasyonları (0 mM [kontrol], 0.1mM, 100mM, 250mM, 500mM), kalsiyum şelatlayıcıları (EGTA ve BAPTA) ve iyon kanalı bloklayıcıları (lantan, gadolinyum ve verapamil) kullanılmıştır.

#### 4.2.4.1. Kalsiyum konsantrasyonu

CaCl<sub>2</sub>’nin farklı konsantrasyonlarının arilsülfataz enzimi aktivitesi üzerine etkisi incelendiğinde en yüksek arilsülfataz aktivitesi HSP70A III-1 transformantında 100 mM’da 1338  $\mu$ g- $\alpha$ naftol/ $\mu$ g chl olarak elde edilmiş ve kontrole göre 4,5 kat enzim artışı



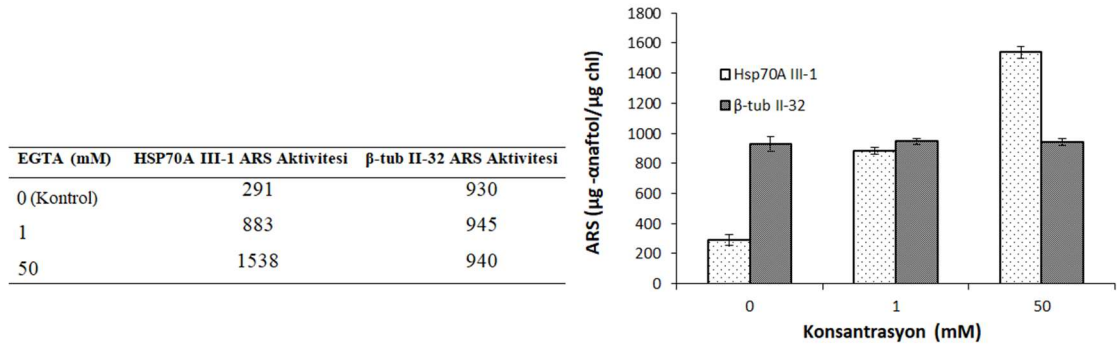
saptanmıştır. 150 mM-500 mM arası konsantrasyonlarda arilsülfataz aktivitesinde hafif bir düşme gözlemlenmiş ve aktivite değeri hemen hemen aynı kalmıştır.  $\beta$ -Tub II-32 transformantında da bekleneceği gibi arilsülfataz aktivitesinde hemen hemen sabit kalmıştır(Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Farklı CaCl<sub>2</sub> konsantrasyonlarındaki (0-500mM) ARS aktivitesi değerleri.

#### 4.2.4.2. Kalsiyum şelatlayıcıları

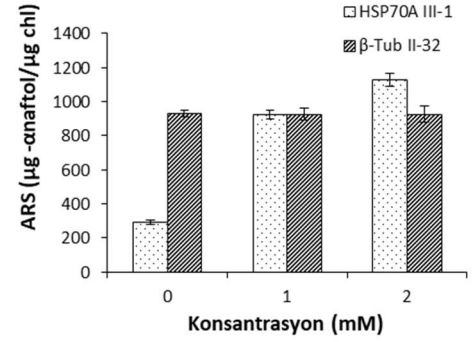
Farklı kalsiyum şelatlayıcılarından EGTA'nın (Şekil 4. 14) ve BAPTA'nın (Şekil 4. 15) farklı konsantrasyonlardaki etkileri incelendiğinde konsantrasyon arttıkça HSP70A III-1 transformantında ARS enzim aktivitesini arttığı gözlemlenmiştir. EGTA konsantrasyonu 50mM'a ulaştığında ARS miktarı başlangıç durumuna göre yaklaşık 5 kat artmıştır. BAPTA'da ise bu artış 4 kat seviyesindedir.  $\beta$ -Tub II-32 transformantında da bekleneceği gibi arilsülfataz aktivitesinde hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Farklı EGTA konsantrasyonlarındaki (0-50 mM) ARS aktivitesi değerleri.



BAPTA (mM)	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	291	930
1	925	928
2	1126	926



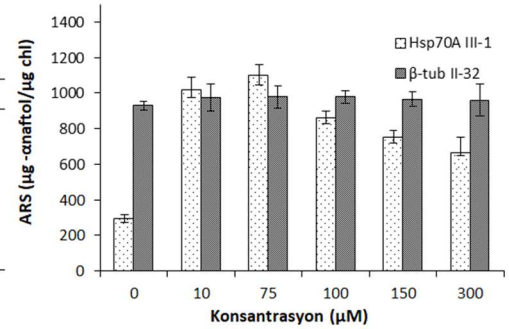
Şekil 4.15. Farklı BAPTA konsantrasyonlarındaki (0- 2mM) ARS aktivitesi değerleri.

#### 4.2.4.3. Kalsiyum iyon kanalı bloklayıcıları

Kalsiyum iyon kanalı bloklayıcılarının (Lantan, Gadolinyum ve Verapamil) farklı konsantrasyonlarının arilsülfataz enzim aktivitesine olan etkisine bakılmıştır.

Lantanın varlığında ARS aktivitesi HSP70A III-1 için 75 $\mu$ M konsantrasyonda yaklaşık 4 katına çıkmıştır. 100 $\mu$ M lantan konsantrasyonunda aktivite oldukça düşmüş daha sonra konsantrasyon 150 ve 300 $\mu$ M'a çıkarıldığında aktivitede çok az artış gözlenmiştir.  $\beta$ -Tub II-32 transformantında da bekleneceği gibi arilsülfataz aktivitesi hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil 4. 16).

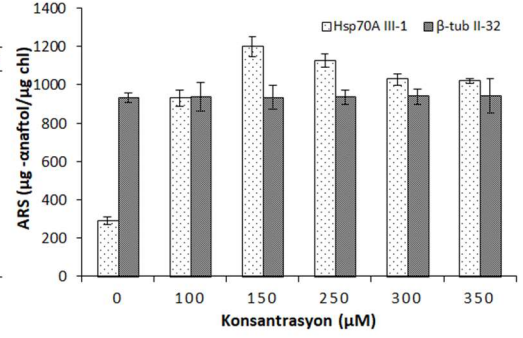
Lantan ( $\mu$ M)	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	290	900
10	1017	975
75	1100	800
100	633	980
150	750	965
300	862	931



Şekil 4.16. Farklı lantan konsantrasyonlarındaki (0-300  $\mu$ M) ARS aktivitesi değerleri.

Gadolinyum konsantrasyonu incelendiğinde HSP70A III-1 transformantında 150 $\mu$ M'de arilsülfataz aktivitesinin 4 katına çıktığı tespit edilmiştir. Konsantrasyon artırıldıkça ARS aktivitesinde genel olarak sabit değerler saptanmıştır.  $\beta$ -tub II-32 transformantında ise her gadolinyum konsantrasyonunda aktivite hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil 4. 17.).

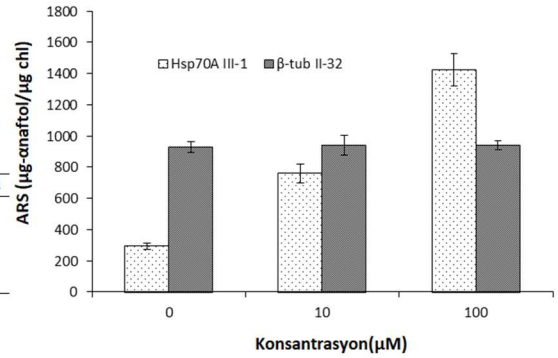
Gadolinium( $\mu\text{M}$ )	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	291	930
100	928	935
150	1200	932
250	1126	934
300	1028	938
350	1020	940



**Şekil 4.17.** Farklı gadolinium konsantrasyonlarındaki (0-350  $\mu\text{M}$ ) ARS aktivitesi değerleri.

Diğer bir kalsiyum kanal bloklayıcısı verapamilin farklı konsantrasyonları varlığında HSP70A III-1 transformantında ARS enzim aktivitesi kontrole göre 10  $\mu\text{M}$ 'da 2,5 kat artış gösterirken, 100 $\mu\text{M}$ 'da bu artış 4,9 kat saptanmıştır.  $\beta$ -TUB II-32 transformantında ise arilsülfataz aktivitesinde herhangi bir değişiklik gerçekleşmemiştir (Şekil 4. 18).

Verapamil ( $\mu\text{M}$ )	HSP70A III-1 ARS Aktivitesi	$\beta$ -tub II-32 ARS Aktivitesi
0 (Kontrol)	291	930
10	760	941
100	1425	940



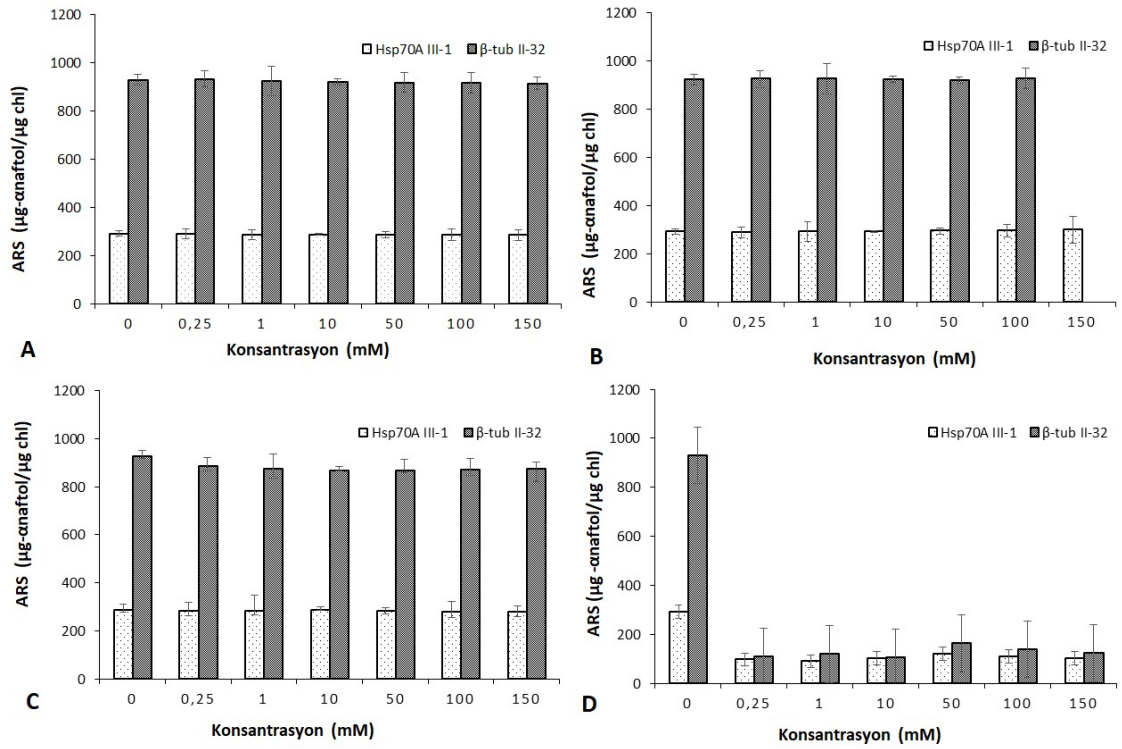
**Şekil 4.18.** Farklı verapamil konsantrasyonlarındaki (0,10,100  $\mu\text{M}$ ) ARS aktivitesi.

#### 4.2.5. Tuz konsantrasyonları

Farklı tuz konsantrasyonlarına 2, 6, 12 ve 24 saat maruz kalan HSP70A III-1 ve  $\beta$ Tub II-32 transformantlarının ARS aktiviteleri saptanmıştır. Uygulanan tüm saatlerde en yüksek arilsülfataz aktivitesinin genel olarak değişmediği tespit edilmiştir. Hem HSP70A hem de  $\beta$ -tub II transformantlarında arilsülfataz aktiviteleri benzer düzeydedir (Çizelge 4.4, Şekil 4. 19).

**Çizelge 4.4.** Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0,25-150 mM) ARS aktivitesi değerleri.

		Enzim Aktivitesi ( $\mu\text{g-anaftol}/\mu\text{g chl}$ )				
		NaCl (mM)	0. s	2. s	6. s	12. s
HSP70A III-1	0,25	291	129	84	106	97
	1	291	104	90	108	90
	10	291	101	90	113	102
	50	291	130	92	130	120
	100	291	94	105	109	109
	150	291	61	110	88	103
	B-tub II-32	0,25	930	94	112	99
1	930	83	100	122	119	
10	930	103	103	104	104	
50	930	116	161	150	163	
100	930	97	111	148	137	
150	930	107	110	131	122	



**Şekil 4.19.** Farklı NaCl konsantrasyonlarındaki (0,25-150 mM) ARS aktivitesi. (A) 2 saat, (B) 6 saat, (C) 12 saat, (D) 24 saat

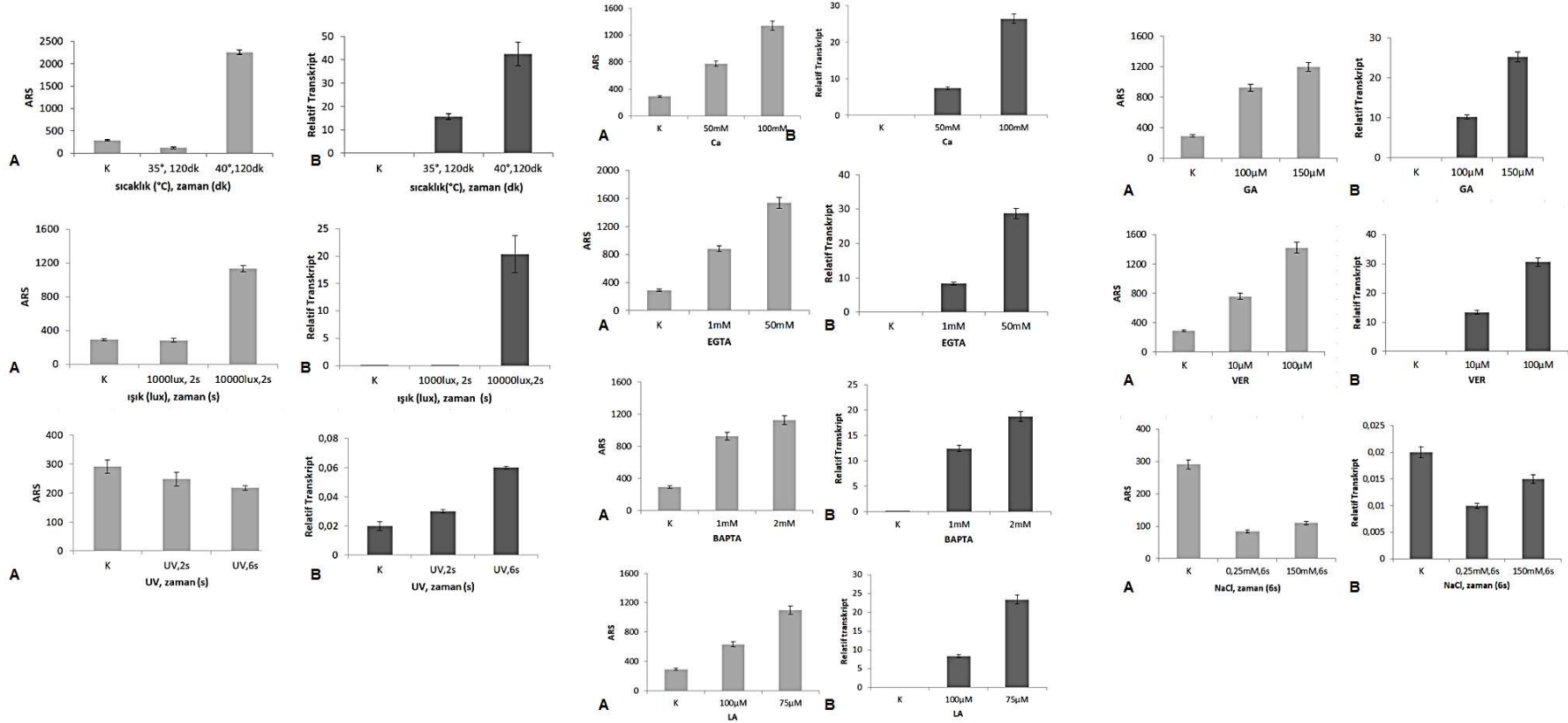
### 4.3. Gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) ile transkript düzeyinde analizler

HSP70A III-1'den elde edilen enzimatik aktivite sonuçlarını transkript düzeyinde karşılaştırmak için uygulanan bazı fiziksel veya kimyasal parametreden seçilmiş ve RT-qPCR denemeleri yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve konsantrasyon değerleri (ng/μl) ölçülmüştür (Çizelge 4. 5).

**Çizelge 4.5.** RNA izolasyonu konsantrasyonları ve saflık değerleri

Parametreler	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)	260/280	260/230
K	406,2	2,12	2,46
35°C, 120 dk	599,7	2,11	2,50
40°C, 120dk	710,2	2,15	2,47
1000 lux, 2sa	320,1	2,18	2,33
10000 lux, 2sa	331,6	2,18	0,92
UV, 2sa	409,6	2,16	2,17
UV, 6sa	308,4	2,16	2,42
CaCl <sub>2</sub> ,50mM	405,6	2,16	2,36
CaCl <sub>2</sub> ,100mM	502,4	2,16	2,45
EGTA, 1mM	132,4	2,11	2,32
EGTA, 50mM	379,9	2,18	2,42
BAPTA, 1mM	528,5	2,17	2,31
BAPTA, 2mM	498,4	2,16	2,32
La, 100μM	726,8	2,14	2,43
La, 75μM	290,7	2,13	2,24
Ga,100μM	494,5	2,16	2,36
Ga,150μM	422,2	2,16	2,30
Ver,10μM	662,1	2,13	2,40
Ver,100μM	524,2	2,16	2,38
NaCl, 0,25mM	375,6	2,17	2,33
NaCl, 150mM	315,5	2,16	2,39

RT-qPCR sonucu transkript seviyesinde analiz yapılmıştır. Sonuç olarak en fazla ifade ARS aktivite değerleri ile paralel olup, 40°C, 120dk ısıya maruz bırakılan örneklerde, ışık şiddeti bakımından 2 saat tamamen 10 000 Lux'da bırakılan örneklerde ve kimyasal parametre olarak da 100mM kalsiyum konsantrasyonunda, kalsiyum şelatlayıcı ve bloklayıcılarında ise EGTA ve Verapamile maruz bırakılan örneklerindedede elde edilmiştir (Şekil 4. 20).



Şekil 4.20. RT-qPCR arilsülfataz aktivitesi ve relatif transkript değerleri (%)

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Küresel ısınmanın bir sonucu olarak, bitkiler, mahsul verimini ciddi şekilde azaltabilen bir durum olan ısı stresine daha fazla maruz kalmaktadır. Bitkilerin böyle bir strese nasıl tepki verdiğini anlamak, bitkilerin ısıya direncini arttırmak için metabolik mühendislik yaklaşımları veya tedavileri geliştirmede çok önemlidir. Genel olarak, yüksek sıcaklıklara maruz kaldığında organizmalar, belirli bir dereceye kadar yeni duruma adaptasyon sağlayan bir ısı şoku yanıtı (HSR) verirler. Yeşil mikroalg *C.reinhardtii*, biyofarmasötikler, biyoyakıtlar ve hidrojen gibi ümit verici endüstriyel uygulamalara sahip, yetiştirilmesi kolay, geniş çapta çalışılmış bir mikroorganizmadır. Bitki model organizmalarından *Arabidopsis thaliana* (Sugio ve ark. 2009) ve yeşil alg *C.reinhardtii* (Schmollinger, 2013)'de, HSR'nun yanlış veya katlanmamış proteinlerin birikimi ile tetiklendiği ve bir dizi sensör ve sinyal olayı aracılığıyla ısı şoku transkripsiyonunun aktivasyonuna yol açtığı öne sürülmüştür. Bu durum HSF'nin sırayla, HSPs'in ekspresyonunu teşvik etmesi ve daha sonra, bazıları dejenere olmuş proteinlerin tekrar doğru üç boyutlu yapılarına yeniden katlanmasından sorumlu şaperonlar olarak işlev gören proteinlerin senteziyle devam eder. Denatüre proteinlerin biriktiği bu kesin sıcaklık, bir organizmanın içinde büyüdüğü tipik sıcaklık aralığına bağlıdır (Lindquist ve Craig, 1988). *C.reinhardtii*'de HSR'yi tespit etmek için bir 36°C (T<sub>0</sub>) sıcaklığının yeterli olduğu gösterilmiştir (Kobayashi ve ark. 2014).

Isı şok proteinleri (HSPs)'nin üretimi hücrenin strese karşı gösterdiği anahtar bir adaptasyondur ve iklim değişikliğine karşı bitkilerin tepkilerini belirlemede oldukça önemli bir yere sahiptir. Isı şok proteinleri ısı stresi sırasında hücrenin proteinlerini, membranlarını ve diğer hücresel bileşenlerini korur, böylece stresli bir olayın ardından denatüre proteinlerin onarımını veya bozunmasını kolaylaştırır. Her organizmada bulunan HSPs doğasına ve bunların termotoleranstaki merkezi rollerine rağmen, ifadesi, büyüklüğü ve kinetiği organizmadan organizmaya değişir. HSPs'nin ısı toleransına verdiği tepki göz önüne alındığında, genellikle daha stresli habitatlardan gelen organizmaların daha yüksek seviyede HSPs biriktirmeleri gerektiği varsayılmaktadır. Isı şok yanıtı (HSR), farklı türdeki organizmalarda çeşitli şekillerde karakterize olmuştur

ancak temel özellikleri bakterilerden hayvanlara kadar önemli derecede korunumludur (Barua ve ark. 2008).

Transformasyon çalışmaları için güçlü verimli promotörler bulmak kolay bir iş değildir. Yeni mikroalg türlerinin genetik transformasyonunu optimize etmeye yönelik birçok girişim yüksek bitkilerde bulunan heterolog promotörlerle sağlanmaya çalışılmıştır. Heterolog promotörler, evrensel olmanın büyük avantajına sahiptir. Prensip olarak, herhangi bir mikroalgal türünün genetik transformasyonu için kullanılabilirler, ancak transformasyon verimleri genellikle düşük ve transgenler de genellikle kararsızdır. En iyi transformasyon etkinliği ve en kararlı transformantlar endojen promotörler ile elde edilmektedir (Davies 1992). *C.reinhardtii*'de uzun yıllardır sıklıkla kullanılan en popüler endojen promotörler arasında  $\beta_2TUB$  ve HSP70A bulunmaktadır (Davies 1992, Davies ve Grossman 1994, Schroda 2000, Lee ve ark. 2018). Bu çalışmada da sürekli ekspresyonun eldesi için  $\beta_2TUB$  protoründen ve ısıyla indüklenebilir ekspresyon eldesi için HSP70A promotöründen faydalanılmıştır. ARG7 (Argininosüksinat liyaz) geni ise *C.reinhardtii*'nin nükleer transformasyonu için popüler bir seçici işaretçi olup (Purton ve Rochaix 1995) bu çalışmada kullanılmıştır.

Kotransformasyon çalışmalarında genellikle kullanılan mekanik yöntem cam boncuk yöntemidir. Cam boncuk yönteminin elektroporasyon ve bombardıman metodlarına göre birçok avantajı vardır. Basit, ucuz ve fazla ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Yapılan çalışmalarda da iki plasmidin kotransformasyonu sonucu her iki plasmidi eksprese edebilen en yüksek kotransformasyon yüzdesi bu yöntemle elde edilmiştir (Coll 2006).

Bu çalışmada ısı şok yanıtında etkili olduğu düşünülen çeşitli kimyasal ve fiziksel parametreler moleküler araçlardan faydalanılarak *C.reinhardtii* üzerinde araştırılmıştır.  $\beta_2TUB$  ve HSP70A promotörü içeren plasmidlerden faydalanılmıştır. Çalışmada pCB803 (HSP70A-ARS içeren plasmid) ve pCB412 (seçici gen ARG7 içeren plasmid); pJD55 ( $\beta TUB$ -ARS içeren plasmid) ve pCB412 (seçici gen ARG7 içeren plasmid) *C.reinhardtii*'ye mekanik olarak cam boncuk yöntemi ile aktarılmıştır. Kotransformasyon sonucunda toplam 256 adet transformant elde edilmiştir. Bunlardan 160 tanesi sürekli ifade olabilen, 96 tanesi ise ısıyla indüklenebilen transformanttır. 160

tane klondan sadece 7 klonda, 96 klondan ise sadece 3 klonda ARS aktivitesi elde edilmiştir. Dolayısıyla kotransformasyon oranı %4 olarak saptanmıştır. Elde edilen 7 klondan sabit ARS aktivitesi gösteren ve  $\beta$ TUB II-32 olarak adlandırılan transformant (pozitif kontrol) ve 3 klondan en yüksek ARS enzim aktivitesi gösteren ve HSP70A III-1 olarak adlandırılan transformant daha sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Negatif kontrol amacıyla ise *C.reinhardtii* CC-124 suşu kullanılmıştır.

Isı şok yanıtı (HSR)'nda fiziksel ve kimyasal parametreler oldukça etkilidir. Bu amaçla, çeşitli fiziksel (ısı, ışık, UV-B) ve kimyasal parametreler (kalsiyum, kalsiyum şelatlayıcı ve bloklayıcıları, tuzluluk) araştırılmıştır.

Isı birçok hüresel işlemi etkileyen bir faktördür. Bunlar; protein katlanma ve protein kompleksinin birleşmesi, membranlar çok akışkan hale geldiğindeki biyolojik membranların fonksiyonu, enzim aktiviteleri değiştiğindeki hüresel metabolizma, hücre bölünmesi, DNA replikasyonu ve onarımıdır. Isının bu önemli etkilerinden dolayı, hücreler hayatta kalabilmek için ısıdan kaynaklanan bu olumsuz durumları kontrol etmek ve önlemler almak zorundadır. Bu olumsuz durumlardan kaynaklı her bir bir düzen bozulması hücre tarafından ayrı ayrı algılanarak işleme özgü bir yanıt tetiklemektedir (Velichko ve ark. 2013).

Isı ile ilgili yapılan çalışmalarda arilsülfataz enzimi yardımı ile bir HSR'nın hangi sıcaklıklarda tetiklendiği test edilmiştir. Bu amaçla  $\beta$ TUB II-32 ve HSP70A III-1 suşlarındaki ARS aktivitesi tayini için 23°C'de üreyen suşlar işlem devamında hemen 35, 37, 40 ve 42°C gibi farklı sıcaklıklarda izlenmiştir. Sıcaklığın artması ile hücrelerin ARS aktivitelerinde belirgin bir artma meydana gelmiş, ancak 40°C'de bu artışın oldukça fazla olduğu tespit edilmiştir. ARS aktivitesindeki artış aynı zamanda HSP70A'nın da ekspersiyonunun hücrede arttığını ve bu durumda da canlılığın kendisini yüksek sıcaklıktan koruduğunu göstermektedir. Bu durumda hücre maksimum ısı şok yanıtını 40°C'de göstermiştir. 42°C'de ARS aktivitesinde düşüş gözlenmiş, bu da yüksek sıcaklıklarda ya arilsülfataz enziminin ya da HSP70A'nın yapısının bozulmasından yani proteinlerin denatüre olmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu da dolaylı olarak hücre canlılığının üzerinde negatif etki yaratabilir. Buna benzer bir durum Schroda ve ark. (2015) tarafından da ileri sürülmüştür. *Chlamydomonas*, bitkiler ve



diğer organizmalarda ısı stresinin algılanması ve yanıtı konusunda birçok çalışma yapılmıştır (Morimoto 1998; Schroda ve ark. 2000; Schulz-Raffelt ve ark. 2007, Schmollinger ve ark. 2013). Tanaka ve ark. (2000) *Chlamydomonas* hücrelerinin ortam sıcaklığı 20°C'den 39-41°C'ye değiştiğinde artan ısı şok proteini ifadesinin ısı şok yanıtını oluşturduğunu, HSPs'in indüksiyonunun 35-40°C arasında başladığını ve akümülyasyonlarının da 41°C'ye kadar sürdüğünü belirtmiştir. Kobayashi ve ark. (2014) ise *Chlamydomonas* hücrelerinde sıcaklığın 24°C'den 36°C'ye çıkarıldığında ısı şok yanıtının indüklendiğini ve hücrelerin 42,4°C'ye kadar çıkarıldığında hayatta kaldığını tespit etmiştir. *C.reinhardtii* yabancı tipleri ve mutant suşlarının genel yaşam koşullarına bakıldığında sıcaklık açısından 15°C'ye kadar düşebilen ve 35°C kadar yükselebilen sıcaklıklara toleranslı olduğu gösterilmiştir (Harris, 2009). Gross ve Jahn (1962), *C. moewusii*'nin 32,5°C'de geliştiğini ve canlı kaldığını ancak 35°C'de bölünemediğini bildirmiştir. Harris (2009) *Chlamydomonas* için 25°C'nin uygun olmadığını, 15-24°C arasında tutulması gerektiğini belirtmiştir.

Isı stresi koşullarında katlanmamış proteinler katlanmış proteinlerle baş edebilmek için şaperonların kapasitesini aşar, bu da stres kinazlar yardımıyla HSFs aktivasyonuna öncülük eder. HSF1 ısı şok genlerinin transkripsiyonunu kontrol ettiğinden yeni şaperonların üretimini uyarır ve ısı şokuyla sekteye uğrayan protein homeostazisinin tekrar kurulmasını sağlamaya çalışır (Schulz-Raffelt ve ark. 2007, Nordhues ve ark. 2010, Schmollinger ve ark. 2013). *Physcomitrella patens* yosunu üzerinde yapılan bir çalışmada ısı şoku koşulları altında birincil sıcaklık sensörü olarak plazma membranını gösteren bir model sunulmuştur (Saidi ve ark. 2010). Bu model bitkilerde mutlak sıcaklıktan ziyade sıcaklık farkının bitki ısı şok yanıtını (HSR) belirlediğini ve membran akışkanlığı arttığında membran lipid bileşimin kalsiyum kanallarını açarak kalsiyum bağımlı ısı sinyal yolunu düzenlediğini öne sürmüştür. Schmollinger ve ark (2013) ise *Chlamydomonas*'ta bitkilerden farklı olarak ısı stresi tepkisinin katlanmamış proteinlerin birikmesi ile tetiklendiğini, hücre dışı kalsiyumun etkisinin olmadığını göstermiştir. Bu modelde ise HS altında biriken katlanmamış proteinler algılanır ve uygun çözünenlerin üretimini ve moleküler şaperonların ekspresyonunu tetiklemek için bir sinyalleşme kaskadı salgılanarak protein homeostazisini yeniden oluşturmak için birlikte hareket ederler. Isı şoku altındaki hücre zarlarının artan akışkanlığı ayrı ayrı algılanarak, normal membran viskozitesini geri kazanmak için doymuş yağlı asitlerin üretimi ve bunların

membran lipitlerine katılmalarını arttıran bir sinyalleşme kaskadı aktive edilir (Velichko ve ark. 2012). Birinci öne sürülen model ısı şok yanıtının membran akışkanlığının artmasıyla tetiklendiğini desteklerken, ikincisi model denatüre proteinlerin birikimiyle gerçekleştiğini desteklemektedir. Kara bitkilerinde ve *Chlamydomonas*'da katlanmamış proteinlerin birikiminin HSP gen ekspresyonunu tetiklediği çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Kurepa ve ark. 2003, Schmollinger ve ark. 2013). Bu çalışmada da hücrelerin 23°C den 35°C ye dahi çıkarıldığında ısı şok yanıtının indüklendiği görülmüştür. Dolayısıyla ısı şok yanıtının sıcaklık farklarından ziyade mutlak sıcaklıkla ilişkili olduğu görülmüştür, bu da “denatüre proteinlerin birikimi” modelini desteklemektedir. Gözlenen varyasyonlar optimum büyüme koşullarındaki farklılıklar ve/veya kullanılan suşlar arasındaki farklılıklar ile açıklanabilir (Schroda ve ark. 2015).

Işık şiddeti HSR'da ısı şok yanıtına karşı oldukça etkilidir. Von Gromoff ve ark. (1989) *Chlamydomonas*'ta ısı şok genlerinin ifadesinin termal stres ve ışık tarafından düzenlenmekte olduğunu, HSP genlerinin ışık yoluyla ifadesinin ise fotoreseptör içeren bir sinyal zinciri tarafından kontrol edilebildiğini rapor etmişlerdir. *Chlamydomonas* HSP genlerinin moleküler analizi, bunların ifadeleri ile ilgili fotobiyolojik çalışmalarla birleştirildiğinde, ışığın bu genleri düzenleme mekanizmaları hakkında bilgi sağlayacaktır. Bazı araştırmalarda *Chlamydomonas* aydınlatma ortamında sürekli ışık değeri  $40\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Schroda ve ark 2000),  $45\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Ohresser ve ark. 1997),  $150\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Hostos ve ark 1988),  $30\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Schulz-Raffelt 2007) olarak rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda 200-1 500 lux kullanılmış, bunun üzerindeki değerler yüksek ışık şiddeti, altındaki değerler ise düşük ışık şiddeti olarak değerlendirilmiştir (Bassi ve ark. 1992, Mayfield ve ark. 2004, Zhang ve ark 2017). Goto ve ark. (1995) sürekli ışık çalışmalarında 1 000 lux kullanırken, Zhang ve ark (2017) sürekli ışık denemelerinde 700 lux ve 1 500 lux ışık şiddeti değerlerini kullanmıştır. Chae ve ark. (2015) yüksek ışık denemeleri için 4 660 lux kullanarak ışık şokunun üreme üzerine olan etkisini incelemiştir. Mayfield ve ark. (2004) ise luxCt (kloroplast optimize lusiferaz) geninin raportör olarak kullanılabilirliğini gösteren araştırmasını 4 000 lux yüksek ışık şiddeti kullanarak gerçekleştirmiştir. Argumedeo ve ark. (2013) 8 020 lux, 5 700 lux, 3 180 lux ve 0 lux değerlerini kullanarak ışık şiddetinin hücre yoğunluğuna olan etkisini incelemiştir. Gomes ve ark. (2017) yüksek ışık şiddeti olarak 3 000 lux kullanmış ve çeşitli fizyolojik araştırmalar yapmıştır. Bu çalışmada da 0-10 000 Lux

arasındaki farklı aydınlatmalar ve farklı periyodlar boyunca (0 [kontrol], 2, 6, 12, 24saat) hücreler ışık stresine maruz bırakılmış ve ARS aktivitesi tespit edilmiştir. Çalışmada transformantlar sürekli ışık değeri olarak  $40\mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 'de (1 500 lux) ve  $23^{\circ}\text{C}$ 'de kültüvasyona bırakılmıştır. Havalandırma ve gölgelenmenin üstesinden gelmek için de sıvı kültürler 150 rpm hızında çalkalanmıştır. Denemelerde özellikle düşük aydınlatma koşullarında HSP70AIII-1 transformantında arilsülfataz aktivitesinde değişim gözlemlenmemiş, 2 000 Lux ve üzeri yüksek aydınlatmalarda ise aktivitenin 2-4 kat arttığı saptanmıştır. 10 000 Lux ışık şiddetinde en fazla ARS artışı 2 saat sonunda elde edilmiştir. Işık şiddetinin etkisinin periyod artışına bağlı olarak paralel olmadığı ve periyodun artması ile ARS aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir. Dolayısı ile bu durum ışık şiddetinin doğrudan stres yanıtını oluşturduğu şeklinde açıklanabilir. Benzer şekilde Wang ve ark. (2004) yüksek ışığın fotoinhibitör etki göstererek diğer stresler gibi HSP'leri indüklediğini tespit etmiştir. Fotoinhibisyon, fotosentez için büyük bir sınırlamadır. Fotoinhibisyon, aşırı radyasyonun fotosentetik elektron taşınım bileşenlerinin azalmasına yol açtığına meydana gelir. Bu durum da elektron taşınımının bozulmasına, nihayetinde fotosentetik reaksiyon merkezlerinde geri dönüşü olmayan hasarlara neden olur. HSP'ler yüksek ışıkla indüklenerek hücreyi fotoinhibisyona karşı koruyabilir (örneğin, fotosistem II [PSII] 'yi koruyarak veya tilakoid membranları stabilize ederek) ve ışığın zararlı etkilerini hafifletebilir (Schroda ve ark. 1999). Işık HSP'lerin indüksiyonu üzerine etkisi siyanobakterilerde (Asadulghani ve ark. 2003), alglerde (Dryzmalla et al. 1996) ve daha yüksek bitkilerde (Rossel ve ark. 2002) gösterilmiştir. Işık şiddetine maruz kalma süresinin artmasıyla enzim yapısındaki bağların kopması, yeni kolavent bağların oluşması veya enzimin aktivitesi üzerinde etkili olan metal iyonlarının molekülden ayrılmasına neden olabileğinden enzimin yapısının bozulması söz konusu olabilir. Yüksek ışık enzimlere zarar verebilecek birçok işlemi katalizleyebilir (Barua ve ark. 2006).

UV-B radyasyonu prokaryotik ve ökaryotik hücreler üzerinde mutagenез, temel fizyolojik işlemlerin sekteye uğraması ve ölümle sonuçlanabilecek akut fizyolojik stresler gibi potansiyel olarak birçok zararlı etki gösterirken, ısı şok proteinleri hücrenin UV kaynaklı bu hasarlarla başa çıkmasına yardımcı olabilmektedir (Trautinger ve ark. 1996). Bu çalışmada, UV-B uygulaması 2, 6 ve 12saat periyodları boyunca yapılmış ve arilsülfataz aktivitesinde kaydadeğer bir değişme gözlenmemiştir. UV-B DNA veya

RNA'da kırılma ve diğer hasara neden olabilir. Bunun yanında, UV-B radyasyonu sıklıkla artan lipid ve protein oksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşmasıyla oksidatif stresi tetikler. Böylece bitki hücrelerinde oksijen toksisitesi artar (Jain ve ark. 2004). UV-B enzimin aktif bölgesindeki spesifik aminoasit kompozisyonunda değişikliklere yol açtığından enzimin fonksiyonun değişmesine ve dolayısıyla aktivitenin tamamen durmasına neden olabilir. Bu durumda, transformant UV-B radyasyonuna karşı uyarlanabilir bir hücresel yanıt sağlayamamış olabilir. Bazı çalışmalarda UV-B'nin etkisine protein seviyesinde bakılmış ve  $70\mu\text{Wcm}^{-2}$  şiddetindeki UV-B radyasyonuna 6saat maruz bırakılan hücrelerde HSP70 seviyesinde 2,9 kat artış olduğunu rapor etmiştir. UV-B'nin ortadan kaldırılmasından sonra ısı şoku proteinlerinin oluşan hasarı onarmayı sağlayabileceği saptanmıştır (Liu ve ark. 2010).

Bitki hücrelerinde yapılan bazı araştırmalar plazma membranındaki birincil ısı algılayıcılarının kalsiyum kanalları olduğunu desteklemektedir. Sıcaklıktaki değişiklikler, biyolojik membranların akışkanlığını değiştirebilir, bu da membranların hücreler arası kompartımanlar arasında bariyer oluşturabilme işlevlerini ve integral membran proteinlerinin aktivitesini bozabilir (Saidi ve ark. 2011). *Chlamydomonas* için ise bitkilerden farklı olarak ısı şokunun membran akışkanlığındaki değişikliklerle algılanıp algılanmadığı halen araştırılmaya devam edilmektedir. Bu çalışmada da kalsiyumun ısı şok yanıtını tetiklemede etkisinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla kalsiyum konsantrasyonu, kalsiyum iyon kanalı bloklayıcıları (lantan, gadolinyum ve verapamil) ve şelatlayıcıları (EGTA ve BAPTA) kullanılmıştır. Kalsiyum konsantrasyonun etkileri araştırıldığında en fazla ısı stres yanıtının 100mM kalsiyum varlığında olduğu saptanmıştır. Konsantrasyonun artması ile ısı stres yanıtının devam ettiği görülmüştür. Bu durum hücre zarında kalsiyum kanallarının açılarak hücre içine kalsiyum akışına izin verilmesi ile HSR'nin tetiklenmiş olabileceğini göstermektedir. Dolayısı ile kalsiyum ikinci haberci olarak rol oynamıştır. Kalsiyum şelatlayıcıları olan EGTA ve BAPTA varlığında ısı stres yanıtının tetiklendiği gözlenmiştir. Bu durum verilen ısı ile kalsiyum kanallarından kalsiyumun akışı, hücre depolarından açığa çıkan kalsiyum ile birlikte olan artışın ısı şoku yanıtını tetikleyerek EGTA ve BAPTA kalsiyum şelatlayıcılarının konsantrasyonunun yetersiz kalışından kaynaklanıyor olabilir. Diğer yandan kalsiyum bloklayıcıları varlığında da yanıtın tetiklendiği saptanmıştır. Ancak lantan ve gadolinyum'un yüksek

konsantrasyonlarında ARS aktivitesindeki düşüşler ya da sabit kalma durumu bunların kalsiyum bloklayıcı olarak rol oynadığını göstermiştir. Şelatlayıcı ve bloklayıcıların HS algılama/sinyal iletimini engellediği rapor edilmiştir (Lancaster ve Batchelor 2000, Saoudi ve ark. 2004). Bitkilerde ısı şok sinyali iletiminde kalsiyumun rolü için önemli kanıtlar vardır: Isı şok uygulamalarında bitki hücre sitozolünde kalsiyum konsantrasyonlarında geçici olarak artış gözlenmiştir (Gong ve ark. 1998, Liu ve ark. 2003, Gao ve ark. 2012). Özellikle ekstraselüler kalsiyum akışının çok önemli olduğu bulunmuş, ısı şok uygulamasından önce kalsiyum şelatlayıcıları EGTA veya BAPTA, veya kalsiyum iyon kanalı blokörleri lanthanum, gadolinyum veya verapamil uygulandığında ısı şok yanıtının azaldığı / kaldırıldığı bildirilmiştir (Link ve ark. 2002, Liu ve ark. 2003, Suri ve Dhindsa 2008, Saidi ve ark. 2009, Gao ve ark. 2012, Wu ve ark. 2012). Bazı çalışmalardan elde edilen sonuçlar ısı stresindeki hücrelerin sitozollerindeki kalsiyum akümüülasyonunun sadece hücre dışı depolardan geldiğini öne sürerken (Sangwan ve ark. 2002, Saidi ve ark. 2009, Wu ve ark. 2012), buna karşılık diğer çalışmalar hücre içi kalsiyum depolarının da kaynak olarak kullanıldığını belirtmektedir (Gong ve ark. 1998, Zheng ve ark. 2012). Bitkilerde hücre dışı kalsiyum akışına, yüksek sıcaklıklarda artan bir membran akışkanlığının bir sonucu olarak spesifik kalsiyum kanallarının açılmasının aracılık ettiği belirtilmiştir (Saidi ve ark. 2009). Hücre dışı kalsiyumun ısı şok yanıtına aracılık etmedeki rolüyle ilgili *Chlamydomonas* ile elde edilen sonuçlar bitkilerdekilerle karşılaştırıldığında tutarsız bulunmuştur (Schroda 2000). Ancak, bu çalışmada *Chlamydomonas*'da kalsiyumun ısı şok yanıtında etkili olduğu gösterilmiştir.

Tuz konsantrasyonu, doğal ortamda alglerin fizyolojik durumunu ve metabolizmasını etkileyen önemli bir faktördür (Li ve Brawley 2004, Iwamoto ve Shiraiwa 2005). Bu çalışmada *C.reinhardtii*'de 0,25-150mM NaCl konsantrasyonları denenmiş, arilsülfataz enzimi aktivitesinde bir değişiklik hemen hemen gözlemlenmemiştir. Yüksek bitkilerde ve diğer alglerde tuz stresi varlığında hücrelerde prolin birikiminin olduğu bildirilmiştir (Mastrobuoni ve ark 2012, Kempa ve ark. 2008, Liu ve ark. 1997, Cramer ve ark. 2007). Mastrobuoni ve ark. (2012) *C.reinhardtii* CC1618 (cw15, arg7, mt-) suşu ile yaptığı tuzluluk stresi çalışmalarında 100mM ve 150mM NaCl konsantrasyonlarını kullanarak 1, 3, 8, 24 saatlik periyotlarda incelemişler ve GC-MS düzeyinde metabolom analizi gerçekleştirildiğinde glutamat prolin ve putresin protein

seviyelerinde artış gözlemlenmişlerdir. Bunun sonucunda aminoasit metabolizmasının tuz stresiyle beraber indüklendiğini, 100mM'da 24saat'de ancak bir indüklenme yakalanmışken 150mM'da bu indüklenmenin daha kısa bir süre olan 1 saatte gerçekleşebildiğini saptamışlardır. Liu ve ark. (2010) %31 tuzluluk içeriğine sahip kaynaktan izole ettiği bir *C.reinhardtii* suşunu %62-%93 arasında değişen tuz konsantrasyonlarına 2-12 saat arası periyotlarda maruz bırakmış, %62 tuzluluk seviyesinde HSP70 mRNA ekspresyon seviyesindeki artışın 3 kat olduğunu tespit etmiş ancak bu tuzluluk seviyesi arttırıldığında mRNA ekspresyon seviyesindeki artışın da daha az seviyede olduğu tespit edilmiştir. Literatürde benzer suşlar için kullanılan tuzluluk konsantrasyonlarının ısı şok stres yanıtında etkili olmadığı sonucuna varılabilir. Bu farklılık suşlar arası varyasyonlardan kaynaklanıyor olabilir.

Yüm sonuçlar RT-qPCR sonuçları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ARS aktiviteleriyle paralel sonuçlar göstermektedir. En fazla ifade ARS aktivite değerleri ile paralel olup, 40°C, 120dk ısıya maruz bırakılan örneklerde, 2saat 10 000 Lux'da bırakılan örneklerde, 100mM kalsiyum konsantrasyonunda, kalsiyum şelatlayıcı ve bloklayıcılarında ise EGTA ve verapamilde görülmüştür. Böylece moleküler seviyede elde edilen relatif transkript seviyesindeki artışların analitik olarak ölçülen enzimatik analizdeki artışları destekler nitelikte olduğundan, çalışmada kullanılan seçici ARS raportör geninin elverişli olduğu sonucuna varılabilir.

Bu çalışmada rekombinant *C.reinhardtii* HSP70A III-1 klonu kullanılarak ısı şok yanıtında etkili olduğu düşünülen çeşitli kimyasal ve fiziksel parametreler denenmiş ve bilime katkı sağlayacak veriler elde edilmiştir. Metabolik dengesizliklerin *Chlamydomonas*'ın ısı şokunu algılamasında rol oynayıp oynamadığı konusunda araştırmaya ihtiyaç vardır. Bitkilerde ve *Chlamydomonas*'ta DNA replikasyonu ve onarımı üzerine ısı şokunun etkileri iyi anlaşılmamıştır bu konuda da araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Anonim 2019**, <https://www.chlamycollection.org/resources/resources-for-teaching/life-cycle/> (Erişim tarihi: 2019).
- Anonim 1999**, <http://www-personal.ksu.edu/~bethmont/mutdes.html> (Erişim tarihi: 2019).
- Anonim 2019**, <https://www.drugs.com/search.php?searchterm=verapamil> (Erişim tarihi: 2019)
- Anonim 2019**,. <https://www.uniprot.org/uniprot/P04690> (Erişim tarihi:2019)
- Akerfelt, M., Morimoto, R. I., Sistonen, L. 2010**. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature Reviews Molecular cell biology*,11(8): 545.
- Alabi, A. O., Bibeau, E., Tampier, M., Council, B. C. I. 2009**. Microalgae technologies , processes for biofuels-bioenergy production in British Columbia: current technology, suitability , barriers to implementation. Vancouver: British Columbia Innovation Council., 88.
- Allakhverdiev, S. I., Kreslavski, V. D., Klimov, V. V., Los, D. A., Carpentier, R., Mohanty, P. 2008**. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynthesis Research*, 98(1-3): 541-550.
- Al-Whaibi, M.H., 2011**. Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University-Science*, 23: 139-50.
- Ankar, J., Sistonen, L. 2011**. Regulation of HSF1 function in the heat stress response: implications in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.*, 80: 1089-1115.
- Argumedo, G. J. A., Choi, S. E., Hendricks, S., Wang, A. 2013**. Measuring the Effect of Decreasing Light Intensity on the Cell Density of the Unicellular Algae *Chlamydomonas reinhardtii* at 17°C. *The Expedition*, 2.
- Armstrong, G.A., Hearst, J.E. 1996**. Carotenoids 2: Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* 10: 228-237.
- Aufricht, C. 2005**. Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatric Nephrology*, 20(6), 707-713.
- Asadulghani, Suzuki Y., Nakamoto H. 2003**. Light plays a key role in the modulation of heat shock response in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306: 872-879.
- Baniwal, S. K., Bharti, K., Chan, K. Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., ... Tripp, J. 2004**. Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of biosciences*, 29(4), 471-487.
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2005**. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*, 1st ed., CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Barua, D., Heckathorn, S. A., Coleman, J. S. 2008**. Variation in heat-shock proteins and photosynthetic thermotolerance among natural populations of *Chenopodium album* L. from contrasting thermal environments: Implications for plant responses to global warming. *Journal of Integrative Plant Biology*,50(11), 1440-1451.
- Bassi, R., Soen, S. Y., Frank, G., Zuber, H., Rochaix, J. D. 1992**. Characterization of chlorophyll a/b proteins of photosystem I from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36): 25714-25721.
- Becker, E. W. 1994**. *Microalgae: Biotechnology and microbiology*. New York: Cambridge University Press.

- Ben-Amotz, A. 1985.** Tornabene, T.G., Thomas, W.H. Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids. *J. Phycol.*, 21: 72-81.
- Ben-Amotz, A., Avron, M. 1990.** The biotechnology of cultivating the halotolerant alga *Dunaliella*. *Trends in Biotechnology*, 8: 121-126.
- Bennoun, P., Atteia, A., Pierre, Y., Delosme, M. 1995.** Etiolated cells of *Chlamydomonas reinhardtii*: choice material for characterization of mitochondrial membrane polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22): 10202-10206.
- Berman-Frank, I., Dubinsky, Z. 1999.** Balanced growth and aquatic plants: Myth or reality? Phytoplankton use the imbalance between carbon assimilation and biomass production to their strategic advantage. *Bioscience*, 49, 29-37.
- Berner, T., Dubinsky, Z., Wyman, K., Falkowski, P. G. 1989.** Photoadaptation and the "package" effect in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) 1. *Journal of Phycology*, 25(1): 70-78.
- Bertsch, U., Soll, J., Seetharam, R., Viitanen, P. V. 1992.** Identification, characterization, and DNA sequence of a functional "double" groES-like chaperonin from chloroplasts of higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(18): 8696-8700.
- Bett, G. C., & Rasmusson, R. L. 2002.** Computer models of ion channels. *Quantitative Cardiac Electrophysiology*, 688.
- Blamowska, M., Sichting, M., Mapa, K., Mokranjac, D., Neupert, W., Hell, K. 2010.** ATPase domain and interdomain linker play a key role in aggregation of mitochondrial Hsp70 chaperone Ssc1. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7): 4423-4431.
- Borchardt, J. A., Azad, H. S. 1968.** Biological extraction of nutrients. *Journal Water Pollution Control Federation*, 1739-1754.
- Borodin, V.B. 2008.** Effect of red and blue light on acclimation of *Chlamydomonas reinhardtii* to CO<sub>2</sub>-limiting conditions. *Rus. J. Plant Physiol.*, 55: 441-448.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V., Vierling, E. 1996.** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.*, 32: 191-222.
- Boudreau, E., Otis, C., Turmel, M. 1994.** Conserved gene clusters in the highly rearranged chloroplast genomes of *Chlamydomonas moewusii* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.*, 24: 585-602
- Brody, M., Vatter, A.E. 1959.** Observations on cellular structures of *Porphyridium cruentum*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 5: 289-294.
- Bruland, K.W., Donat, J.R., Hutchins, D.A. 1991.** Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 36: 1555-1577.
- Campanella, L., Cubadda, F., Sammartino, M., Saoncella, A. 2001.** An algal biosensor for the monitoring of water toxicity in estuarine environments. *Water Res.*, 35: 69-76.
- Campbell, A. M., Rayala, H. J., Goodenough, U. W. 1995.** The iso1 gene of *Chlamydomonas* is involved in sex determination. *Molecular Biology Of The Cell.*, 6(1): 87-95.
- Chae, J., Jegal, S., Keraiff, T. L., Sepehri, K. 2015.** Effect of light intensity on *Chlamydomonas reinhardtii* growth rate. *The Expedition*, 4.
- Chen, C.Y., Durbin, E.G. 1994.** Effects of pH on the growth and carbon uptake of marine phytoplankton. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 109: 83-94.
- Chisti, Y. 2007.** Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* 25: 294-306.



- Cole, D.G. 1999.** Kinesin-II, coming and going. *J. Cell Biol.*, 147:463-66
- Coll, J. M. 2006.** Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae: a review. *Spanish Journal of Agricultural Research*,4(4): 316-330.
- Conner, T. W., LaFayette, P. R., Nagao, R. T., Key, J. L. 1990.** Sequence and expression of a HSP83 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, 94: 1689-95.
- Cooper, P., Ho, T.-H. D. 1987.** Intracellular localization of heat shock proteins in maize. *Plant Physiol.*, 84: 1197- 203
- Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., del Borghi, M. 2009.** Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.*, 48: 1146-1151.
- Cotto, J.J., Kline, M., and Morimoto, R.I. 1996.** Activation of heat shock factor 1 DNA binding precedes stress-induced serine phosphorylation: evidence for a multistep pathway of regulation. *J. Biol. Chem.*, 271: 3355-3358.
- Cramer, G.R., Ergul, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E.A., Bohlman, M.C., Vincent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne C. 2007.** Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics*, 7(2): 111-134.
- Crist, R.H., Martin, J.R., Guptill, P.W., Eslinger, J.M., Crist, D.L.R. 1990.** Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 337-342.
- Davies, J.P., Weeks, D.P., Grossman, A.R., 1992.** Expression of the Arylsulfatase Gene from the Beta-2-Tubulin Promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res*, 20: 2959-2965.
- Davies, J. P., Grossman, A. R. 1994.** Sequences controlling transcription of the *Chlamydomonas reinhardtii* beta 2-tubulin gene after deflagellation and during the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology*, 14(8): 5165-5174.
- Deininger, W., Fuhrmann, M., Hegemann, P. 2000.** Opsin evolution: out of wild green yonder? *Trends in Genetics*, 16(4): 158-159.
- Devi, M.P., Mohan, S.V. 2012.** CO<sub>2</sub> supplementation to domestic wastewater enhances microalgae lipid accumulation under mixotrophic microenvironment. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 23-29.
- Dickson, R., Weiss, C., Howard, R.J., Alldrick, S.P., Ellis, R.J., Lorimer, G., et al., 2000.** Reconstitution of higher plant chloroplast chaperonin 60 tetradecamers active in protein folding. *J. Biol. Chem.*, 275: 11829-11835.
- Drzymalla, C., Schroda, M., Beck, C.F. 1996.** Light-inducible gene HSP70B encodes a chloroplast-localized heat shock protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Molecular Biology*, 31: 1185-1194.
- Dubinsky, Z., Matsukawa, R., Karube, I. 1995.** Photobiological aspects of algal mass culture. *J. Mar. Biotechnol.*, 2: 61-67.
- Eberhard, S., Finazzi, G. Wollman, F.A. 2008.** The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42: 463-515.
- Ehler, L. L., Dutcher, S. K. 1998.** Pharmacological and genetic evidence for a role of rootlet and phycoplast microtubules in the positioning and assembly of cleavage furrows in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 40(2): 193-207.
- Emerson, R., Lewis, C.M. 1943.** The dependence of the quantum yield of *Chlorella* photosynthesis on wave length of light. *Am. J. Bot.*, 30: 165-178.

- Eriksson, M., Gardestrom, P., Samuelsson, G. 1995.** Isolation, purification, and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 107: 479-83.
- Ettl, H. 1970.** Die Gattung *Chloromonas* Gobi emend. Wille. *Beihefte zur Nova Hedwigia*, 34: 1-283.
- Fábregas, J., Maseda, A., Domínguez, A., Otero, A. 2004.** The cell composition of *Nannochloropsis* sp. changes under different irradiances in semicontinuous culture. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 31-35.
- Feng, P., Deng, Z., Fan, L., Hu, Z. 2012.** Lipid accumulation and growth characteristics of *Chlorella zofingiensis* under different nitrate and phosphate concentrations. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114: 405-410.
- Fernanda P., M. 2012.** Harmful effects of UV radiation in *algae* and aquatic macrophytes-A review. *Emir. J. Food Agric.*, 24: 510-526.
- Ferro, M., Brugiére, S., Salvi, D. 2010.** AT\_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Mol. Cell Proteomics*, 9: 1063-1084.
- Finka, A., Mattoo, R. U., Goloubinoff, P. 2011.** Meta-analysis of heat-and chemically upregulated chaperone genes in plant and human cells. *Cell Stress and Chaperones*, 16(1), 15-31.
- Frydman, J., 2001.** Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.*, 70: 603-647.
- Fuggi, A., Pinto, G., Pollio, A., Taddei, R. 1988.** The role of glycerol in osmoregulation of the acidophilic alga *Dunaliella acidophila* (*Volvocales*, *Chlorophyta*): Effect of solute stress on photosynthesis, respiration and glycerol synthesis. *Phycologia*, 27: 439-446.
- Fujita, R.M., Wheeler, P.A., Edwards, R.L. 1988.** Metabolic regulation of ammonia uptake by *Ulva rigida* (*Chlorophyta*): A compartmental analysis of the rate limiting step for uptake. *J. Phycol.*, 24: 560-566.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., Hegemann, P., 1999.** A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Plant Journal*, 19: 353-361.
- Gao, F., Han, X., Wu, J., Zheng, S., Shang, Z., Sun, D., Zhou, R., Li, B., 2012.** A heat-activated calcium-permeable channel-Arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channel 6--is involved in heat shock responses. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 70: 1056-1069.
- Gehl, K.A., Colman, B. 1985.** Effect of external pH on the internal pH of *Chlorella saccharophila*. *Plant Physiol.*, 77: 917-921.
- Gerloff-Elias, A., Barua, D., Mölich, A., Spijkerman, E. 2006.** Temperature-and pH-dependent accumulation of heat-shock proteins in the acidophilic green alga *Chlamydomonas acidophila*. *FEMS Microbiology Ecology*, 56(3): 345-354.
- Gomes, M. P., Juneau, P. 2017.** Temperature and light modulation of herbicide toxicity on algal and cyanobacterial physiology. *Frontiers in Environmental Science*, 5: 50.
- Gong, M., van der Luit, A.H., Knight, M.R., Trewavas, A.J. 1998.** Heat-shock-induced changes in intracellular  $Ca^{2+}$  level in tobacco seedlings in relation to thermotolerance. *Plant Physiology*, 116: 429-437.
- Goodenough, U.W., Armbrust, E.V., Campbell, A.M., Ferris, P.J. 1995.** Molecular genetics of sexuality in *Chlamydomonas*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46: 21-44

- Gordillo, F.J.L., Jiménez, C., Figueroa, F.L., Niell, F.X. 1998.** Effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> and N supply on photosynthesis, growth and cell composition of the cyanobacterium *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). *J. Appl. Phycol.*, 10: 461-469.
- Goto, K., Johnson, C. H. 1995.** Is the cell division cycle gated by a circadian clock? The case of *Chlamydomonas reinhardtii*. *The Journal of Cell Biology*, 129(4): 1061-1069.
- Greene, R.M., Geider, R.J., Kolber, Z., Falkowski, P.G. 1992.** Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae. *Plant Physiol.*, 100: 565-575.
- Gross, J.A., Jahn, T. L. 1962.** Cellular responses to thermal and photo stress. I. *Euglena* and *Chlamydomonas*. *J. Protozool.*, 9: 340-346.
- Guckert, J.B., Cooksey, K.E. 1990.** Triglyceride accumulation and fatty acid profile changes in *Chlorella* (*Chlorophyta*) during high pH induced cell cycle inhibition. *J. Phycol.*, 26: 72-79.
- Guschina, I.A., Harwood, J.L. 2009.** Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry. in *lipids in Aquatic Ecosystems*, Springer: Berlin, Germany, 1-24.
- Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., Scharf, K.D. 2011.** Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato. *Plant Cell.* , 23: 741-755.
- Hails, T., Jobling, M., Day, A. 1993.** Large arrays of tandemly repeated DNA sequences in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chromosoma*, 102: 500-7
- Harper, J. D. 1999.** *Chlamydomonas* cell cycle mutants. *International Review of Cytology*, 189: 131-176. Academic Press.
- Harris, E.H. 1989.** The *Chlamydomonas* Sourcebook. San Diego, Academic. 780s.
- Harris, E.H., 2008.** The *Chlamydomonas* Sourcebook: Introduction to *Chlamydomonas* and its Laboratory Use, second ed. Elsevier/Academic Press, San Diego, CA.
- Harris, E.H., 2001.** *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 363-406.
- Harris, G.P. 1986.** Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation, Chapman and Hall: New York, NY, USA.
- Harris, E. H. 2009.** The *Chlamydomonas* sourcebook: introduction to *Chlamydomonas* and its laboratory use. Academic Press.
- Hartl, F.U., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., 2011.** Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475.
- Hartl, F.U. , Hayer-Hartl, M. 2002.** Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science New York*, 295: 1852-1858.
- Hartl, F.U. , Hayer-Hartl, M. 2009.** Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nature structural, Molecular Biology*, 16: 574-581.
- Harwood, J.L. 2004.** Involvement of chloroplast lipids in the reaction of plants submitted to stress. *Lipids in Photosynthesis: Structure, function and genetics*. Siegenthaler, P.A., Murata, N., Eds., Springer: Berlin, Germany, 6: 287-302.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurter, D., Buchner, J., 2005.** Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12: 842-846.
- Hegemann P. 1997.** Vision in microalgae. *Planta*, 203:265-74
- Hema, R., M. Senthil-Kumar, S. Shivakumar, P. C. Reddy, and M. Udayakumar. 2007.** *Chlamydomonas reinhardtii*, a model system for functional validation of abiotic stress responsive genes. *Planta*, 226 (3): 655-670.

- Henley, W.J. 1993.** Measurement and interpretation of photosynthetic light response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *Journal of Phycology*, 25: 729-739.
- Heraud, P., Wood, B.R., Tobin, M.J., Beardall, J., McNaughton, D. 2005.** Mapping of nutrient-induced biochemical changes in living algal cells using synchrotron infrared microspectroscopy. *FEMS Microbiol. Lett.*, 249: 219-225.
- Herrin, D.L., Nickelsen, J. 2004.** Chloroplast RNA processing and stability. *Photosynthesis Research*, 82: 301-314.
- Holm-Hansen, O., Nishida, K., Moses, V., Calvin, M. 1959.** Effects of mineral salts on short-term incorporation of carbon dioxide in *Chlorella*. *J. Exp. Bot.*, 10: 109-124.
- Hostos, E. L., Togaski, R. K., Grossman, A. 1988.** Purification and biosynthesis of a derepressible periplasmic Arylsulphatase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.*, 106: 29-37
- Hostos E.L. de, Schilling, J., Grossman, A.R. 1989.** Structure and expression of the gene encoding the periplasmic arylsulphatase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, 218: 229-239
- Hu, Q. 2004.** Environmental Effects on Cell Composition. In Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology, Richmond, A., Ed., Blackwell: Oxford, UK, 83-93 s.
- Iqbal, M., Zafar, S. 1993.** Effects of photon flux density, CO<sub>2</sub>, aeration rate, and inoculum density on growth and extracellular polysaccharide production by *Porphyridium cruentum*. *Folia Microbiol.*, 38(6): 509-514.
- Ito, T., Tanaka, M., Shinkawa, H., Nakada, T., Ano, Y., Kurano, N... Tomita, M. 2013.** Metabolic and morphological changes of an oil accumulating trebouxioophycean alga in nitrogen-deficient conditions. *Metabolomics*, 9(1): 178-187.
- Iwamoto K., Shiraiwa Y. 2005.** Salt-regulated mannitol metabolism in algae. *Mar Biol* 7: 407-415
- Jain, K., Kataria, S., & Guruprasad, K. N. 2004.** Effect of UV-B radiation on antioxidant enzymes and its modulation by benzoquinone and  $\alpha$ -tocopherol in cucumber cotyledons. *Current Science*, 87-90.
- Jolly, C., Morimoto, R.I., 2000.** Role of the Heat Shock Response and Molecular Chaperones in Oncogenesis and Cell Death. *Journal of the National Cancer Institute*. 92: 1564-1572.
- Kalacheva, G., Zhila, N., Volova, T., Gladyshev, M. 2002.** The effect of temperature on the lipid composition of the green alga *Botryococcus*. *Microbiology*, 71: 286-293.
- Kempa S, Krasensky J: Dal Santo S, Kopka J, Jonak C, 2008.** A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS One* , 3(12):e3935.
- Kennish, M.J. 1992.** *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*, CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Khozin-Goldberg, I. , Cohen, Z. 2006.** The effect of phosphate starvation on the lipid and fatty acid composition of the fresh water eustigmatophyte *Monodus subterraneus*. *Phytochemistry*, 67: 696-701.
- Kim, B.H., Schöffl, F., 2002.** Interaction between *Arabidopsis* heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *Journal of Experimental Botany*, 53: 371-375.
- Kobayashi, Y., Harada, N., Nishimura, Y., Saito, T., Nakamura, M., Fujiwara, T., Kuroiwa, T. and Misumi, O. 2014.** Algae sense exact temperatures: small heat shock proteins are expressed at the survival threshold temperature in *Cyanidioschyzon merolae* and *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genome Biol. Evol.*, 6: 2731-2740.

- Kolber, Z., Zehr, J., Falkowski, P. 1988.** Effects of growth irradiance and nitrogen limitation on photosynthetic energy conversion in photosystem II. *Plant Physiol.*, 88, 923-929.
- Komine, Y., Kwong, L., Anguera, M. C., Schuster, G., , Stern, D B. 2000.** Polyadenylation of three classes of chloroplast RNA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Rna*, 6(4): 598-607.
- Konopka, A., Brock, T.D. 1978.** Effect of temperature on blue-green algae (cyanobacteria) in Lake Mendota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 572-576.
- Kostner, M, Schmidt, B, Bertram, R, Hillen, W 2006.** Generating tetracycline-inducible auxotrophy in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar Typhimurium* by using an insertion element and a hyperactive transposase. *Appl Environ Microbiol*, 72: 4717-4725
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Doring, P., Vierling, E., Scharf, K.D. 2007.** Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10: 310-316.
- Koumoto, Y., Shimada, T., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., 2001.** Chloroplasts have a novel Cpn10 in addition to Cpn20 as co-chaperonins in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, 276: 29688-29694.
- Kromkamp, J. Limbeek, M. 1993.** Effect of short-term variation in irradiance on light harvesting and photosynthesis of the marine diatom *Skeletonema costatum*: a laboratory study simulating vertical mixing. *J. Gen. Microbiol.* , 139: 2277- 2284.
- Kuriyama, H., Takano, H., Suzuki, L., Uchida, H., Kawano, S., Kuroiwa, H., , Kuroiwa, T. 1999.** Characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* zygote-specific cdnas that encode novel proteins containing ankyrin repeats and WW domains. *Plant physiology*, 119(3): 873-884.
- Kurvari, V., Grishin, N.V., , Snell, W.J. 1998.** A gamete-specific, sex-limited homeodomain protein in *Chlamydomonas*. *J Cell Biol*, 143(7), 1971-1980.
- Lancaster, B., Batchelor, A.M. 2000.** Novel action of BAPTA series chelators on intrinsic K<sup>+</sup> currents in rat hippocampal neurones. *J. Physiol.*, 522: 231-246.
- Larned, S. 1998.** Nitrogen-versus phosphorus-limited growth and sources of nutrients for coral reef macroalgae. *Mar. Biol.*, 132, 409-421.
- Lee, S., Lee, Y.J., Choi, S., Park, S.B., Tran, Q.G., Heo, J., , Kim, H.S. 2018.** Development of an alcohol-inducible gene expression system for recombinant protein expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Applied Phycology*, 1-8.
- Li R., Brawley S.H. 2004.** Improved survival under heat stress in intertidal embryos (*Fucus* spp.) simultaneously exposed to hypersalinity and the effect of parental thermal history. *Mar Biol* 144: 205-213.
- Li, X., Gui, S., Bhuiyan, M., Zeng, W., Subedi, Y. 2015.** Quantifying Uptake and Retention of Copper Ions in Silica-Encrusted *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Anal Biochem*, 4: 228.
- Lindquist, S., 1986.** The Heat-Shock Response. *Annual Review of Biochemistry*, 55: 1151-1191.
- Lindquist, S., Craig, E. A. 1988.** The heat shock proteins. *Annu. Rev Genet.*, 22: 631-7.
- Lin, C.Y., Roberts, J.K., Key, J.L. 1984.** Acquisition of thermotolerance in soybean seedlings. *Plant Physiol.*, 74:152-60.

- Link, V., Sinha, A.K., Vashista, P., Hofmann, M.G., Proels, R.K., Ehness, R., Roitsch, T. 2002.** A heat-activated MAP kinase in tomato: a possible regulator of the heat stress response. *FEBS letters*, 531: 179-183.
- Liu, B.H., Lee, Y.K. 2000.** Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp. *J. Appl. Phycol.*, 12: 301-307.
- Liu, H.T., Li, B., Shang, Z.L., Li, X.Z., Mu, R.L., Sun, D.Y., Zhou, R.G. 2003.** Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. *Plant Physiol.* 132: 1186-1195.
- Liu, Z.Y., Wang, G.C., Zhou, B.C. 2008.** Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.*, 99: 4717-4722.
- Liu, S., Zhang, P., Cong, B., Liu, C., Lin, X., Shen, J., , Huang, X. 2010.** Molecular cloning and expression analysis of a cytosolic Hsp70 gene from Antarctic ice algae *Chlamydomonas* sp. ICE-L. *Extremophiles*, 14(3): 329-337.
- Liu J, Zhu JK. 1997.** Proline accumulation and salt-stress-induced gene expression in a salt-hypersensitive mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 114(2): 591-596.
- Luykx, P., Hoppenrath, M., Robinson, D. G. 1997.** Osmoregulatory mutants that affect the function of the contractile vacuole in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protoplasma*, 200: 99-111.
- Lynn, S.G., Kilham, S.S., Kreger, D.A., Interlandi, S.J. 2000.** Effect of nutrient availability on the biochemical and elemental stoichiometry in the freshwater diatom *Stephanodiscus minutulus* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 36: 510-522.
- Markou, G., Vandamme, D., Muylaert, K. 2014.** Microalgal and cyanobacterial cultivation: the supply of nutrients. *Water Research*, 65, 186-202.
- Mastrobuoni, G., Irgang, S., Pietzke, M., Aßmus, H. E., Wenzel, M., Schulze, W. X., , Kempa, S. 2012.** Proteome dynamics and early salt stress response of the photosynthetic organism *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC genomics*, 13(1): 215.
- Mata, T.M., Martins, A.A., Caetano, N.S. 2010.** Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 14: 217-232.
- Matsuda, A., Yoshimura, K., Sineschekov, O. A., Hirono, M., , Kamiya, R. 1998.** Isolation and characterization of novel *Chlamydomonas* mutants that display phototaxis but not photophobic response. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 41(4): 353-362.
- Mayfield, S. P., Yohn, C. B., Cohen, A., , Danon, A. 1995.** Regulation of chloroplast gene expression. *Annual review of plant biology*, 46(1): 147-166.
- Mayfield, S. P., , Schultz, J. 2004.** Development of a luciferase reporter gene, luxCt, for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 37(3): 449-458.
- Moazami, N., Ashori, A., Ranjbar, R., Tangestani, M., Egtesadi, R. , Nejad, A.S. 2012.** Large-scale biodiesel production using microalgae biomass of *Nannochloropsis*. *Biomass and Bioenergy*, 39: 449-453.
- McKay, R.M.L., La Roche, J., Yakunin, A.F., Durnford, D.G., Geider, R.J. 1999.** Accumulation of ferredoxin and flavodoxin in a marine diatom in response to Fe. *J. Phycol.*, 35: 510-519.
- Meehl, G.A., Tebaldi, C. 2004.** More Intense, More Frequent, and Longer Lasting Heat Waves in the 21st Century. *Science*, 305: 994-997
- Meher, P.K., Sahu, T.K., Gahoi, S., & Rao, A.R. 2018.** ir-HSP: Improved recognition of heat shock proteins, their families and sub-types based on g-spaced di-peptide features and support vector machine. *Frontiers in Genetics*, 8: 235.
- Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W. A., De Bièvre, P., Gröning, M., ... & Prohaska, T. 2016.** Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 88(3), 265-291.

- Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J. 2007.** The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318(5848): 245-251.
- Merison, K., & Jacobs, H. 2016.** Diagnosis and treatment of childhood migraine. *Current treatment options in neurology*, 18(11): 48.
- Mitsui, A. 1977.** United States-Japan Cooperative Science Program, National Science Foundation (U.S.). *Biological Solar Energy Conversion*, Academic Press: New York, NY, USA.
- Mittler, R., Finka, A., and Goloubinoff, P. 2012.** How do plants feel the heat? *Trends Biochem Sci.*, 37: 118-125.
- Miyachi, S., Kamiya, A. 1978.** Wavelength effects on photosynthetic carbon metabolism in *Chlorella*. *Plant Cell Physiol.*, 19: 277-288.
- Mock, T., Kroon, B.M.A. 2002.** Photosynthetic energy conversion under extreme conditions-II: The significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms. *Phytochemistry*, 61(1): 53-60.
- Mogk, A., Schlieker, C., Friedrich, K.L., Schonfeld, H.J., Vierling, E., Bukau, B., 2003.** Refolding of substrates bound to small Hsps relies on a disaggregation reaction mediated most efficiently by ClpB/DnaK. *J. Biol. Chem.*, 278: 31033-31042.
- Morimoto, R.I. 1998.** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes development*, 12: 3788-3796.
- Morimoto, R.I., 1993.** Cells in Stress - Transcriptional Activation of Heat-Shock Genes. *Science* 259: 1409-1410.
- Moroney, J.V., Tolbert, N.E. 1985.** Inorganic carbon uptake by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.*, 77: 253-258.
- Morris, I., Glover, H., Yentsch, C. 1974.** Products of photosynthesis by marine phytoplankton: The effect of environmental factors on the relative rates of protein synthesis. *Mar. Biol.*, 27: 1-9.
- Moss, B. 1973.** The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: An experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *J. Ecol.*, 61: 157-177.
- Nagao, R. T., Kimpel, J. A., Vierling, E., Key, J. L. 1986.** The heat shock response: a comparative analysis. In *Oxford Surveys of Plant Molecular Cell Biology*, ed. B. J. Mifflin, 3: 384-438. Oxford: Oxford Univ. Press.
- Nagel, G., Szellas, T., Kateriya, S., Adeishvili, N., Hegemann, P., & Bamberg, E 2005.** Channelrhodopsins: directly light-gated cation channels. *Biochemical Society transactions* 33: 863-866.
- Nakamoto, H., Vigh, L., 2007.** The small heat shock proteins and their clients. *Cellular And Molecular Life Sciences.*, 64: 294-306.
- Nakamura, Y., Miyachi, S. 1982.** Effect of temperature on starch degradation in *Chlorella vulgaris* 11 h cells. *Plant Cell Physiol.*, 23: 333-341.
- Neale, P. J., Melis, A. 1989.** Salinity-stress enhances photoinhibition of photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Plant Physiology.*, 134(5): 619-622.
- Neumann, D., Nover, L., Parthier, B., Rieger, R., Scharf, K.-D., et al. 1989.** Heat shock and other stress response systems of plants. *Biol. Zentralbl.*, 108: 1-156.
- Neupert, J., Shao, N., Lu, Y., Bock, R., 2012.** Genetic Transformation of the Model Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Transgenic Plants*, pp. 35-47.
- Nielsen, E.S. 1975.** *Marine Photosynthesis: With Special Emphasis on the Ecological Aspects*, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 13.

- Nordhues, A., Miller, S.M., Muhlhaus, T., Schroda, M. 2010.** New insights into the roles of molecular chaperones in *Chlamydomonas* and *Volvox*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 75-113.
- Nover, L., Bharti, K., Doring, P., Mishra, S.K., Ganguli, A., and Scharf, K.D. 2001.** Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones.*, 6: 177-189.
- Nowicka, B., Jerzy Kruk. 2012.** Plastoquinol is more active than  $\alpha$ -tocopherol in singlet oxygen scavenging during high light stress of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(3): 389-394.
- Ohresser, M., Matagne, R. F., Loppes, R. 1997.** Expression of the arylsulfatase reporter gene under the control of the nit 1 promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 31: 264-271.
- Oswald, W.J. 1988.** Microalgae and waste water treatment. In *Microalgae Biotechnology* (ed. M. B. L. Borowitzka), Cambridge, UK: Cambridge University Press, 254-260.
- Parsell, D. A. and S. Lindquist. 1993.** The function of heat-shock proteins in stress tolerance - degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics.*, 27: 437-496.
- Paszkowski, J., Martienssen, R.A., 2012.** Cell signaling and gene regulation. *Curr Opin. Plant. Biol.*, 15: 493-495.
- Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seeley ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG. 2000.** *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.*, 151: 709-18
- Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB. 1999.** The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J. Cell Biol.*, 144: 473-81.
- Poerschmann, J., Spijkerman, E., Langer, U. 2004.** Fatty acid patterns in *Chlamydomonas* sp. as a marker for nutritional regimes and temperature under extremely acidic conditions. *Microb. Ecol.*, 48: 78-89
- Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. 1989.** Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975: 384-394
- Pratt, W.B., Toft, D.O. 2003.** Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 228: 111-133.
- Prieto R., Pardo J.M., Niu X.M., Bressan R.A., Hasegawa P.M. 1996.** Salt-sensitive mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* isolated after insertional tagging. *Plant Physiol.* 112: 99-104
- Pruder, G.D., Bolton, E.T. 1979.** The role of CO<sub>2</sub> enrichment of aerating gas in the growth of an estuarine diatom. *Aquaculture*, 17: 1-15.
- Pulz, O. 2001.** Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57: 287-293.
- Purton, S., , Rochaix, J. D. 1995.** Characterisation of the ARG7 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its application to nuclear transformation. *European Journal of Phycology*, 30(2): 141-148.
- Quarmby, L. M. 1994.** Signal transduction in the sexual life of *Chlamydomonas*. In *Signals and Signal Transduction Pathways in Plants*, 35-51, Springer, Dordrecht.



- Rai, L., Mallick, N. 1993.** Heavy metal toxicity to algae under synthetic microcosm. *Ecotoxicology*, 2: 231-242.
- Ramalho, J., Semelka, R. C., Ramalho, M., Nunes, R. H., AlObaidy, M., & Castillo, M. 2016.** Gadolinium-based contrast agent accumulation and toxicity: an update. *American Journal of Neuroradiology*, 37(7): 1192-1198.
- Ramanan, R., Vinayagamoorthy, N., Sivanesan, S.D., Kannan, K., Chakrabarti, T. 2012.** Influence of CO<sub>2</sub> concentration on carbon concentrating mechanisms in cyanobacteria and green algae: A proteomic approach. *Algae*, 27: 295-301.
- Rao, A.R., Dayananda, C., Sarada, R., Shamala, T., Ravishankar, G. 2007.** Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents. *Bioresour. Technol.*, 98: 560-564.
- Rastogi, R.P., Incharoensadki, A. 2013.** UV radiation-induced accumulation of photoprotective compounds in the green alga *Tetraspora* sp. CU2551. *Plant Physiol. Biochem.*, 70: 7-13.
- Raven, J.A. 1984.** *Energetics and Transport in Aquatic Plants*, Alan R. Liss: New York, NY, USA.
- Renaud, S.M., Thinh, L.V., Lambrinidis, G., Parry, D.L. 2002.** Effect of temperature on growth, chemical composition and fatty acid composition of tropical Australian microalgae grown in batch cultures. *Aquaculture*, 211: 195-214.
- Renaud, S., Parry, D. 1994.** Microalgae for use in tropical aquaculture II: Effect of salinity on growth, gross chemical composition and fatty acid composition of three species of marine microalgae. *J. Appl. Phycol.*, 6: 347-356.
- Rhee, G.Y., Gotham, I.J. 1981.** The effect of environmental factors on phytoplankton growth: Temperature and the interactions of temperature with nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.*, 26: 635-648.
- Ricci, A. J., Wu, Y. C., & Fettiplace, R. 1998.** The endogenous calcium buffer and the time course of transducer adaptation in auditory hair cells. *Journal of Neuroscience*, 18(20): 8261-8277.
- Richardson, B., Orcutt, D., Schwertner, H., Martinez, C.L., Wickline, H.E. 1969.** Effects of nitrogen limitation on the growth and composition of unicellular algae in continuous culture. *Appl. Microbiol.*, 18: 245-250.
- Riebesell, U., Revill, A.T., Holdsworth, D.G., Volkman, J.K. 2000.** The effects of varying CO<sub>2</sub> concentration on lipid composition and carbon isotope fractionation in *Emiliania huxleyi*. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 64: 4179-4192.
- Ritossa, F. 1962.** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 18: 571-573.
- Rochaix J.D. 1995.** *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 29: 209-30.
- Rothman, J.E. 1989.** Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells. *Cell*, 59: 591-601
- Round, F.E. 1984.** *The Ecology of Algae*, Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- Ruelland, E., Zachowski, A., 2010.** How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, 69: 225-232.
- Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J., Goloubinoff, P., 2009.** The heat shock response in moss plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane. *The Plant Cell*, 21: 2829-2843.
- Saidi, Y., Finka, A. and Goloubinoff, P. 2011.** Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol.*, 190: 556-565.

- Saidi, Y., Peter, M., Finka, A., Cicekli, C., Vigh, L., Goloubinoff, P. 2010.** Membrane lipid composition affects plant heat sensing and modulates Ca<sup>+2</sup> dependent heat shock response. *Plant Signal. Behav.*, 5: 1530-1533.
- Sangwan, V., Örvar, B.L., Beyerly, J., Hirt, H., Dhindsa, R.S., 2002.** Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*, 31: 629-638.
- Saoudi, Y., Rousseau, B., Doussiere, J. 2004.** Calcium-independent cytoskeleton disassembly induced by BAPTA. *Eur. J. Biochem.* 271: 3255-3264.
- Sarıkaya, E., 1995.** α-amilaz Üreten Bazı Bacillus Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Short, S. N. 2012.** Evaluation of heat shock protein 70A (HSP70A) in *Chlamydomonas reinhardtii*., Master Thesis, University of Kentucky, UK.
- Sinha, P., Singh, V. K., Suryanarayana, V., Krishnamurthy, L., Saxena, R. K...2015.** Evaluation and validation of housekeeping genes as reference for gene expression studies in pigeonpea (*Cajanus cajan*) under drought stress conditions. *PloS one*, 10(4), e0122847.
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H., Tsuzuki, M. 2000.** Environmental effects on acidic lipids of thylakoid membranes. *Biochem. Soc. Trans.*, 28: 912-914.
- Schaller, K., David, R., , Uhl, R. 1997.** How *Chlamydomonas* keeps track of the light once it has reached the right phototactic orientation. *Biophysical journal*, 73: (3), 1562.
- Scharf, K.D., Siddique, M., Vierling, E., 2001.** The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6: 225-237.
- Schlesinger, M. J. 1990.** Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.*, 265(21): 12111-4.
- Schmollinger, S., Strenkert, D., Schroda, M., 2010.** An inducible artificial microRNA system for *Chlamydomonas reinhardtii* confirms a key role for heat shock factor 1 in regulating thermotolerance. *Curr. Genet.*, 56: 383-389.
- Schmollinger, S., Strenkert, D., Offeddu, V., Nordhues, A., Sommer, F., Schroda, M., 2012.** A protocol for the identification of protein-protein interactions based on 15N metabolic labeling, immunoprecipitation, quantitative mass spectrometry and affinity modulation. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 67: e4083.
- Schmollinger, S. 2012.** Dissection of the HSF1-Dependent Stress Response with a Special Focus on the Chloroplast HSP70 System in *Chlamydomonas reinhardtii*., Technische Universität Kaiserslautern, Germany
- Schmollinger, S., Schulz-Raffelt, M., Strenkert, D., Veyel, D., Vallon, O. And Schroda, M. 2013.** Dissecting the heat stress response in *Chlamydomonas* by pharmaceutical and RNAi approaches reveals conserved and novel aspects. *Mol. Plant*, 6: 1795-1813.
- Schroda, M., 2004.** The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth. Res.* 82: 221-240.
- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F.A., Beck, C.F., 1999.** A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell*, 11: 1165-1178.
- Schroda, M., Blocker, D. and Beck, C.F. 2000.** The HSP70A promoter as a tool for the improved expression of transgenes in *Chlamydomonas*. *Plant J.*, 21: 121-131.
- Schroda, M., Hemme, D., Mühlhaus, T., 2015.** The *Chlamydomonas* heat stress response. *The Plant Journal*, 82: 466-480.

- Schulz-Raffelt, M., Lodha, M., and Schroda, M., 2007.** Heat shock factor 1 is a key regulator of the stress response in *Chlamydomonas*. *Plant J.* 52: 286-295.  
*Curr. Genet.*, 53: 381-388.
- Shepherd, H.S., Boynton, J.E., and Gillham, N.W. 1979.** Mutations in nine chloroplast loci of *Chlamydomonas* affecting different photosynthetic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.*, 76: 1353-1357
- Shi, Y., Mosser, D.D., Morimoto, R.I., 1998.** Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes, Development*, 12, 654-666.
- Sichting, M., Mokranjac, D., Azem, A., Neupert, W., Hell, K. 2005.** Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1. *The EMBO Journal* 24: 1046-1056.
- Snell, W.J., Pan, J., Wang, Q. 2004.** Cilia and flagella revealed: from flagellar assembly in *Chlamydomonas* to human obesity disorders. *Cell*, 117: 693-697.
- Stauber, J., Florence, T. 1987.** Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Mar. Biol.*, 94: 511-519.
- Steinbrenner J., Sandmann G. 2006.** Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol*, 72: 7477-748
- Stephenson, A.L., Dennis, J.S., Howe, C.J., Scott, S.A., Smith, A.G. 2010.** Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuels*, 1: 47-58.
- Stockenreiter, M., Haupt, F., Graber, A.K., Seppälä, J., Spilling, K., Tamminen, T., Stibor, H. 2013.** Functional group richness: Implications of biodiversity for light use and lipid yield in microalgae. *J. Phycol.*, 49(5), 838-847.
- Straus, N.A. 2004.** Iron Deprivation: Physiology and Gene Regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Bryant, D.A., Ed., Springer: Berlin, Germany, 1: 731-750.
- Sugio A., Dreos R., Aparicio F., Maule A.J. 2009.** The cytosolic protein response as a subcomponent of the wider heat shock response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21: 642-654.
- Sukatar, A., 2002.** Alg Kültür Yöntemleri. Ege Üni. Fen Fak. Kitapları Serisi 184: 104.
- Sun, W., Montagu, M.V., Verbruggen, N., 2002.** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1577(1): 1-9.
- Sung, D.Y., Kaplan, F., Lee, K.J., Guy, C.L., 2003.** Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends in Plant Science*, 8: 179-187.
- Suri, S.S., Dhindsa, R.S., 2008.** A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. *Plant Cell Environment*, 31: 218-226.
- Takagi, M., Watanabe, K., Yamaberi, K., Yoshida, T. 2000.** Limited feeding of potassium nitrate for intracellular lipid and triglyceride accumulation of *Nannochloris* sp. UTEX LB1999. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 112-117.
- Tanaka, Y., Nishiyama, Y., Murata, N. 2000.** Acclimation of the photosynthetic machinery to high temperature in *Chlamydomonas reinhardtii* requires synthesis de novo of proteins encoded by the nuclear and chloroplast genomes. *Plant Physiology*, 124(1): 441-450.
- Tatsuzawa, H., Takizawa, E., Wada, M., Yamamoto, Y. 1996.** Fatty acid and lipid composition of the acidophilic green alga *Chlamydomonas* sp. 1. *J. Phycol.*, 32: 598-601.
- Terry, N., Abadía, J. 1986.** Function of iron in chloroplasts. *J. Plant Nutr.*, 9, 609-646.
- Thompson, G.A. 1996.** Lipids and membrane function in green algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1302: 17-45.

- Tissieres, A., Mitchell, H.K., and Tracy, U.M. 1974.** Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.*, 85: 389- 398.
- Titman, D. 1976.** Ecological competition between algae: Experimental confirmation of resource-based competition theory. *Science*, 192: 463-465.
- Tjahjono, A.E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., Nagai, S. 1994.** Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnol. Lett.*, 16, 133-138.
- Torzillo, G. 2003.** Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8: 338-348.
- Tran, M.T.T., Farid, M. 2004.** Ultraviolet treatment of orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 5(4): 495-502.
- Trautinger F., Kindas-Mugge I., Knobler R.M., Honigsmann H. 1996.** Stress proteins in the cellular response to ultraviolet radiation. *J Photochem Photobiol B*, 35: 141-149
- Tsuzuki, M., Ohnuma, E., Sato, N., Takaku, T., Kawaguchi, A. 1990.** Effects of CO<sub>2</sub> concentration during growth on fatty acid composition in microalgae. *Plant Physiol.* 93: 851-856.
- sterility. *Plant physiology*, 108(2): 703-712.
- Velichko, A.K., Markova, E.N., Petrova, N.V., Razin, S.V. and Kantidze, O.L. 2013.** Mechanisms of heat shock response in mammals. *Cell. Mol. Life Sci.*, 70: 4229-4241.
- Vergheze, J., Abrams, J., Wang, Y. and Morano, K.A. 2012.** Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76: 115- 158.
- Van Leeuwe, M.A. 1998.** Stefels, J. Effects of iron and light stress on the biochemical composition of Antarctic *Phaeocystis* sp. (*Prymnesiophyceae*). II. Pigment composition. *J. Phycol.*, 34: 496-503.
- Viitanen, P.V., Schmidt, M., Buchner, J., Suzuki, T., Vierling, E., Dickson, R., et al., 1995.** Functional characterization of the higher plant chloroplast chaperonins. *J. Biol. Chem.*, 270: 18158-18164.
- Voellmy, R., Boellmann, F., 2007.** Chaperone Regulation of the Heat Shock Protein Response, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 594: 89-99.
- Voigt, J., Münzner, P. 1994.** Blue light-induced lethality of a cell wall-deficient mutant of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol.*, 35, 99-106.
- Voigt, J., Hinklemann, B., Harris, E.H. 1997.** Production of cell wall polypeptides by different cell wall mutants of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiol Res.* 152: 189-98
- Von Gromoff, E. D., Treier, U., Beck, C. F. 1989.** Three light-inducible heat shock genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and Cellular Biology*, 9(9): 3911-3918.
- Vonshak, A., Torzillo, G., 2004.** Environmental Stress Physiology. *Handbook of Microalgal Culture*, Richmond, A., Ed., Blackwell: Oxford, UK, 57-82.
- Walker, J.B. 1954.** Inorganic micronutrient requirements of *Chlorella*. II. Quantitative requirements for iron, manganese, and zinc. *Arch. Biochem. Biophys.*, 53: 1-8.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A., 2004.** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends In Plant Science*, 9: 244-252.

- Waters, E.R., Lee, G.J., Vierling, E., 1996.** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.*, 296: 325-338.
- Waters, E.R., Rioflorido, I., 2007.** Evolutionary analysis of the small heat shock proteins in five complete algal genomes. *J. Mol. Evol.*, 65: 162-174.
- Westerheide, S.D., Morimoto, R.I., 2005.** Heat Shock Response Modulators as Therapeutic Tools for Diseases of Protein Conformation. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 33097-33100.
- Wilson, N. F., O'Connell, J. S., Lu, M., , Snell, W. J. 1999.** Flagellar adhesion between mt<sup>+</sup> and mt<sup>-</sup> *Chlamydomonas* gametes regulates phosphorylation of the mt<sup>+</sup>-specific homeodomain protein GSP1. *Journal of Biological Chemistry*, 274(48): 34383-34388.
- Wilson, N. F., Foglesong, M. J., , Snell, W. J. 1997.** The *Chlamydomonas* mating type plus fertilization tubule, a prototypic cell fusion organelle: isolation, characterization, and in vitro adhesion to mating type minus gametes. *The Journal Of Cell Biology*,137(7): 1537-1553.
- Wilson, N. F., , Snell, W. J. 1998.** Microvilli and cell-cell fusion during fertilization. *Trends in Cell Biology*, 8(3): 93-96.
- Woessner JP, Goodenough UW. 1994.** Volvocine cell walls and their constituent glycoproteins: an evolutionary perspective. *Protoplasma*, 181: 245-58
- Wu, H.C., Luo, D.L., Vignols, F., Jinn, T.L. 2012.** Heat shock-induced biphasic Ca<sup>(2+)</sup> signature and OsCaM1-1 nuclear localization mediate downstream signalling in acquisition of thermotolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Environment*, 35: 1543-1557.
- Xiong J, Subramaniam S, Govindjee. 1998.** A knowledge-based three dimensional model of the Photosystem II reaction center of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.*, 56(3): 229-254
- Xue, L., Zhang, Y., Zhang, T., An, L., Wang, X. 2005.** Effects of enhanced ultraviolet-B radiation on algae and cyanobacteria. *Crit. Revi. Microbiol.*, 31: 79-89.
- Yamada, K., Fukao, Y., Hayashi, M., Fukazawa, M., Suzuki, I., Nishimura, M., 2007.** Cytosolic HSP90 Regulates the Heat Shock Response That Is Responsible for Heat Acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 37794-37804.
- Yizhar, O., Fenno, Lief E., Davidson, Thomas J., Mogri, M. , Deisseroth, K. 2011.** Optogenetics in Neural Systems. *Neuron* 71: 9-34.
- You, T., Barnett, S.M. 2004.** Effect of light quality on production of extracellular polysaccharides and growth rate of *Porphyridium cruentum*. *Biochem. Eng. J.*, 19, 251-258.
- Zeng, X., Danquah, M.K., Chen, X.D. , Lu, Y. 2011.** Microalgae bioengineering: from CO2 fixation to biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 3252-3260.
- Zhang, J. G., Zhang, F., Thakur, K., Hu, F., , Wei, Z. J. 2017.** Valorization of Spent *Escherichia coli* media using green microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and feedstock production. *Frontiers in Microbiology*,8: 1026.
- Zheng, S.Z., Liu, Y.L., Li, B., Shang, Z.L., Zhou, R.G., Sun, D.Y., 2012.** Phosphoinositide-specific phospholipase C9 is involved in the thermotolerance of *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 69: 689-700.
- Zhila, N.O., Kalacheva, G.S., Volova, T.G. 2011.** Effect of salinity on the biochemical composition of the alga *Botryococcus braunii* Kütz IPPAS H-252. *J. Appl. Phycol.* 23: 47-52.

**Zybilov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q. and van Wijk, K.J. 2008.** Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS One*, 3: e1994.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı** : Tuba Sevgi  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Karaman 13/10/86  
**Yabancı Dil** : İngilizce  
**Eğitim Durumu**  
**Lise** : Konak Anadolu Lisesi, İzmir  
**Lisans** : Ege Üniversitesi, Mühendislik Fak., Biyomühendislik  
**Yüksek Lisans** : Technische Universität Kaiserslautern, Almanya  
**Çalıştığı Kurum** : Bursa Uludağ Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi,  
Biyoloji Bölümü  
**İletişim (e-posta)** : tubaavci@uludag.edu.tr

**Yayınları** :

**Tari, C., Özkan, K., Oncu, S., Avci, T. 2011.** The relationship of pellet morphology to polygalacturonase production of *Rhizopus oryzae* in various media compositions. *GIDA*, 36 (1): 25- 31.

**Murat, D., Demirkan, E., Sevgi, T., Baygın, E. 2015.** Optimization of phytase production by new isolate *Bacillus* sp. EBD 9-1 strain using statistical experimental design. *J. Biol. Environ. Sci.*, 9(26), 93-100.

**Demirkan, E., Sevgi, T., Başkurt, M. 2016.** Optimization of Physical Factors Affecting the Production of the  $\alpha$ -Amylase from a Newly Isolated *Bacillus* sp. M10 Strain. *Karaelmas Fen Müh. Derg.*, 6(2), 1- 8.

**Demirkan, E., Sevgi, T., Akcakoca, D., Ersoy, F. 2017** Partial purification, characterization and wheat bran degradation studies of a new phytase from the *Bacillus megaterium* EBD 9-1 strain. *Turk. J. Biochem.*, 42(3), 329–337.

**İnci, D., Aydın, R., Vatan, Ö., Sevgi, T., Yılmaz, D., Zorlu, Y., Yerli, Y., Bünyemin, C., Demirkan, E., Cinkilic, N. 2017.** Synthesis and crystal structures of novel copper(II) complexes with glycine and substituted phenanthrolines: Reactivity towards DNA/BSA and in vitro cytotoxic and antimicrobial evaluation, *J Biol Inorg Chem*, 22: 61–85.

**Inci, D., Aydın, R., Sevgi, T., Zorlu, Y., Demirkan, E. 2017.** Synthesis, crystal structure, stability studies, DNA/albumins interactions and antimicrobial activities of two novel Cu(II) complexes with amino acids and 5-nitro-1,10-phenanthroline. *Journal of Coordination Chemistry*, 70(3), 512–543.

**Aykut, Y., Sevgi, T., Demirkan, E. 2017.** Cellulose monoacetate/polycaprolactone and cellulose monoacetate/polycaprolactam blended nanofibers for protease immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, 134(44), 45479.

**Demirkan, E., Avci, T., Aykut, Y. 2018.** Protease immobilization on cellulose monoacetate/chitosan-blended nanofibers. *Journal of Industrial Textiles*, 47(8), 2092-2111.

**Ak, A. U., Demirkan, E., Cengiz, M., Sevgi, T., Zeren, B., ve Abdou, M. 2018.** Optimization of culture medium for the production and partial purification and characterization of an antibacterial activity from *Brevibacillus laterosporus* strain EA62. DOI: 10.26327/RBL2018.217.

**Demirkan, E., Sevgi T., Gokoz M., Guler, B. E., Zeren, B., Ozalpar, B., Abdou, M., 2018.** Strain Improvement by UV Mutagenesis for Protease Overproduction from *Bacillus subtilis* E6-5 and Nutritional Optimization. *J. Biol. Environ. Sci.*, 12(35), 69-77.

**Demirkan, E., Sevgi, T., Güler, B.E., Zeren, B., Özalpar, B., Abdou M. 2019**  
Türkiye Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* sp. Suşlarının Biyoremediasyonda  
Kullanılma Potansiyellerinin Araştırılması. *Karaelmas Fen ve Müh. Derg.* 9(1), 107-  
113.

