

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DOĞU AKDENİZ-EGE SÜNGERLERİNDEN (*PORIFERA*) SEÇİLEN
TÜRLERİN İNCELENMESİ, BU CANLILARDAKİ KOLLAJEN TİP II, IV
VE İNTEGRİN β_1 PROTEİNLERİNİN VARLIĞININ İMMÜNO-
HİSTOKİMYASAL VE MOLEKÜLER GENETİK DÜZEYDE
ARAŞTIRILMASI**

Mert Gökcalp

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Hasan Hüseyin ATAR

ANKARA
2006

Investigation of Eastern Mediterranean-Aegean selected sponge (Porifera) species and study of the existence of collagen type II, IV and integrin β_1 proteins in these animals with immunohistochemical and molecular genetic methods - Mert Gokalp

ABSTRACT

Beginning with the realization of extraordinary defense mechanisms and ability for producing bioactive molecules of sponges during the early 1900's and the preliminary work that is done at 1950's, only a small amount of sponge related medicines entered into the pharmacological market. The most important reason for lack sponge related metabolites with anti-HIV, anti-tumor, antibacterial, antiviral and etc. properties in the market, is related with the so called 'supply problem' (lack of sponge biomass). The researchers that were aiming to solve this problem, has investigated, applied and developed many culture methods for sponges. Some of these sponge specific methods have been successful for some individual cases for some species however, till today there is no general culturing method that could be developed for sponges that can cover biomedically important sponge species. During the last years, the sponge related research is accelerated with the technological advances in the field of molecular genetics. With the help of these important molecular genetical advances, the research on sponge culture has been carried to a new perspective, to the basic structures of these animals, in order to achieve successful culturing stories. The sponge protein work has began during the 1970's within the concept of molecular genetics, and can be defined as one work that is done for comprehending a better knowledge of the basic structures of these animals.

Inside the scope of this work immunohistochemical methods are applied to the sponge species that are chosen from our seas and as a result; type I collagen is detected in *Chondrosia reniformis* and *Aplysina aerophoba* species, type II collagen is detected in *A. aerophoba* and *Axinella polypoides* species, type IV collagen is detected again in *A. aerophoba* and integrin β_1 is detected in *A. aerophoba* and *A. polypoides* species. Molecular genetical work is done in accordance with these results and appraisable sequence data can only achieved with the DNA products recovered with *A. aerophoba* integrin β_1 primers.

Additionally as a progress, mariculture trials are started on selected biologically active sponge species of Turkish sea coast. In this context, it's being aimed to benefit from the sponge species, *Dysidea avara* and *C. reniformis*, as biological material in medical formulations.

2006 , 90 page

Key Words : *Marine biotechnology, sponge, collagen, integrin*

Doğu Akdeniz-Ege süngerlerinden (Porifera) seçilen türlerin incelenmesi, bu canlılardaki Kollajen Tip II, IV ve Integrin β_1 proteinlerin varlığının immünohistokimyasal ve moleküler genetik düzeyde araştırılması - Mert Gokalp

ÖZET

Süngerlerin etkin savunma mekanizmaları ve biyoaktif molekül üretme yeteneklerinin anlaşılmaya başlandığı geçen yüzyılın başlarından itibaren, sünger biyoaktif bileşikleri üzerine 1950'li yıllardan başlayarak günümüze kadar gelen çalışmaların neticesinde az miktarda sünger kaynaklı ilaç farmakolojik markette kendine yer bulmuştur. Anti-HIV, anti-tümör, anti-bakteriyel, antiviral vs. gibi etkileyici özellikleri bulunan bu metabolitlerden daha fazla yararlanamamızın en büyük nedeni ekonomiktir ve bu uygun miktarlarda sünger biokütlesine ulaşılmasına engel olmuştur. Bu problemi çözme hedefiyle yola çıkan araştırmacılar çeşitli kültür yöntemlerini gözden geçirmiş, denemiş ve süngerlere uyarlayarak geliştirmişlerdir. Bunlardan bazıları spesifik türlerde veya durumlarda başarılı sonuçlar verirken sünger kültüründe genel bir yöntem günümüze kadar oturtulamamıştır. Elli yıldır hiç azalmadan devam eden deniz süngeri çalışmaları son yıllarda moleküler genetik alanındaki yeniliklerle daha da bir ivme kazanmıştır. Bu yeniliklerden yola çıkarak sünger biokütlesi problemine çözüm bulabileceklerini ümit eden araştırmacılar kültür yöntemlerindeki başarı oranlarını artırmaya yönelik önemli sonuçlara ulaşılacağını düşündükleri için bu canlıların temel yapılarıyla ilgili çalışmalara yönelmişlerdir. Sünger proteinlerine ait araştırmalar da bu canlıları daha iyi anlamaya yönelik çabalardan olup süngerlerde protein izlerine ilk olarak 1970'lerde rastlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında karasularımızda bulunan sünger türleri arasından seçilen örneklerle uygulanan immunohistokimyasal yöntemler neticesinde tip I kollajene, *Chondrosia. reniformis* ve *Aplysina aerophoba* türlerinde, kollajen tip II'ye *A. aerophoba* türünde, tip IV kollajene yine *A. aerophoba* türünde, integrin β_1 'e ise *A. aerophoba* ve *Axinella. polypoides* türlerinde rastlandı. Elde edilen bu sonuçlar paralelinde gerçekleştirilen moleküler genetik çalışmalarındaki dizin analizlerinde ise, değerlendirilebilir düzeyde dizin verisi sadece *A. aerophoba*'dan integrin β_1 primerleri ile elde edilen DNA ürününden sağlandı.

Ayrıca çalışmanın devamında, ülkemiz karasularındaki biyoaktif molekül ürettiği tespit edilen sünger türlerine yönelik denizel yetiştiricilik ön denemeleri başlatıldı. Bu bağlamda çalışma kapsamında kullanılan sünger türlerinden (*Dysidea avara* ve *C. reniformis*) bir takım medikal formüllerde biyolojik materyal olarak faydalanılması amaçlanmaktadır.

2006 , 90 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER : Deniz biyoteknolojisi, sünger, kollajen, integrin

Investigation of Eastern Mediterranean-Aegean selected sponge (Porifera) species and study of the existence of collagen type II, IV and integrin β_1 proteins in these animals with immunohistochemical and molecular genetic methods - Mert Gokalp

ABSTRACT

Beginning with the realization of extraordinary defense mechanisms and ability for producing bioactive molecules of sponges during the early 1900's and the preliminary work that is done at 1950's, only a small amount of sponge related medicines entered into the pharmacological market. The most important reason for lack sponge related metabolites with anti-HIV, anti-tumor, antibacterial, antiviral and etc. properties in the market, is related with the so called 'supply problem' (lack of sponge biomass). The researchers that were aiming to solve this problem, has investigated, applied and developed many culture methods for sponges. Some of these sponge specific methods have been successful for some individual cases for some species however, till today there is no general culturing method that could be developed for sponges that can cover biomedically important sponge species. During the last years, the sponge related research is accelerated with the technological advances in the field of molecular genetics. With the help of these important molecular genetical advances, the research on sponge culture has been carried to a new perspective, to the basic structures of these animals, in order to achieve successful culturing stories. The sponge protein work has began during the 1970's within the concept of molecular genetics, and can be defined as one work that is done for comprehending a better knowledge of the basic structures of these animals.

Inside the scope of this work immunohistochemical methods are applied to the sponge species that are chosen from our seas and as a result; type I collagen is detected in *Chondrosia reniformis* and *Aplysina aerophoba* species, type II collagen is detected in *A. aerophoba* and *Axinella polypoides* species, type IV collagen is detected again in *A. aerophoba* and integrin β_1 is detected in *A. aerophoba* and *A. polypoides* species. Molecular genetical work is done in accordance with these results and appraisable sequence data can only achieved with the DNA products recovered with *A. aerophoba* integrin β_1 primers.

Additionally as a progress, mariculture trials are started on selected biologically active sponge species of Turkish sea coast. In this context, it's being aimed to benefit from the sponge species, *Dysidea avara* and *C. reniformis*, as biological material in medical formulations.

2006 , 90 page

Key Words : *Marine biotechnology, sponge, collagen, integrin*

TEŞEKKÜR

Doğu Akdeniz-Ege süngerlerinden (*Porifera*) seçilen türlerin Kollajen Tip II, IV ve Integrin β_1 proteinlerin varlığının immunohistokimyasal ve moleküler genetik düzeyde incelenmesine yönelik olarak gerçekleştirilen bu çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalı ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim dalı laboratuvarlarının olanakları sayesinde yapılabilmektedir.

Bana araştırma olanağı sağlayan ve çalışmamın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Hasan ATAR'a (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi) bu tezin her aşamasında eşsiz tavsiyeleriyle yardımlarını gördüğüm ve konfokal mikroskopi çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağlayan Sayın Prof. Dr. Alp CAN'a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi), çalışmamın bu aşamaya gelmesinde büyük emekleri olan ve moleküler genetik çalışmalarının gerçekleştirilmesini sağlayan ve immunohistokimyasal çalışmalarda kullanılan monoklonal antikorları temin eden Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi), ayrıca; Dr. Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU - (A.Ü. Tıp Fakültesi), Ruhan PAKKAN - (A. Ü. Veteriner Fakültesi), Ender DİNÇER - (A. Ü. Biyoteknoloji Enstitüsü), Fahriye KUTSAL - (A. Ü. Veteriner Fakültesi), Elvin GÜNGÖR - (A. Ü. Veteriner Fakültesi), Kenan ERGÜÇ - (Aquanout Dalış Merkezi/Bodrum) sonsuz teşekkürlerimi iletmeyi bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Deniz Canlılarının Biyomedikal Potansiyelleri.....	2
1.2 Süngerler (<i>Porifera</i>).....	3
1.2.1 Süngerlerin Sınıflandırılması.....	3
1.2.2 Morfolojik Özellikleri.....	3
1.2.3. Anatomik Özellikleri.....	5
1.2.4 Sünger iskeleti ve sünger kanal sistemleri.....	7
1.2.5 Süngerlerde üreme.....	8
1.2.5.1 Eşsyz üreme.....	8
1.2.5.2 Eşeyli üreme.....	8
1.2.6 Süngerlerde beslenme, davranış ve diğer canlılarla ilişkileri.....	9
1.3 Çalışmanın Amacı.....	10
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	11
2.1 Süngerlerin Savunma Mekanizmaları.....	11
2.2 Süngerlerinin Biyoteknolojik Potansiyelleri.....	11
2.3 Süngerlerinin Biyomedikal Potansiyelleri.....	12
2.3.1 Anti-enflamatuar aktivite.....	14
2.3.2 Anti-viral ve anti tümör aktivite.....	16
2.3.3 Anti-protozoal aktivite.....	17
2.3.4 Anti sıtma aktivite.....	17
2.3.5 Anti-mantar, antibiyotik aktivite.....	18
2.3.6 Anti-tüberküloz Aktivite.....	18
2.4 Sünger Mikroorganizma Ortakçıl Yaşam.....	19
2.5. Sünger Kültürü.....	21
2.5.1 Deniz Yetiştiriciliği (Mariculture).....	22
2.5.2 Biyoreaktör/Akvaryumda Kültür.....	25
2.5.3 Hücre ve Primmorph Kültür.....	27
2.5.3.1 Hücre Kültürü.....	28
2.5.3.2 Primmorp Kültür.....	30
2.6 Sünger Biokütlesi İçin Alternatif Yöntemler.....	32
2.6.1 Kimyasal Sentez.....	32
2.6.2 Genetik modifikasyon.....	32
2.7 Süngerlerde protein çalışmaları.....	32
2.7.1 Galectin proteini.....	33
2.7.2 Kollajen proteini.....	34
2.7.3 Fibronectin proteini.....	35
2.7.4 Integrin proteini.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1 Materyal.....	37

3.1.1 Kullanılan Sünger Materyali.....	37
3.1.1.1 <i>Aplysina aerophoba</i> (Schmidt 1862).....	37
3.1.1.2 <i>Chondrosia reniformis</i> (Nardo 1833).....	38
3.1.1.3 <i>Dysidea avara</i> (Schmidt, 1862).....	38
3.1.1.4 <i>Axinella polypoides</i> (Schmidt, 1868).....	39
3.2 Yöntem.....	40
3.2.1 Saha Çalışmaları.....	40
3.2.2 Süngerlerin Örneklenmesi ve Taşınması.....	42
3.2.2.1 Sualtı Örnekleme.....	42
3.2.2.2 Örneklerden Yüzeyde Kesit alınması ve Laboratuara Taşınması.....	43
3.2.3 Histolojik Yöntem.....	44
3.2.3.1 Kriyokesit Yöntemi.....	45
3.2.3.2 Boyama.....	45
3.2.3.2.1 Hemotoksilin-Eozin.....	45
3.2.3.2.2 Mallory Azan Boyası.....	46
3.2.3.2.3 İmmünfluoresan Boyama.....	46
3.2.3.3. Mikroskopik Gözlem.....	47
3.2.4 Moleküler Genetik Çalışmaları.....	47
3.2.4.1 RNA Ekstraksiyonu.....	47
3.2.4.2 cDNA Sentezi.....	48
3.2.4.3 PCR Amplifikasyonu.....	49
3.2.4.4 Jel Elektorofioez.....	51
3.2.4.5 PCR Clean Up.....	51
3.2.4.6 Nükleotid Dizin Analizi.....	52
3.2.4.7 Filogenetik Analiz.....	53
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	54
4.1 Süngerlerin Tanınma Aşamaları.....	54
4.2 Mikroskopik İnceleme Sonuçları.....	55
4.2.1 Işık Mikroskobu.....	55
4.2.2 Konfokal Mikroskopu Gözlemleri.....	58
4.2.2.1 <i>A. aerophoba</i>	58
4.2.2.2 <i>C. reniformis</i>	58
4.2.2.3 <i>A. polypoides</i>	59
4.2.2.4 <i>D. avara</i>	60
4.2.2.5 Tip I Anti-kollajen.....	61
4.2.2.6 Tip II Anti-kollajen.....	63
4.2.2.7 Tip IV Anti-kollajen.....	64
4.2.2.8 Anti-Integrin β_1	65
4.3 Moleküler Genetik çalışmaları.....	65
4.3.1 RNA ekstraksiyonu.....	66
4.3.2 RT-PCR.....	66
4.3.3 DNA Dizin Analizi.....	66
4.3.4 Filogenetik Analiz.....	69
5. SONUÇ.....	71
KAYNAKLAR.....	73
EK 1.....	80
ÖZGEÇMİŞ.....	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Sünger sınıfları.....	4
Şekil 1.2	Genel sünger morfolojisi.....	6
Şekil 1.3	Çeşitli sünger spikülleri ve spongin lifleri.....	7
Şekil 2.1	Süngerlerin Savunma Stratejiler.....	12
Şekil 2.2	Deniz omurgasızı kaynaklı doğal ürün yelpazesi.....	15
Şekil 2.3	Deniz canlılarının araştırma oranları.....	15
Şekil 2.4	Süngerler ve mikroorganizmalar arasında var olan simbiyotik ilişkinin şematik diyagramı	20
Şekil 2.5	Limski Kanalı'ndaki farmakolojik özelliklere sahip Akdeniz süngerlerini yetiştirme amaçlı mariculture çalışmaları.....	24
Şekil 2.6	İki adet airlift biyoreaktör içeren <i>In vitro</i> sünger kültürü tasarımı	26
Şekil 2.7	Tüm büyüme koşullarının kontrollü olduğu kapalı kültür sistemi ve <i>S. domuncula</i> sünger türünde büyüme gelişiminin 3D computer tomography yöntemiyle izlenmesi.....	27
Şekil 2.8	<i>S. massa</i> sünger hücrelerinde primmorph oluşumu.....	31
Şekil 2.9	<i>G. cynodium</i> süngerindeki AF dolaylı hücre tanınması.....	33
Şekil 2.10	<i>G. cynodium</i> süngerinden izole edilen kollajen demetlerinin elektron mikroskop görüntüleri.....	34
Şekil 3.1	<i>A. aerophoba</i> türü sualtı görüntüleri.....	37
Şekil 3.2	<i>C. reniformis</i> türü sualtı görüntüleri.....	38
Şekil 3.3	<i>D. avara</i> türü sualtı görüntüleri.....	39
Şekil 3.4	<i>A. polypoides</i> türü sualtı görüntüleri.....	40
Şekil 3.5	Saha çalışmalarında dalışların gerçekleştirildiği Turgutreis civarındaki adalar ve Kargı Adası.....	41
Şekil 3.6	Süngerlerin tiplerine ait bazı örnekler.....	44
Şekil 4.1	Işık mikroskobu görüntüleri <i>A. aerophoba</i>	55
Şekil 4.2	Işık mikroskobu görüntüleri <i>C. reniformis</i>	56
Şekil 4.3	Işık mikroskobu görüntüleri, silika spiküllü süngerler.....	57
Şekil 4.4	Konfokal mikroskobu görüntüleri, <i>C. reniformis</i> dokusu <i>ectosome</i> bölgesindeki Tip I kollajen lifleri.....	58
Şekil 4.5	Konfokal mikroskop görüntüleri, <i>A. aerophoba</i> dokusu Tip I kollajen lifleri.....	62
Şekil 4.6	Konfokal mikroskop görüntüleri, <i>A. aerophoba</i> dokusu Tip II kollajen lifleri.....	63
Şekil 4.7	Konfokal mikroskop görüntüleri, <i>A. polypoides</i> dokularındaki Tip II kollajen lifleri.....	63
Şekil 4.8	Konfokal mikroskop görüntüleri. <i>A. aerophoba</i> , <i>A. polypoides</i> ve <i>D. avara</i> türlerindeki Tip IV kollajen lifleri.....	64
Şekil 4.9	Konfokal mikroskop görüntüleri. <i>A. aerophoba</i> ve <i>A. polypoides</i> dokularındaki integrin β_1 görüntüleri.....	65
Şekil 4.10	Jel görüntüleri, kollajen tip I, tip II, İntegrin β_1	67
Şekil 4.11	<i>A. aerophoba</i> 'ya ait integrin β_1 kodlayan gen bölgesi kısmi dizininin <i>S. domuncula</i> ve <i>G. cydonium</i> 'a ait ilgili gen bölgeleriyle çoklu karşılaştırması.....	68
Şekil 4.12	Sünger türlerine ait İntegrin B1 kodlayan kısmi gen dizilerinin Filogenetik analizi.....	70

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1	Klinik deneme aşamasında olan bazı doğal deniz ürünleri.....	13
Çizelge 2.2	İlaç piyasasında ya da klinik deneme aşamalarında olan sünger kaynaklı biyoaktif ürünler.....	14
Çizelge 2.3	İntegrin β alt ünitesi aa sekanslarının karşılaştırılması.....	36
Çizelge 3.1	Saha Çalışmaları.....	42
Çizelge 3.2	Dünya Gen bankasından elde edilen <i>Suberites domuncula</i> Kollajen 1, Kollajen 2 ve İntegrin beta alt ünitesi nükleotid dizinleri kullanılarak tasarlanan primer çiftleri ve bazı özellikleri.....	50
Çizelge 4.1	Konfokal mikroskobu gözlem sonuçları.....	60
Çizelge 4.2	Nükleotid dizinleri bazında elde edilen Sequence Identity Matrix (SIM) değerleri.....	67

SİMGELER DİZİNİ

EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
TAE	Tris Asetikasit EDTA
PBS	Phosphate Buffer Saline
SSC	Sodium Chloride, Sodium Citrate
Cy3 GAM	Goat Antimouse Antikor
IEF	Isoelectro focusing
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	Deoxyribonucleotide
AF	Intracellular aggregation factor
AR	Cell surface-associated aggregation receptor
ECM	Extracellular matrix
DTSC	Dye terminator cycle sequencing

1. GİRİŞ

Çok hücreli canlıların en basit gurubunu oluşturan süngerler, antik çağlardan beri insanlar tarafından kullanılmaktadır. Homeros ve Aristo'nun eserlerinde, süngerlerden söz edilmektedir. Süngerlerin ticari amaçlı ilk kullanılışı ise M.Ö. 283–247 yıllarında İskender zamanında görülmektedir. Özellikle spiküllerden yoksun yumuşak fibril iskelete sahip ticari süngerler, iç içe geçmiş binlerce kanal ve odacıklardan oluşan delikli yapısı, üstün su tutma özellikleri, aşınmaya karşı dayanıklılıkları, yumuşaklığı, esnekliği, inceliği gibi özellikleriyle oldukça aranan değerli bir tüketim maddesini oluştururlar. Süngerler günümüzde temizlik ve boya işlerinden, endüstrinin birçok koluna, hatta ilaç sanayisine kadar çok değişik işlerde kullanılmaktadır. Süngerler denilince aklımıza gelen ticari süngerler, bu çok amaçlı kullanım alanları nedeniyle dünya denizlerinden aşırı şekilde avlanmışlardır. Bu aşırı avcılığa sünger hastalıklarının doğal sünger yatakları üzerindeki tahribatı da eklenince ticari sünger üretim miktarı 80'lere kadar ülkemizde ve diğer Akdeniz ülkelerinde hızla düşmüştür (Pronzato et al. 1998). Sünger kültürü konusunda yapılan ilk çalışmalara 19 yy. sonu ve 20. yy. başında rastlanmaktadır. Bu ilk çalışmalar genellikle ticari önemi olan *Spongiidae* familyasının *in situ* kültürlenmesi üzerineydi. 1950lerin başında ise süngerde bulunan biyolojik olarak aktif bileşiklerin izolasyonu ile ilgili ilk çalışma yürütülmüştür. Son yıllarda süngerlerin geniş bir doğal ürün yelpazesine (Hücre yok ediciler, antibiyotikler, anti-enflamatuar, anti-viral bileşikler) sahip olduğu anlaşılmış, araştırma aktiviteleri devamlı olarak artmıştır. Deniz süngerleri farklı disiplinlerden araştırmacıların yoğun ilgisini çekmiştir. Sünger fosillerinin bırakmış olduğu dikkate değer izler palaentolojistler ve evrim biyologları tarafından incelenmiştir. Süngerler çeşitli yeni kimyasal moleküller ürettikçe, kimyagerler onları bir hazine gibi görmüş ve çeşitli biyoteknolojik uygulamalarda kullanılır olmuşlardır. Mikrobiyologlar süngerlerin biyoaktif potansiyeli olan yüksek oranlarda mikroorganizma barındırması dolayısıyla, bu ilginç canlılarla adeta büyülenmiştir. Hücre biyologları bu basit canlıların hücresel ve iskelet yapılarını inceleyerek temel organizasyonlarını algılamaya çalışmaktadır. Son yıllarda moleküler biyologlar ise, sünger genomu üzerinde çalışmakta ve metazoa genleri ve hastalıklarının moleküler mekanizmasını anlamaya yarayacak verilere ulaşmaya çalışmaktadır (Thakur et al. 2004).

1.1 Deniz Canlılarının Biyomedikal Potansiyelleri

Okyanuslar, algler, süngerler, tunikatlar, byroozoonlar, kabuklular, deniz bakterileri ve cyanobakteriler gibi canlılar vasıtasıyla zengin çeşitlilikte doğal ürünler sağlayan eşsiz kaynaklardır. Hastalık yapıcı virüsler evrimleşip, günümüz ilaçlarına karşı direnç kazandıkça, deniz ekosistemi mantar, parazitik, bakteriyel ve viral hastalıklara karşı yeni öncü materyaller sağlamaktadır. Birçok doğal deniz ürünü başarılı bir biçimde klinik testlerin son evrelerine ilerlemişlerdir ve her geçen gün sayıları büyümekte olan yenileri öncü klinik araştırmalara alınmak için seçilmişlerdir. Doğal deniz ürünlerinin üzerinde gerçekleştirilen çalışmaların çoğunluğu, kanser kemoterapisi, ilaç direnci, yükselen bulaşıcı hastalıklar ve biyoterörizm gibi konularla başa çıkabilmek için olsa da, büyük çoğunluğu bulaşıcı organizmaların tedavisi için kullanılmak üzere doğal okyanus ürünlerinin keşfine duyulan ilgiye katkıda bulunmuştur (Donia ve Hamann 2003). Kara ekosistemlerindeki canlı çeşitliliği inanılmaz boyutlarda olmasına rağmen, en büyük çeşitlilik 36 filumun 34'ünü içermekte olan dünya okyanus ve denizlerindedir. Okyanuslar dünya yüzeyinin 70% ini kaplamakta olup, tanımlanan 300 000'in üzerinde tür bitki ve hayvan barındırmaktadır (Pomponi 1999). Makroskopik bitkiler ve hayvanlar, kutuplar, ılıman, tropik bölgeleri de dahil olmak üzere okyanusların her noktasına adapte olmuşlardır. Metre kareye bazı bölgelerde bin türün düştüğü mercan resiflerinde çeşitlilik çok yüksektir. Indo-Pasifik Okyanusu ise dünyanın en büyük tropik deniz biyolojik çeşitliliğini barındırır. Denizel ortam bulaşıcı hastalıkların tedavisine yönelik keşfedilmeyi bekleyen çok çeşitli yararlı ürünlerden oluşan bir hazine gibidir. Yaşama alanı için savaş, yüzeyin kirlenmesi, avcılar gibi ekolojik baskılar ve başarılı bir şekilde üreyebilme isteği, birçok farklı biyoaktiviteye sahip az rastlanır ikincil metabolitlerin evrimleşmelerine yol açmıştır (Ireland et al. 2000). İkincil metabolitlerin bulaşıcı hastalıklara ve parazitik organizmaların kontrolüne karşı üstlendikleri önemli rol uzun seneler gözden kaçırılmıştır. Son otuz, kırk yıl içerisinde ise deniz bitkileri ve deniz hayvanlarının ürettiği doğal deniz ürünleri belirleyebilmek için dünya çapında bir çaba sergilenmiştir. Az bir miktarda deniz bitki, hayvan ve mikroorganizmadan 12 000 den fazla özgün kimyasal bileşik elde edilmiştir ve her sene yüzlerce yeni bileşik halen keşfedilmektedir. Bu keşif çalışmaları eczacılık endüstrisi tarafından başarılı bir şekilde geliştirilen bir miktar biyoaktif metabolitle sonuçlanmıştır (Konig et al. 1994, Faulkner 2001).

1.2 Süngerler (*Porifera*)

Süngerler canlılar aleminin yaşayan fosilleri olmaları nedeniyle çok önemli olup, en yaşlı metazoa grubunu oluştururlar. Süngerler günümüzden 600 milyon yıl öncede dünyamızda mevcuttu ve fazla gelişmeden günümüze kadar gelmişlerdir. Günümüzde 8.000 adet sünger türü tanımlanmıştır ancak gerçek sayılarının bunun iki katı kadar olduğu tahmin edilmektedir (Hooper ve Van Soest 2002).

1.2.1 Süngerlerin Sınıflandırılması

Süngerlerin belli bir organlarının bulunmaması ve hareket yeteneklerinin olmayışı nedeniyle, uzun süre bitkisel organizmalara olarak kabul edilmişlerdir. Ancak Aristo bunların hayvanlar aleminden olabileceğini belirtmiş ve J. Ellis (1765) süngerin su akımı meydana getirdiğini ve bu esnada vücut yüzeyinde kasılmaların oluştuğunu gözleyerek bu canlıların hayvanlar sınıfında ele alınması gerektiğini belirtmiştir. Süngerler değişik araştırmacılar tarafından uzun süre Coelenterata (denizanası, mercan gibi ilkel hayvanlar) grubunda gösterilmiş ise de Blainville tarafından (1816) Spongiaria grubu olarak ayrıca sınıflandırılmışlardır. Süngerlerin günümüzde geçerli olan adı PORIFERA ise; Latince delik anlamına gelen 'PORUS' kelimesi ile taşımak anlamına gelen 'FERRE' kelimelerinin birleştirilmesiyle 'PORIFERA' (Delikliler) olarak Grant tarafından (1836) kullanılmıştır (Katağan et al. 1991). *Porifera* filumu üç ayrı sınıfa ayrılmaktadır Calcarea, Hexactinellida ve Demospongia (Şekil 1.1)

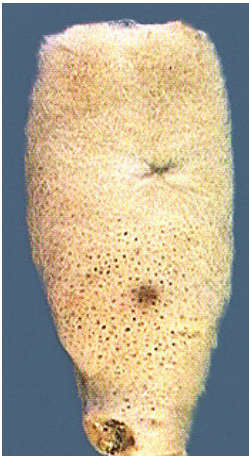
1.2.2 Morfolojik Özellikleri

Tatlı sularda yaşayan türleri de bulunmakla birlikte süngerlerin önemli bölümü denizlerde yaşar. Bilinen 8000 türden yalnızca 150 tanesi tatlı sularda yaşamaktadırlar. Süngerler bilinen her türlü deniz ekosisteminde, kutup bölgelerinden, ılıman ve tropik denizlere kadar var olabilmeyi başarmışlardır. Denizlerde yaşayan süngerler kendilerini kaya, mercan resifi ve çeşitli kabuklular üzerine sabitleyerek yaşamaktadır, kumul ve çakıl alanlarda da bazı türlerine rastlanmaktadır. Bazı kendilerini sabitlemeyi tercih etmeyen örnekler bulunmakla birlikte, bu durum oldukça nadirdir. Süngerlerin dış görünüşleri oldukça değişkendir; hatta aynı türler içerisinde bile morfolojik farklılıklar görülebilir (Hooper ve Nav Soest 2002). Bununla birlikte kupa, kadeh ve vazo şeklinde



Calcarea Sınıfı

Calcarea : Bu sınıf yalnızca kalsiyum karbonatlı spiküllere sahip süngerleri içerir. Spiküller düz veya 3–4 adet ışına sahiptir ve oyuk axial kanallar bulunmaz. Boyları nispeten küçük olan kozmopolit türleri içerir . Günümüzde en çok tropik ortamlarda çeşitlilik gösterirler ve çoğunlukla sığ sularda (littoral bölgede) bulunurlar.



Hexactinellida Sınıfı

Hexactinellida : (Cam Süngerleri): Bu türe özgün olan birbiriyle dik açılarda buluşan, 6 ışınlı silikalı spiküllerden oluşurlar. Oldukça büyük spikülleri vardır, spiküllerin bazıları birkaç cm'ye ulaşabilir. Bu sınıf derin sularda yaşarlar ve *Porifera* içerisinde ilkel bir dal olarak görülmektedir



Demospongia Sınıfı

Demospongia: Bilinen sünger türlerinin 90%'ından daha fazlası bu sınıfa aittir. Demosponge iskeleti spongin fibrillerinden ve/veya silikalı spiküllerden oluşmaktadır. Spikülleri birden dörde kadar ışına sahip ve dik açılarda değillerdir. Bütün üyeleri lökon sünger tipindedir ve denizlerin ilk 100m'ye kadar olan bölümlerinde dipte yoğun olarak bulunurlar. Ticari süngerler ve çoğu biyoteknolojik öneme sahip sünger türleri bu sınıfa aittir.

Şekil 1.1 Sünger sınıfları; *Calcarea*, *Hexactinellida* ve *Demospongia*

düzenli olabildikleri gibi, şekilsiz veya ağaç dalları gibi ya da kayalık vs. yüzeyleri örten kabuk biçiminde olanları da vardır. Boyları çok değişken olup birkaç mm. ile 2 m. arasında değişebilir. Renkleri ise mavi, yeşil, sarı, kırmızı, kahverengi, kirli beyaz, gri, siyah vs... olabilir (Katağan et al. 1991).

1.2.3. Anatomik Özellikleri

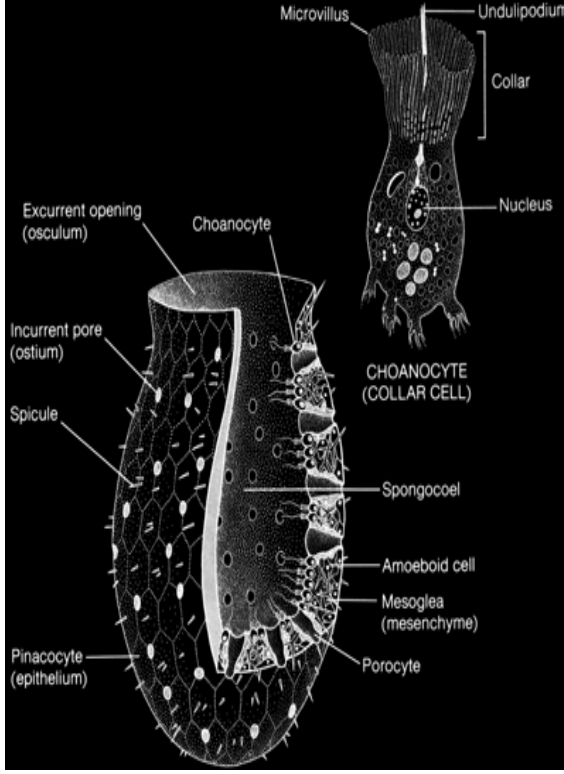
Basit bir sünger su küpünü andırır. Bu su küpünün ağız kısmına karşılık gelen ve oskulum adı verilen bir açıklık vardır (Şekil 1.2.). Oskulum, bir küpün içi gibi bir boşluğa açılır. Bu boşluğa gastral boşluk adı verilir ve oskulum vasıtasıyla dışarı açılır. İç boşluğa "Atrium" veya "Spongocoel" de denmektedir. Süngerlerin vücut çeperlerinde çok sayıda gözenek bulunur, bu gözeneklere por adı verilir. Bu gözenekler oldukça düzensiz bir şekilde dağılmışlardır. Dışarıdan sünger gövde duvarında bulunan bir dizi içe-akımlı gözenek ve dermal ostia vasıtasıyla içeriye alınan su, gastral boşluğa ulaşır ve süngerden dışarı tepedeki geniş osculumlar vasıtasıyla akar. Porlar ve gastral boşluk arasında kanallar yer alır. Porlardan giren ve oskulumdan çıkan daimi su akımı, gastral boşluğu çevreleyen koanosit denilen yakalı kamçı hücrelerin kamçılarının hareketi ile sağlanır. Sünger vücudunun kalın olan çeperi 3 farklı tabakadan oluşmuştur;

- Dermal tabaka
- Gastral tabaka
- Ara tabakadır

Dermal tabaka pinakosit adı verilen, birbirleri ile temas halinde bulunan yassılaştırmış ve etrafları ince bir tabaka ile çevrili hücrelerden oluşmuş bir epitel tabakadır. Bu tabakanın hücreleri arasında porlar bulunur. Gastral tabaka, gastral boşluğu tamamen çevreleyen bir tabaka olup, yakalı kamçı hücrelerinden oluşmuştur. Yaka çok sayıda mikrovillusün bir araya gelmesinden oluşur. Kamçı bu yakanın içinden çıkar. Oskulumdan atılan suyun miktarı koanosit hücrelerinin sayısına bağlıdır. Su ile gelen besin partikülleri ve özellikle partiküller yakada bulunan bir sitoplazma bölgesiyle yutulur. Koanosit hücrelerinde sindirim vakuelleri ile bir boşaltım vakuölü bulunur. Ara tabaka veya mesoglea, skleroblast, prosit, amibosit, kas ve sinir hücreleri gibi birçok farklı hücre tipinden oluşur.

Porositler: Bunlar pinokositlerden türemiş yuvarlak hücrelerdir

Amibositler: Koanositlerden türemiş farklı hücrelerdir. Bazıları gastral tabakadan ayrılarak



1. **Pinacoderm**–Yassı hücrelerden (**Pinokosit**) oluşan adı verilen dış tabaka
 2. Flagellalı hücrelerden (**koanosit**) oluşan iç kaplama – suyu porlardan içeriye ve osculumdan dışarı doğru hareket ettirirler; ayriyetten ortamda asılı durumda olan besin partiküllerini hapsederler. Su akışı gaz alışverişi, atıkların boşaltımı ve gametlerin salınması amaçları içinde kullanılmaktadır.
 3. Pinacoderm ve koanositler arasında jelatin benzeri tabaka bulunmaktadır (**mesohyl**); çeşitli farklı tipte başıboş dolaşan **amoeboid** hücrelerde sahiptir. **Arkeosit**, amoeboid hücreler olup besin partiküllerini fagositoz ederler; spikül ve gametler gibi başka hücreleri oluşturmak üzere başkalaşım geçirebilirler.
- <http://www.ldeo.columbia.edu/edu/dees/ees/life/slides/phyla/porifera.html>

Şekil 1.2 Genel Sünger Morfolojisi.

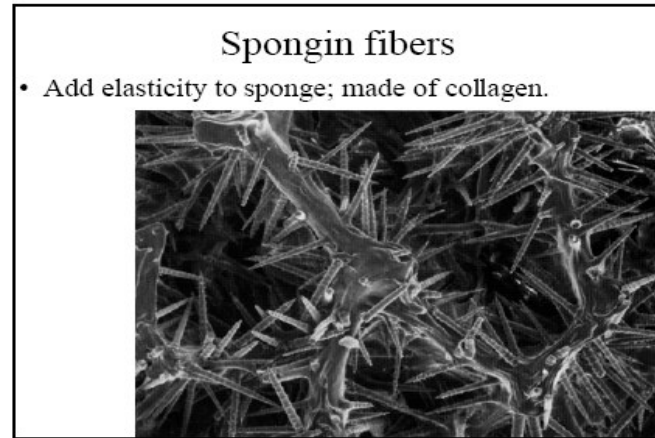
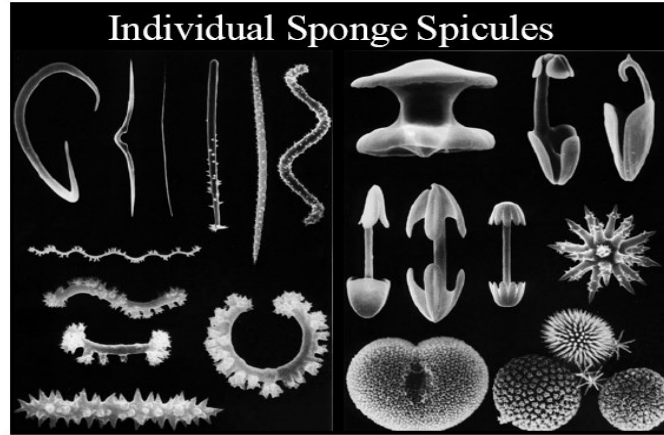
farklılaşmış ve sindirimden sorumlu olan koanosit hücrelerdir. Diğer bir bölümü ise kollemitler olup, jelatinimsi bir ara madde salgırlar. Kollemitlerin bazıları embriyoner özellikteki genç hücrelerdir ve diğer tüm hücreler bunlardan oluşurlar. Örneğin arkeositler üremeden sorumlu hücrelerdir.

Skleroblastlar: Pinokositlerden oluşan spikül salgılayıcı hücrelerdir. Dış tabakadan gelen üç pinokosit hücresi ortalarından bir boşluk bırakacak şekilde bir araya gelirler ve merkez kalker salgırlar; böylece spikül oluşur ve daha sonra her bir hücre biri kaidede biri de uçta olmak üzere ikiye bölünür. Kaidedeki hücreler spikül kollarının kalınlaşmasını, uçtakiler ise uzamasını sağlarlar.

Kas Hücreleri (Miyositler) ve Sinir Hücreleri: Bu hücreler bazı süngerlerde ortaya konulmuştur bununla birlikte bu sinir hücreleri sürekli bir birliktelik oluşturmazlar (Vacelet 1975, Berquist 1978).

1.2.4 Sünger iskeleti ve sünger kanal sistemleri

Sünger iskeleti **mesohly** içerisinde yer alan ufak iğne şeklindeki silika ya da kalsiyum karbonattan meydana gelen, **spiküllerden** oluşur. Bu yapılar içyapı iskelesi malzemesi olarak davranırlar ancak koruma amaçlı olarak da fonksiyon görürler. Bazı süngerlerde iskelet kollajen materyalden ibaret **spongin liflerinden** oluşmaktadır ve bu yapılar birçok ticari süngerde görülmektedir. Spiküller skleroblast hücreler tarafından oluşturulurlar (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Çeşitli sünger spikülleri, üst şekil. Kollajenden oluşan spongin fibrilleri, süngere elastikiyet kazandırılır, alt şekil.

Sünger Tipleri (Kanal Sistemleri): Süngerlerde; akson, sikon ve lökon olmak üzere 3 tip sünger tipi vardır.

1.2.5 Süngerlerde Üreme

Süngerlerde üreme eşeyli ve eşeysiz olmak üzere 2 şekilde görülmektedir (Berquist 1978, Vacelet 1985).

1.2.5.1 Eşeysiz üreme

Süngerlerdeki eşeysiz üreme şekillerinden biri tomurcuklanma olup, dış tomurcuklanma ve iç tomurcuklanma olarak ikiye ayrılır. Dış tomurcuklanmada arkeosit hücreler süngerin yüzeyine akın ederek burada gruplaşıp, yeni bir kitle oluştururlar ve anne süngerden ayrılırlar. Herhangi bir yere tutunan arkeositler farklılaşarak yeni bir sünger bireyi oluştururlar. İç tomurcuklanma ise tatlısı süngerlerinde rastlanır. Yazın sonunda ortam şartları bozulduğunda süngerler “Gemmula” adı verilen yapılar oluştururlar. Gemmulalar arkeositlerin yoğun bir şekilde bir araya gelmesiyle oluşur ve bir kabuk salgırlar. Kabuk iki tabakalı kitinsi bir yapı olup, bunların arasındaki skleroblastlar, amfidisklerden oluşan bir iskelet meydana getirirler. İlkbaharda uygun ortam koşullarının gelmesi ile gemmulaların içindekiler dışarı atılır ve arkeositler yeniden bölünüp farklılaşarak, farklı hücreleri oluştururlar. Eğer gemmulalar anne süngerin iskeletini terk edememişse bu iskeletle kaynaşırlar. Son yıllarda, gemmulaların zor durumda kaldıklarında (besin yetersizliği, ısı değişimi gibi) *in vitro* koşullarda bazı deniz süngerlerinde olduğu fark edilmiştir. Bazı sünger araştırma grupları bu yapıların biyoteknolojik potansiyelleri olabileceğini düşünmektedir ve bu yapılardan laboratuvar ortamında yetişkin süngerler üretilmesi çalışmaları devam etmektedir. Süngerlerde izlenen bir diğer eşeysiz üreme şekli rejenerasyondur. Bir süngerin herhangi bir bölümü yaralanırsa veya koparsa, bu eksik bölüm hemen sünger tarafından onararak tamamlanır. Parçalanmış bölümler ameoboid hücrelerin faaliyeti sonucu kendilerini tamamlayarak yavaş yavaş büyür ve yeni bir sünger oluştururlar. Kopan parçanın gelişerek yeniden tam bir sünger haline gelmesi mümkün olduğu gibi, ince bir ipek kumaşla bir sünger parçasının sıkıştırılması suretiyle sızdırılarak su içine dağılan hücreler tekrar bir araya gelerek yeni bir sünger oluşturabilirler. Bu olay ilk olarak Wilson (1907) tarafından fark edilmiş ve sünger yetiştirilmesinde kullanılmıştır.

1.2.5.2 Eşeyli üreme

Süngerler yumurta ve sperm hücreleri vererek eşeyssel olarak da çoğalırlar. Gametler amibosit ve koanositlerden oluşur. Bazı süngerler hem erkek hem de dişi gamet oluştururlar. Süngerlerde gametler vücudun herhangi bir yerinde mesoglea içinde koanosit

veya embriyo hücrelerinden oluşan arkeositlerden başlayarak çoğalırlar. Süngerlerde embriyonik gelişme gruplara göre oldukça farklıdır. Birkaç tür yumurtalarını dışarı bıraksa da, genellikle oskulumda dışarı çıkarak serbest kalır. Larva kamçı önde olmak üzere serbest olarak suda birkaç saat yüzer ve dibe iner. Dibe kamçılı bölümünden kendini zemine sabitler. Sabitlenmenin ardından endodermik hücreler ektoderm hücrelerinin altına göç ederler ve mesoglea taslağını oluştururlar. İki tabaka arasındaki granüler maddenin, porların ve oskulumların oluşması ve iskelet spiküllerinin salgılanması ile sünger gelişimini tamamlayarak genç bir sünger halini alır.

1.2.6 Süngerlerde Beslenme, Davranış ve Diğer Canlılarla İlişkileri

Gastral tabakada yer alan koanosit hücrelerin kamçı hareketleriyle yaratılan su akımı sayesinde su kanal, sistemini dolaşarak oksijen ve besin partiküllerini taşır. Süngerlerde solunum dıştan örtü hücreleri, içten yakalı kamçı hücreler ve vücut içi hücreleri tarafından sağlanır. Amibositler oksijeni mesoglea içinde vücudun her tarafına dağıtırlar ve karbondioksiti dışarıya verirler. Solunum tamamen hücre solunumu şeklinde gelişir. Süngerler filtre ettikleri suyun içinde yer alan küçük partiküllerle beslenirler. Süngerler 0,1µm–50µm arasındaki tüm organik partiküllerle herhangi bir seçim yapmadan kolaylıkla beslenebilirler (fitoplankton, heterotrofik bakteri, heterotrofik ökaryot ve zemindeki organik madde). Süngerlerin büyük miktarlardaki deniz suyunu işlemekten geçirebilme ve ihtiyacı olan partikülleri elde edebilme yeteneklerinden dolayı, diğer süspansiyon yoluyla beslenenlere karşı büyük bir avantajı olduğu düşünülmektedir. Bu avantajda süngerlerin tropikal resif habitatları gibi besince fakir habitatlarda dominant grup olarak yaşamalarına olanak sağlıyor (Berquist 1978). 10cm. yükseklikte ve 1cm çapında bir sünger ortalama 22lt/gün'lük su filtreleme kapasitesine sahiptir. Vacelet (1985)'e göre, büyük süngerler 10 saniyede kendi hacimleri kadar suyu filtre edebilmektedirler. İyi güneş ışığı alan bölgelerde ise süngerlerin vücutlarında bulunan cyanobakterilerin fotosentezi neticesinde sünger kendine ekstradan bir besin sağlar. Süngerlerde davranış oldukça kısıtlıdır zira bu hayvanlarda sinir sistemi yoktur. Sinir hücreleri olmadan duyuları iletmek hemen hemen imkansızdır. Bazı süngerlerde oskulum ve ostium açıklıkları civarında sinir hücreleri bulunsa da, bunlar hiçbir zaman bir sistem oluşturmazlar. Bu nedenle belli uyarılara cevaplar çok yavaş olmaktadır. Karides ve yengeçler gibi birçok canlı sünger boşluklarında yaşamaktadır. Denizyıldızı, karides, yengeçlerin ve diğer bazı canlıların genç bireylerine habitat oluşturmaktadırlar. Süngerlerin önemli bir predatörü yoktur. Hoşa

gitmeyen kokuları ve tatları yanında iskeletlerinin spikülü olması da bunun önemli sebeplerindendir. Bilinen en temel avcıları deniz salyangozları ve deniztavşanlarıdır.

1.3 Çalışmanın Amacı

Bu çalışma kapsamında ülkemiz denizlerinde bulunan süngerlerden biyoaktif madde (ikincil metabolizma ürünleri) salgıladığı bilinen ve salgılama potansiyeli görülen türlerin arazi ortamında örneklenmesi, laboratuvar ortamına taşınması, kollajen tip II, IV ve integrin β proteinlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda tespit edilen sünger türlerinden (*Aplysina aerophoba*, *Axinella polypoides*, *Chondrosia reniformis* ve *Dysidea avara*) sualtı ortamında incelenmesi, örneklenmesi ve laboratuvar ortamına protein yapıları zarar görmeyecek biçimde transferleri yapılmış, monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan immunohistokimyasal metotlarla bu süngerlerde hedeflenen proteinlerin varlığı sorgulanmıştır. Bu çalışmaları takiben RNA ekstraksiyonu, PCR, nükleotid dizin analizi gibi metotlarla tespit edilen proteinlere ait bölgeler incelenmiş ve bu bölümler farklı tür süngerlerdeki benzer bölümlerle kıyaslanmıştır.

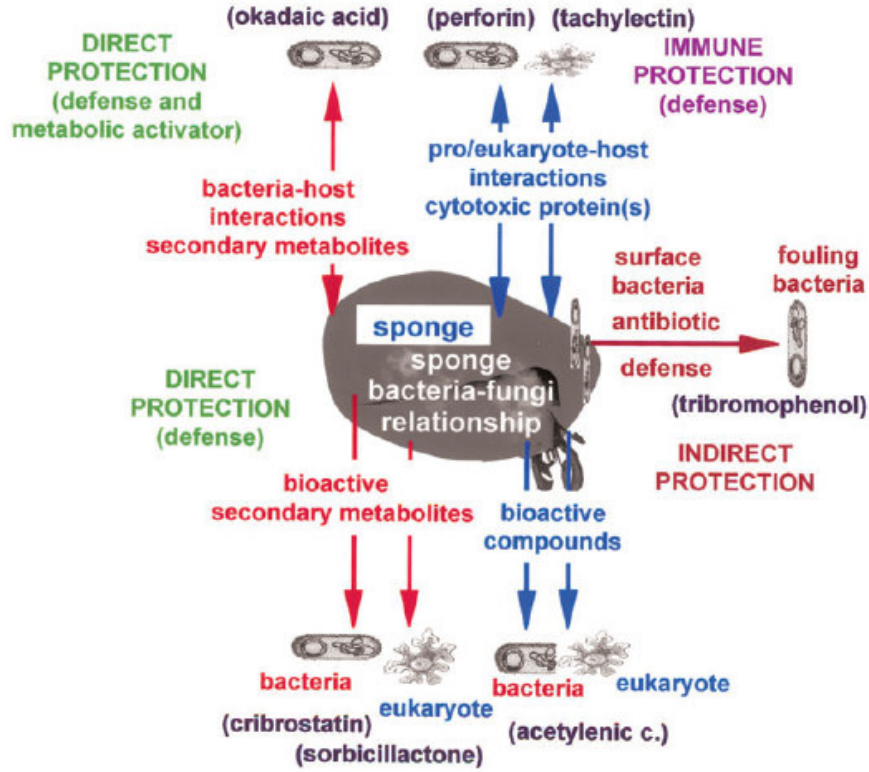
2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Süngerlerin Savunma Mekanizmaları

Bu renkli ve güzel görünümlü canlılara dair şu ana kadar elde edilmiş en önemli bilgi, sabit canlılar olmalarına rağmen kendilerini üst düzeyde koruma kabiliyetleridir. Süngerler, deniz ekosistemindeki avcılara ve patojenlere karşı geliştirmiş olduğu savunma amaçlı kimyasal silahlarla donanmışlardır. Okyanusların derinliklerindeki hidrotermal bacalarda dahi yaşamayı başarmış olan bu canlıların bu önemli yeteneklerinin, rakiplerinin şiddetli evrimsel baskısı, zehirler, enfeksiyonlar, elde edilebilir besinin ve yaşam alanının kısıtlı olması gibi doğal baskılardan dolayı olduğu düşünülmektedir (Thakur et al. 2004). Bu canlıların oldukça uzun bir zamandır da dünya denizlerinde bulunmaları nedeniyle, kendilerini ve dolayısıyla ürettikleri bileşikleri geliştirmeye yeterince zaman bulabildiklerini varsayabiliriz. Üretilen sünger ikincil metabolitlerine yönelik araştırmalarda bu bileşiklerin süngerlerin metabolizmalarına yönelik oynadıkları rollerin dışında canlının bulunduğu çevreye yönelik stratejilerinde de aktif oldukları anlaşılmıştır. Süngerlerin ürettikleri bu ikincil metabolitler çok çeşitlidir, ayrıca bunları rakiplere ve istilacılara karşı savunma aracı olarak kullandıklarına dair kanıtlara literatürde rastlanabilmektedir (Pawlik et al. 1995). Süngerlerin yukarıda değindiğimiz savunma stratejilerinin üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve bu araştırmalar aşağıda verilen çeşitli düşüncelere yol açmıştır (Şekil 2.1).

2.2 Süngerlerinin Biyoteknolojik Potansiyelleri

Yukarıda bahsettiğimiz sünger savunma stratejilerinden bazıları çevreyle dost çürümeye karşı kullanılacak bileşikler ve stratejiler geliştirebilmek için kullanılmaktadır. Örneğin biyolojik çürüme (biofouling) sualtındaki yapıların ve cihazların bozulmasına ve dayanıksız hale gelmelerine yol açıp oldukça yüklü bir ekonomik faturayı karşımıza çıkarmaktadır. Halen kullanımda olan antifouling ürünler ise toksik bileşenler içermekte ve çevreye büyük zararları olmaktadır. Ekolojik olarak dost anti-fouling bileşikler üretebilmek içinde sünger gibi bazı deniz organizmaların önemi zamanla anlaşılmaktadır. Bu organizmaların kendi yüzeylerinde diğer organizmaların barınmasını ve büyümesini engelleme stratejileri, antifouling araştırmalarına yön vermektedir. Gerçekleştirilen bazı çalışmalarda da görülmüştür ki deniz süngerleri antifouling potansiyelleri olan biyoaktif metabolitleri bünyelerinde barındırmaktadır (Clare et al. 1996, Henrikson ve Pawlik 1998).



1) *Birinci (Direk Koruma)*: Konak sünger, saldırgan mikroorganizmalara veya eukaryotlara karşı koruma amaçlı olarak biyoaktif bileşikler sentezlemektedir örn. asetilenik bileşikler. Simbiyotik bakteriler veya mantarlar antibiyotik olarak davranan ikincil metabolizma ürünlerini salgılamaktadır örn. cribrostatin veya sitotoksik bileşikler örn. sorbicillactone A. Fonksiyonel olarak bu bileşikler (muhtemelen) yalnızca savunmaya dayalı moleküller olarak davranmaktadır.

2) *İkinci (Direk Koruma)*: Süngerlerin ikincil metabolizma ürünlerinin başka bir fonksiyonel sınıfı ve bunlarla assosiyeli olmuş mikroorganizmalar beraber rol üstlenmektedirler; Bunlar savunmayla birlikte kendini savunmaya yönelik mühim yolların aktivasyonunda görev alırlar (metabolik aktivatör). *Suberites domuncula* sünger türünde bulunan okadaik asit bileşiğinde bunun ilk kanıtlanmış örneğidir. Okadaik asit, *S. domuncula* süngerinde barınan bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Bu bileşik öncelikle yabancı *metozoa* saldırganları karşısında savunma molekülü olarak görev almakta ve aynı zamanda yolların pozitif modülasyonu, konakçının immun tepkilerini çoğaltmaktadır

3) *Üçüncü (Immün Koruma)*: Sünger proteinsel biyoaktif moleküller üreterek bakterinin gelişimini hapsedmektedir, örn. perforin ve tachylectin, veya eukaryotik hücreleri yok etmektedir, örn. agglutininer.

4) *Dördüncü (Endirekt Koruma)*: Eğer gerekirse, konakçı sünger, yüzeyinde, bozulmaya yol açan bakterilere karşı biyoaktif bileşikler üreten seçilmiş bakteri kümelerini barındırmaktadır, örn. tribromophenol

Şekil 2.1 Süngerlerin Savunma Stratejileri (Müller et al. 2004).

2.3 Süngerlerin Biyomedikal Potansiyelleri

Son yirmi yıl içerisinde keşfedilmiş dünyadaki bilinen bütün yaşam formları arasında deniz canlıları, en yüksek sayıda, insan patojenlerine ve rahatsızlıklarına karşı biyolojik olarak aktif olan, tamamıyla yeni molekülleri bünyelerinde barındırmaktadırlar. Deniz canlılarının ilginç özellikler taşıyan bir takım moleküllerin kaynağı olma özelliği çok

geniştir ve de şu ana kadar bu özellikler çok az incelenmiştir (Simpson 1984). Deniz canlılarının arasında en zengin doğal ürün kaynakları deniz omurgasızlarıdır. Dünyadaki bilinen bütün deniz canlıları içerisinde de, yerleşik deniz omurgasızları familyası üyeleri, insan patojen ve rahatsızlıklarına yönelik biyolojik aktiviteyi en yüksek seviyede göstermektedirler. Bu canlılar günümüze kadar keşfedilmiş çok yüksek miktarlardaki doğal deniz ürününü üretmekle kalmayıp en geniş doğal ürün yelpazesini de sergilerler (Şekil 2.2). Şu sıralar klinik deneme aşamalarında olan 13 doğal deniz ürününden 12 si deniz omurgasızlarından elde edilmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Klinik deneme aşamasında olan bazı doğal deniz ürünleri (Proksch et al. 2002).

Kaynak Canlı	Bileşikler	Hastalık	Klinik Faz
<i>Conus magnus</i> (koni salyangoz)	Ziconotide	Ağrı	III
<i>Ecteinascidia turbinata</i> (tunikat)	Ecteinascidin 743	Kanser	II/III
<i>Dolabella auricularia</i> (deniz tavşanı)	Dolastatin 10	Kanser	II
<i>Dolabella auricularia</i> (deniz tavşanı)	LU103793	Kanser	II
<i>Bugula neritina</i> (bryozoon)	Bryostatin 1	Kanser	II
<i>Trididemnum solidum</i> (tunikat)	Didemnin B	Kanser	II
<i>Squalus acanthias</i> (köpekbalığı)	Squalamine laktat	Kanser	II
<i>Aplidium albicans</i> (tunikat)	Aplidine	Kanser	I/II
<i>Agelas mauritianus</i> (sünger)	KRN7000	Kanser	I
<i>Petrosia contignata</i> (sünger)	IPL 576,092	İltihap/astım	I
<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i> (yumuşak mercan)	Methopterosin	İltihap/yara	I
<i>Luffariella variabilis</i> (sünger)	Manoalide	İltihap/psoriasis	I
<i>Amphiporus lactifloreus</i> (deniz kurtu)	GTS-21	Alzheimer/schizophrenia	I

Denizlerde yaşayan diğer organizmalarla karşılaştırıldığında, süngerlerde biyolojik olarak aktif maddelere daha sıklıkla karşılaşılmıştır. Süngerler, avcılarını uzaklaştırmak için ve savunma amaçlı olarak, işgalci türlerle yaşam alanı için yarışabilmek, iletişim ve enfeksiyonlardan korunmak amacıyla toksik ve diğer koruyucu özelliklere sahip bileşikler

salgılamaktadır (Çizelge 2.1). Anti-kanser ajanlar ve bağışıklık-ayarlayıcılar (düzenleyici) süngerlerde tanımlanmış olan potansiyel terapötik bileşikler arasında yer almaktadır.

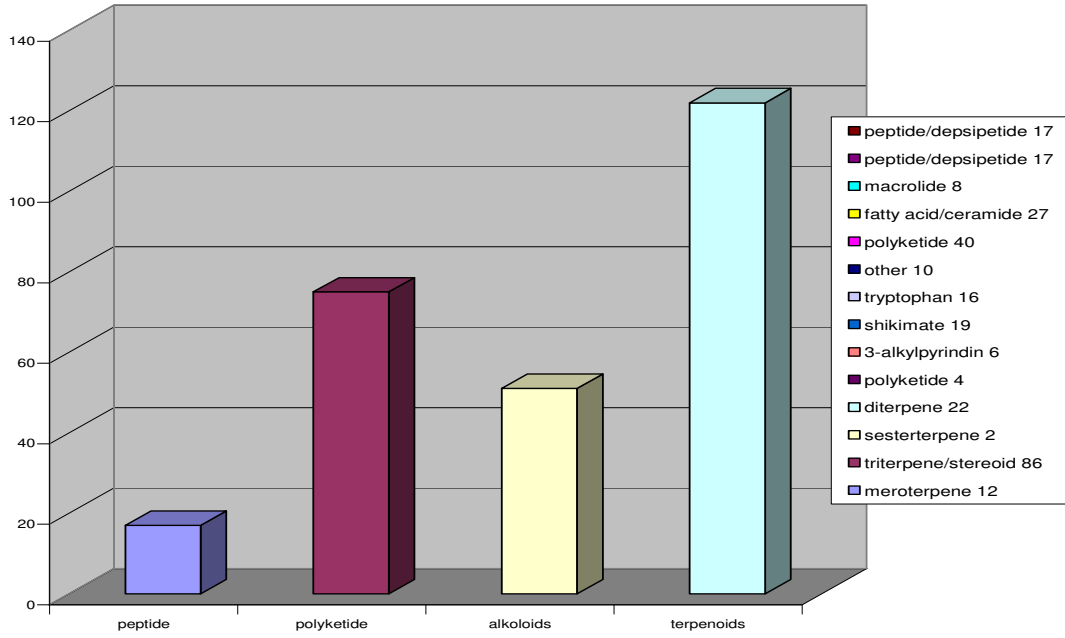
Süngerlerin ikincil metabolitlerinin göstermiş olduğu, anti-viral, anti-mikrobiyal ve anti-tümör, özellikleri ve terapötik ilaç olarak kullanılabilme potansiyelleri, Avrupa'da ve dünyada birçok bilim adamının ve biyoteknoloji çevrelerinin artan ilgisini çekmektedir ve bu nedenle de bilim çevreleri tarafından en çok çalışılan deniz canlısıdır (Şekil 2.3). Süngerler pek çok alanda kullanılmakla beraber özellikle tıbbi biyoteknolojide ve endüstriyel biyoteknolojide oldukça yaygın kullanılmaktadır (Hooper 2000).

Çizelge 2.2 İlaç piyasasında ya da klinik deneme aşamalarında olan sünger kaynaklı bioaktif ürünler (Thakur ve Müller 2004)

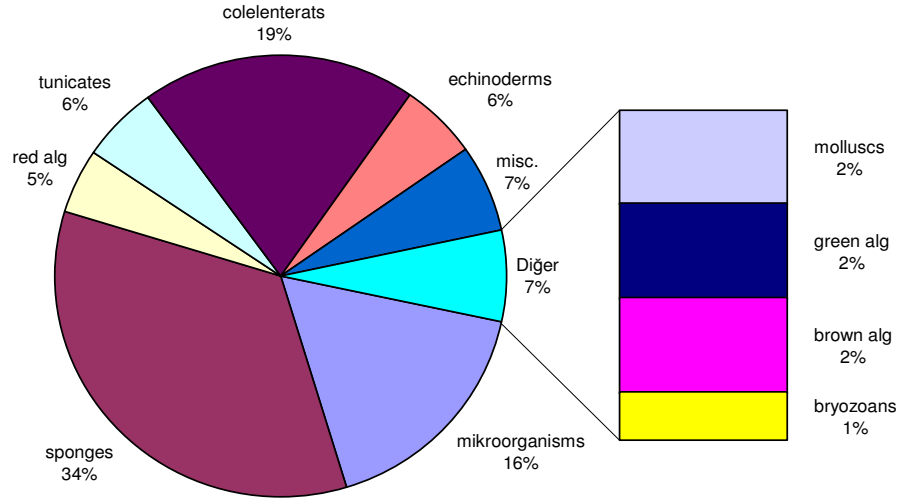
Bileşikler	Uygulama Alanı	Klinik Faz
Ara-A	Antiviral	Kullanımda
Ara-C	Antikanser	Kullanımda
Manoalide	Moleküler Probe Fosfolipaz A2 İnhibitör	Kullanımda
IPL512602	Antienflamatuar Astım	Klinik Faz II
Manoalide	Antienflamatuar Sedef	Klinik Faz I
KRN 7000	Antikanser	Klinik Faz I
LAF389	Antikanser	Klinik Faz I
Discodermolide	Antikanser	Klinik Faz I
HTI286	Antikanser	Klinik Faz I

2.3.1 Anti-enflamatuar aktivite

Süngerlerin anti enflamatuar bileşikler için iyi bir kaynak oldukları kanıtlanmıştır. Manoalide bileşiği, bir deniz süngerinden (*Lufferiella variabilis*) izole edilen sesterterpenoidlerin öncülerinden olmakla birlikte, antibiyotik ve anelgezik bir molekül olduğu görülmüştür ve bu özelliklerinden ötürü oldukça yoğun çalışılmıştır (Mayer ve et al. 1998). Bu molekülün anti-enflamatuar aktivitesi, fosfolipaz A2 enziminin membrana bağlanmasının engellenmesi yoluyla, arakidonik asidin membran fosfolipitlerinden salınmasının geri



Şekil 2.2 Deniz omurgasız kaynaklı doğal ürün yelpazesi. Training course on diversity, phlogeny and ecology of Porifera, Toulouse, 17-30 2005 July.



Şekil 2.3 Deniz canlılarının araştırma oranları. Süngerler, deniz canlıları arasında üzerinde en çok biyomedikal çalışma yapılan organizmalardır. Training course on diversity, phlogeny and ecology of Porifera, Toulouse, 17-30 2005 July.

dönüşümsüz inhibisyonudur. Intraselüler arakidonik asit konsantrasyonunun artışı, enflamasyon mediatörleri olan prostoglandinler ve lökotrienlerin sentezinin düzenlenmesine yol açmaktadır. Fosfolipaz A2 inhibisyonuna Dictyoceratida takımından birçok sünger sesterterpeninde rastlanmıştır ve enflamasyon mekanizmasını etkileme şekilleri, şu an kullanılmakta olan non-steroidal ilaçlardan oldukça farklıdır (Hassan 2004).

2.3.2 Anti-viral ve anti tümör aktivite

Okyanuslar ve denizler antiviral ve anti kanser ilaçlarının en muhtemel kaynakları olarak görülmektedir. Hem antiviral hem de anti kanser ilaçları konak organizmaya zarar vermeden hücre büyümesini inhibe ederek çalışmaktadırlar. Kanser dünyadaki ölüm nedenleri arasında ikinci sırada yer almaktadır, ancak gelişmiş ülkelerdeki hastalıkların %60'ı viral enfeksiyonlar nedeniyle oluşmaktadır. Virüsler tedavilere karşı veya hastalıktan korunma yöntemlerine karşı diğer bütün organizmalardan daha uzun süre dirençli kalmışlardır. Deniz canlılarından kemoterapötik ajanların bulunması için yapılan çalışmalar antiviral aktivite gösteren bazı umut verici terapötik öncülerin ortaya çıkarılmasına yol açmıştır. Belki de bunlardan en önemlisi, Bergmann ve Feeney (1951)'in *Cryptotethia crypta* süngerinde gerçekleştirdiği öncü çalışmasında bulduğu arabinozil nukleozitlerdir (spongothymidine, spongosine ve sponguridine). Bunlar lösemilerin tedavisinde terapötik olarak kullanılan **Ara-C** ve 70lerin sonuna kadar *Herpes encephalitis* tedavisinde kullanılan virüstatik ajan **Ara-A**'nın (Vidarabine) geliştirilmesinde öncü bileşikler oluşturmuşlardır .

Süngerler ayrıca çok etkili anti-viral özellikleri olan bileşik kaynaklarıdır ve farklı türlerden birçok HIV inhibe edici bileşik keşfedilmiştir ancak bunların mekanizmaları çok az anlaşılabilmiştir. Papuamides C ve D, haplosamates A ve B, avarol (anti-sedef olarak patentli) çeşitli süngerlerden bazı HIV inhibe edici bileşiklerdir. Birçok diğer sünger anti-viral bileşiği için inhibisyon mekanizması tam olarak bilinmemektedir ancak bir dizi virüs üzerinde etkilidirler. Örnek olarak *Hamigera tarangaensis* süngerinden elde edilen Hamigeran B bileşiği hem Herpes hem de Polio virüslerine karşı 100% *in vitro* inhibisyon göstermekte, *Petrosia weinbergi*'den elde edilen weinbersterol A ve B bileşikler de felin lösemi, fare gripi ve fare corona virüslerine karşı *in vitro* aktivite göstermiştir. Genel

olarak süngerlerden elde edilen moleküller virüslere karşı koruma sağlamamakta ancak infekte olmuş hastaları tedavi edici ilaçlarda kullanılabilirler (Sipkema 2004).

2.3.3 Anti-protozoal aktivite

Prozotoa parazitleri tarafından hastalıklar dünya çapında yüksek sayıda ölümlere yol açmaktadır. *Plakortis* cinsine ait süngerler siklik peroksit üretimlerinden dolayı bilinmektedirler. Palau süngerlerinden *Plakortis* aff. *angulospiculatus* tarafından üretilen iki peroksit, *Leishmania mexicana* parazite karşı etkili olmaktadır (Donia ve Hamann 2003). Kızıl Deniz süngerlerinden *Diacarnus erythraeanus* tarafından üretilen sigmosceptrellin-B, *T. Gondii* parazite karşı yan toksik etkiler olmadan kuvvetli in vitro aktivite sergilemektedir. Sigmosceptrellin-B, insanlardaki diploid fibroblast hücrelerindeki parazitlere karşı aktiftir (El Sayed et al. 2001). Jamaika süngeri *Plakinastrella onkodes*'den elde edilen siklik peroxy lactone plakortide yine *T. gondii*'ye karşı güçlü aktiviteye sahiptir (Perry et al. 2001).

2.3.4 Anti sıtma aktivite

Son yirmi yılda sıtma insanlık adına büyük bir tehlike olmuştur. Sıtmanın endemik olduğu bölgelerde 1,5 milyar insan yaşamaktadır ve her yıl 1,5 milyon insan bu hastalıktan dolayı ölmektedir. Sıtmaya bağımlı ölümlerin çoğunluğu *P.falciparum* paraziti (Mishra et al. 1999) tarafından oluşmaktadır ve *Anopheles* sivrisineğinin vasıtasıyla yayılmaktadır. Bu hastalığın bulaşma vektörünü engellemek neredeyse imkansız olduğuna göre farklı mekanizmalarla hareket eden yeni anti-sıtma ajanlarına (chloroquine, mefloquine, quinine ve sulfadoxine-pyrimethamine) her zaman ihtiyaç olmuştur (Donia ve Hamann 2003). *Haliclona* ailesinden tropik bir süngerden elde edilen Manzamine A bileşiği *P. falciparum*'a karşı güçlü in vitro aktivite sergilemiştir. Manzamine A sıtma parazitinin *in vivo* gelişimini engellemektedir (Ang et al. 2000). Manzamine A ve onun türevleri anti-parazitik aktivite ve biyolojik kullanılabilirliğinden ötürü ayrıca görünür toksik etkiler içermemesi açısından hızlı hamle yapabilme olanakları sunmaktadırlar. Bu bileşiğin ve onun analoglarının sıtma üzerindeki etkileri bunları denizlerde keşfedilmiş en umut verici anti-enfeksiyon öncülerinden biri yapmıştır. Bu bileşiğe ilaveten farklı birkaç tür süngerden de sıtmaya karşı aktivite gösteren bazı bileşikler tespit edilmiştir. Bunların arasından, *Cymbastela hooperi* sünger türünden elde edilen di-isocyano adociane bileşiği

(Konig et al. 1996) ve Okinawa süngeri olan *Acanthella* sp.den elde edilen Kalihinol A (Miyaoaka et al. 1998) bileşiği sayılabilir.

2.3.5 Anti-mantar, antibiyotik aktivite

Şu anda mevcut bulunan anti-bakteriyellere karşı direnç gelişimi enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde ciddi güçlükler oluşturmaktadır ve bu yüzden biyomedikal araştırmalarda yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi ve geliştirilmesi yüksek öneme tabidir. Her sene denizlerden antibiyotik özelliği olan birçok molekül bulunmaktadır ancak süngerlerde bu antibiyotik özelliklere rastlama olanağı çok yüksektir. Burkholder ve Ruetzler Gram (+) ve Gram (-) bakterilere karşı antibiyotik etki deneyleri sonucunda görülmüştür ki, test edilen 31 sünger türünden 18'i çok güçlü etkiye sahiptir (Sipkema 2005). Buna yeni sünger kaynaklı antibiyotiklerin değerini göstermek amacıyla *Arenosclera brasiliensis* türünden elde edilen Arenosclerins A-C molekülünün bir hastaneden izole edilen 12 çeşit bakteriye karşı inhibisyon etkisi göstermesini örnek verebiliriz (Torres et al. 2002). Mavi sünger *Cribrachalina* sp.'den izole edilen Cribrostatinler güçlü anti neoplastik ve anti mikrobiyal aktivite sergilemektedir. Cribrostatin 3, *Neisseria gonorrhoeae*' ye karşı kuvvetli inhibisyon aktivitesi ve penisiline dayanıklı olan *N. gonorrhoeae*'ye karşı aktivite göstermiştir (Pettit et al. 2000). Şu an kullanımda olan sünger fungusitleri anti-mikrobiyallardan daha az çeşitlidir ve insanlara, hayvanlara ve bitkilere olan toksik etkilerinden ötürü kullanım alanları sınırlıdır. *Topsentia* sp.'den topsentiasterols D ve E, *Acanthodendrilla* sp.'den acanthosterol sülfatlar I ve J, Calcerea süngerlerinden *L. caveolata*'dan macrolide leucascandrolide A gibi fungusitlerin ve diğerlerinin daha yoğun araştırılması gerekmektedir (Donia ve Hamann 2003).

2.3.6 Anti-tüberküloz Aktivite

Yeni anti-tüberküloz ajanların araştırılması, ilaçlara karşı multi-dirençli *Mycobacterium tuberculosis* varyasyonlarının ortaya çıkmasıyla oldukça önem kazanmıştır. *Pachypellina* sp. sünger türü ve bir Petrosiidae cinsinden izole edilen alkaloid (+)-8-hydroxymanzamine A, *M. tuberculosis* H37Rv'ye karşı kuvvetli inhibitif aktivite göstermektedir (Ichiba et al. 1994). Ircinol A, düşük sitotoksik aktivite göstermesinden dolayı diğer manzamine tip alkaloid'lere göre yapısal komplekslik gösterdiği için *in vivo* değerlendirmeler için ideal bir adaydır (Yousaf et al. 2002). Manzamine A, *M. tuberculosis* H37Rv'yi inhibe

etmektedir. *Acenthella klethra* sünger türünden izole edilen Axisonitrile-3 yine *M. Tuberculosis*'i inhibe etmektedir (Konig et al. 2000). Hawaii'den toplanan Verongida ve Dictyoceratida takımlarının içinde yer alan süngerlerden elde edilen Puupehenone bileşiği, *M. tuberculosis* H37Rv'nin büyümesini 99% oranında inhibe etmiştir (Nasu et al. 1995, El Sayed et al. 2000).

Yukarıda sayılanların yanı sıra süngerlerin bahsedilmeye değer bazı biyomedikal özellikleri daha vardır. Bunlardan nörosupresif ve immüsupresif aktiviteye sahip bileşikler, diyabet, atherosclerosis, thrombosis gibi kan hastalıklarına karşı kullanılabilen bazı bileşikler ve kas gevşeticileri sayabiliriz.

2.4 Sünger Mikroorganizma Ortakçıl Yaşam

Süngerler birçok çeşitli simbiyotik mikroorganizma için barınakçı canlılardır. Süngerler bentik habitatlarda katı zeminlere tutunarak yaşamakta olan basit çok hücreli omurgasızlardır. Bütün süngerler filtre ile beslenmektedir; yüzeylerinde bulunan düzinelerce ufak delik suyun içeriye girebilmesini, mikroorganizmalar ve organik partiküllerin dışarıya filtre edildiği veya yenildiği kanal sistemlerinden oluşan bir sistemin içinde dolaşabilmesini sağlamaktadır. Süngerler oldukça etkili filtre ediciler oldukları için, süngerlerin sindirim işlemlerine ve savunma tepkilerine dayanabilen her hangi bir mikroorganizma başarılı bir şekilde canlıda barınabilir (Wilkinson 1987). Süngerler üzerinde çeşitli mikroorganizmalar bulunmuştur. Bunların arasında, çeşitli farklı tür arke, heterotrofik bakteri, cyanobakteri, yeşil alg, kırmızı alg, kriptofit, dinoflagellat ve diatomlar sayılabilir (Lee et al. 2001). Simbiyotik mikrobiyal canlı topluluğu oldukça zengindir ve tür kompozisyonu coğrafik varyasyonlar göstermektedir, buna rağmen sünger-simbiyotik mikroorganizma arasında taksonomik bağımlılık açısından oldukça kısıtlı bilgimiz bulunmaktadır (Friedrich et al. 1999). Bir konakçı sünger çeşitli simbiyontlara sahip olabilmektedir. Örneğin *Theonella swinhoei*, tek hücreli heterotrofik bakterileri, tek hücreli cyanobakteriler ve filamentli heterotrofik bakterileri aynı zamanda destekleyebilmektedir. Sünger-mikroorganizma ilişkisi çok yoğun olarak araştırılıyor olmasına rağmen araştırmacıların kafasını meşgul eden ve cevaplanması güç birçok soru bulunmaktadır.

Acaba tür-spesifikliği sünger-mikroorganizma ilişkisinde bulunmakta mıdır?

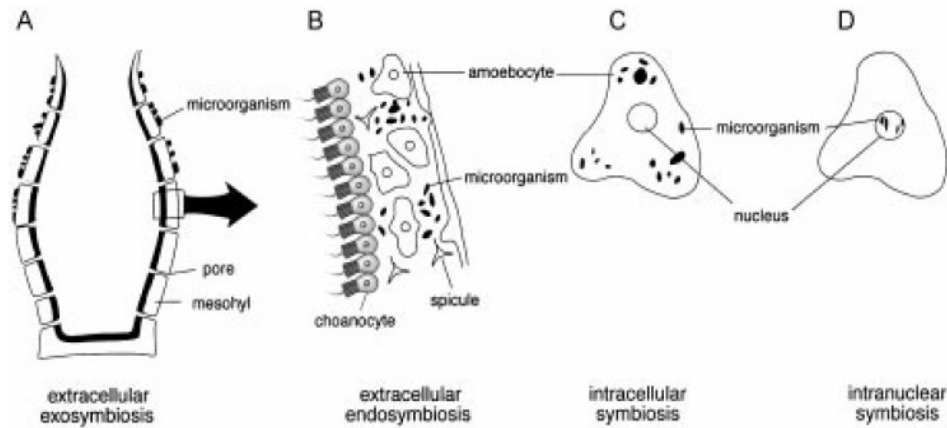
Bazı simbiyontlar spesifik süngerlerde bulunmaktadırlar, bazıları ise farklı coğrafyalardaki farklı türlerde rastlanabilmektedir.

Mikroorganizmalar Süngerler Üzerinde Hangi Noktalarda Yaşamaktadırlar?

Simbiyotik canlılar hem intra hem de extracellular bölgelerde bulunmaktadırlar ve her simbiyotik mikroorganizmanın konakçı sünger üzerinde spesifik bir habitatu bulunmaktadır. Extracellular simbiyontlar süngerin dış tabakalarında exosymbiontlar veya mesohyl'de endosymbiont olarak yer almaktadırlar (Şekil 2.4 A,B). Intracellular veya intranuclear simbiyontlar ise kalıcı olarak konakçı nuclei'sinde yaşamaktadırlar (Şekil 2.4 C,D). Süngerler üzerinde bulunan simbiyotik mikroorganizma miktarı konakçı türler arasında değişmektedir. Bakteriler bazı sünger biokütlesinin %60 ı kadarını teşkil edebilmekteyken, diğerleri az miktarlarda bakteriyi dokularının altında barındırırlar (Wilkinson, 1978a,1978b,1978c).

Mikroorganizmalar neden süngerler üzerinde yaşamaktadır?

Hem konak hem de konakçı canlılar açısından bir takım yararlanmalar olduğu düşünülebilir. Deniz süngerlerinin yüzeyleri veya dahili boşlukları besin ve sedimentler açısından deniz suyundan daha zengindir; bu sebepten süngerler misafirlerine güvenli habitat ve beslenme olanakları sunmaktadırlar (Bultel-Poncé et al. 1999). Diğer yanda ise, simbiyotik mikroorganizmalar, beslenmeye dair işlemler, intracellular sindirim veya nitrojen fiksasyonu, nitrifikasyon ve fotosentez gibi metabolitlerin translokasyonu



A, extracellular exosymbiosis; B, extracellular endosymbiosis; C, intracellular symbiosis; ve D, intranuclear symbiosis

Şekil 2.4 Süngerler ve mikroorganizmalar arasında var olan simbiyotik ilişkinin şematik diyagramı (Lee et al. 2001).

işlemlerinde süngerlere yardımcı olmaktadır (Wilkinson ve Fay 1979, Wilkinson ve Garrone 1980). Mikroorganizmalar, ayrıca sünger iskeletini stabilize etmekte ve istilacılara ve bozulmaya karşı süngerin kimyasal savunma sistemine katılmaktadırlar (Lee et al. 2001).

Mikroorganizmalar süngerler üzerinde nasıl yaşamaktadır?

Sünger-mikroorganizma ortakçıl yaşamının nasıl yürüdüğü tam anlamıyla anlaşılammıştır ancak bu konuda Webster ve Hill (2001) bazı hipotezlerde bulunmuşlardır; 1- Konak alternatifler arasından seçim yaparak simbiyotik canlıyı absorbe etmektedir. 2- Spesifik simbiyont diğer bütün simbiyotik mikroorganizmalardan daha hızlı gelişmektedir. 3- Yada sünger spesifik mikroorganizmayı dikey iletim yoluyla ebeveyn süngerden larvaya taşınmıştır.

Simbiyotik yaşam tam olarak nedir?

Sünger ile mikroorganizma arasındaki simbiyotik ilişkinin moleküler temeli yeteri kadar algılanamamıştır. Yapılan bazı araştırmalar daha önceleri süngerler tarafından üretildiği düşünülen bazı bileşiklerin simbiyotik organizmalar tarafından üretildiği tespit edilmiştir. Eğer bazı bileşikler ortakçıl mikroorganizmalar kaynaklıysa, bu canlıları kültüre etmek biyoaktif bileşiklerin elde edilmesi için gelişmiş bir kaynak oluşturabilir (Schmidt et al. 1991).

2.5. Sünger Kültürü

Tarihin ilk çağlarından beri insanlık tarafından çeşitli amaçlarla kullanılan süngerlere yönelik ilk çalışmalar genellikle denizlerde yeni bulunan canlıların tanımlanması, sınıflandırılması ve sünger biyolojisine yönelikti. Eski zamanlarda denizlerde bolca bulunan banyo süngerlerinin o günlerde derin sulardan çıkarılması oldukça zahmetli olduğu için, alternatif bir takım metotlar üzerinde düşünölmeye başlandı ve bu canlıların denizde kültüre etme denemeleri dünyanın birçok yerinde gerçekleştirildi. Sünger kültürü konusunda yapılan ilk çalışmalara 19 yy. sonu ve 20. yy. başında rastlanmaktadır. (Cotte, 1908). Bu ilk çalışmalar genellikle ticari banyo süngerlerini içerisinde barındıran Spongiidae ailesinin *in situ* kültürlenmesi üzerineydi. İlk önceleri ticari süngerlere yönelik olan bu çalışmalar, bazı süngerlerin biyoaktif maddelere sahip oldukları ve bu canlıların bir takım ilaçların geliştirilebilmesi için kullanılabileceğinin anlaşılmasından sonra diğer

türlere de kaymıştır. Bu çalışma kapsamında ticari öneme sahip olan süngerler ve biyoaktif önem teşkil eden diğer süngerlere yönelik farklı kültür denemelerine ve metotlarına bu bölümde yer verilmiştir. Çünkü bu çalışma da dahil olmak üzere bu canlılar üzerine gerçekleştirilen her tür bilimsel çalışma, eninde sonunda bu canlıların değerlerini kullanmak için, yapay olarak yüksek miktarlarda elde edilmesi düşüncesine doğru yönelmekte veya bu amaca hizmet etmektedir.

2.5.1 Denizde Sünger Yetiştiriciliği (Marikültür)

Deniz ortamında, kesilen sünger parçalarından (explant) yararlanılan sünger yetiştiriciliği ilk olarak yirminci yüzyılın başlarında, ticari süngerleri yapay olarak yetiştirebilmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde alüminyum teller yardımıyla yapay substratlara bağlanan süngerler parçalara ayrılmakta ve denize yerleştirilmekteydi. Moore (1910) tarafından bahsedilen bu basit yöntem günümüzde de halen ticari sünger üretiminde kullanılmaktadır. Bu tür geniş ölçekli banyo süngeri akvakültür uygulamalarına dünyanın çeşitli bölgelerinde denemiş bazılarında başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bunlardan biri 2. Dünya Savaşından önce Japon sünger yetiştiricileri tarafından kullanılan başarılı bir teknikti, bu yöntemde kesilmiş süngerlerin asılı olduğu ipler zemine sabitlenmiş ve yüzeyde bir yüzen cisimle işaretlenmişti ve böylece sabit kalmaları sağlanmış oluyordu (Cahn 1948). MacMillan (1996) ise ticari amaçla naylon iplere asılmış sünger parçalarıyla sünger akvakültürü hakkında bazı değerli noktalara temas etmiştir, Mac Millan'ın çalışmasında yer verdiği bu bilgiler ticari süngerler dışındaki türler içinde geçerli olduğu için oldukça önemlidir.

Son zamanlarda ise denizde sünger yetiştiriciliği (mariculture) denemeleri sünger-bazlı doğal ürün elde edilmesi araştırmalarına kaydırılmıştır. Yeni Zelanda'da biyoaktif metabolit elde edilmesi için gerçekleştirilen akvakültür uygulamalarında gelişme kaydedilmiştir (Battershill ve Page 1996). Bu çalışmalarda 5 sünger türünün (*Latrunculia brevis*, *Lissodendoryx n.sp.*, *Mycale murreyi*, *Polymastia croceus* ve *Raspailia agminata*) hedef bileşiklerin elde edilmesi amacıyla akvakültürleri yapılmıştır ve sonuçta şu an mevcut olan akvakültür metotları ile bu tür bir üretimin ileriki yıllarda mümkün olabileceği ortaya konulmuştur (Munro et al. 1999). Önümüzdeki 50 yıl için Yeni Zelanda, ticari amaçlı deniz çiftliği-ölçülerinde bir alanı sünger, deniz omurgasızları, deniz alglerinden terapötik kimyasal ajanların üretimi amacıyla akvakültür fizibilite araştırmalarına

ayırmıştır. Bu bölge Yeni Zelanda'daki 8 ayrı bölge için hem farklı sünger türlerinin hem optimal yetiştirme bölgeleri hem de bu türlerden hedef bileşiklerin üretilmesindeki çeşitlilikleri görmek amacıyla bir prototip bölgeyi oluşturmaktadır (Osinga et al.1999).

Bu yöntemin en büyük avantajları arasında denizlerin sonsuz bir kaynak olması yatmaktadır. Bu yöntemde süngerlerin gelişimi için gerekli olan koşulların (besin, akıntı, ışık, kimyasallar, pH, sıcaklık vb.) optimum olması yanı sıra bu koşullardan herhangi birinin doğru miktarda sağlanamaması canlının gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir. Bu sebeple kültüre edilecek sünger türü ve bu türün yaşam koşulları hakkında geniş bir bilgiye sahip olmak kültür başarısını doğrudan etkilemektedir. Bu konuda çalışan bilim adamları yöntemin başarısında yararlı olabilecek bazı önemli verilere ulaşmışlardır. Toplam hedef bileşik üretimi, ürünün hasadından önce yapay yollardan arttırmak mümkündür ve toplam ürün eldesi birçok bölgede optimize edilebilmektedir (Battershill et al. 2002). Büyüme konusunda Mac Millan 150–300 gr.lık sünger parçalarının normal sünger boyutlarına (800g) erişebilmesi için 2 sene gerekmekte olduğunu tespit etmiştir, diğer yanda sünger gelişimi üzerine en yüksek derecede büyüme oranı Battershill ve Page (1996)'in yaptığı çalışmada görülmüştür (1 ayda 5000% büyüme). Battershill akvakültürlerin başarılı olmasında ki bir diğer parametrenin, explantların yaşama alanı olarak üzerine yerleştirildiği materyallerin uygun olması ve bunların doğru kullanımı olduğu görüşündeydi, ayrıca bölge seçiminin büyümei etkilediği gibi hedef bileşikliklerin sentezini de büyük ölçüde etkilediğini tespit etmiştir. Yakın zaman önce Hilbertz et al. (1977)'in gerçekleştirdiği denemeler ve araştırmalar temel alınarak biyogenik yüzeyleri kolonizasyon substratı olarak kullanma sistemi ortaya çıkmıştır. Uygulanılan prensip oldukça basit olup, bu sistemde etkisiz anod (ör. Grafit veya titanyum) ve yapısal katod (metal ağ) arasından geçen bir elektrik akımı (DC), doğal benzeri kolonizasyon yapısını oluşturmak için yapay bir substrat olarak kullanılan Mg(OH₂) ve CaCO₃'ün katot üzerinde toplanmasını sağlamaktadır. Bu yapı daha önce, mercan resiflerinin onarılması ve yapay sualtı resiflerinin kurulması için kullanılmıştır. Bu geliştirilen teknik, farmakolojik özelliklere sahip Akdeniz süngerlerinin yetiştirilmesi için (Şekil 2.5), Calvi/Corsica Rovinj ve Rovinj yakınlarındaki Limski Kanalı'nda başarılı bir şekilde uyarlanmıştır (Müller 2003).

Sünger biyokütlesi üretebilmek için deniz kültürü yöntemine sıkça başvurulsa da, bu deniz tarımının bazı önemli dezavantajları bulunmaktadır. Sürdürülebilir, hızlı büyüme için

gerekli olan kültür ortamı değişken ve verimlilik hava ile doğru orantılıdır. Buna ilaveten sünger çiftlikleri hastalıklara ve parazitlerden kaynaklanan enfeksiyonlara ve fırtınalara



Sünger kafeslerinin hazırlanışı



Çeşitli süngerler barındıran sünger kafesleri



Sünger akvakültür ünitelerinin hazırlanışı



Deniz tabanına yerleştirilmeyi bekleyen ünite



Sünger türlerini taşıyan ağlar



1) Süngerlerin transplantasyon için hazırlanması
2) Tamamlanmış sünger ünitesi



Yerleştirilmiş akvakültür ünitesi (15m)



Yerleştirilmiş akvakültür ünitesi (15m)

Şekil 2.5 Limski Kanalı'ndaki farmakolojik özelliklere sahip Akdeniz süngerlerini yetiştirme amaçlı mariculture çalışmaları, <http://www.uni-essen.de/nomatec/>.

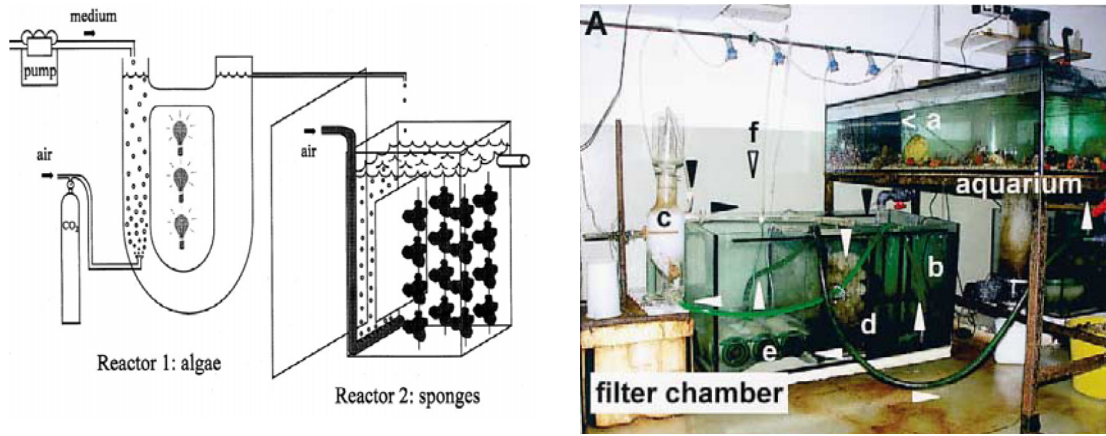
açıktır. Sıcak periyotlar süngerlerin hastalıklara karşı daha hassas olmasından ötürü bazen zorlu olabilmektedir (Belarbi et al. 2003). Yinede bu yöntem aşağıda bahsedeceğimiz diğer yöntemlere oldukça ağır basmaktadır ve farklı perspektifle, kıyı alanlarının sürdürülebilir gelişme ve idaresine bir katkı sağlayabilmek için kafes-balıkçılığı yapılan balık çiftliklerindeki kirlenmeyi kontrol edebilmek için kullanılabilir (Pronzato et al. 1998).

2.5.2 Biyoreaktör/Akvaryumda Kültür

Cotte (1908) laboratuvarlardaki akvaryumların süngerlerin gelişimi için uygun ortamlar olmadığını belirtmişti. Bu tespitten yirmi sene sonra Arndt farklı çoğunluğu Avrupa'daki deniz biyolojisi istasyonlarındaki (Helgoland, Plymouth ve Rovinj, Berlin Akvaryumu) akvaryumlara barındırılan 28 tür süngeri içeren bir çalışma hazırlamıştı. Arndt (1933) ayrıca süngerleri canlı tutmak ve akvaryumda barındırabilmek için kullanılması gereken uygun besinlerden de söz etmişti (Müller 2003). Bu yayının ardından gelen deniz süngerlerinin akvaryumlarda uzun dönemli kültürlenmelerine yönelik kayıtlar, genellikle büyük halka açık akvaryumlara (Kinne 1977) veya özel akvaryumcuların tesadüfî gözlemlerine dayanmaktadır. Daha sonraki bilgilerin büyük çoğunluğu Fossa ve Nilsen (1996) tarafından toparlanmıştır. Bu ikilinin kitabı akvaryumcu gözüyle yazılmış olmasına rağmen, büyük ölçekli olarak sünger kültürlenmesi geliştirilmesi için model türlerin seçiminde iyi bir başlangıç noktası oluşturur (Osinga et al. 1999).

Süngerlerden biyoaktif molekül elde edebilme amaçlı ilk *ex situ* çalışmayı, 20 yıl önce Barthel ve Theede (1986) Kuzey Denizinden topladıkları *Halichondria panicea* türü üzerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirmiş, bu denemede süngeri barındırmış ve gelişme gözlemlenmişlerdi. Bu çalışmayı takiben kapalı sistemlerde sünger kültürlenmesi üzerine yalnızca birkaç çalışma yapılmıştır (Osinga et al. 1998, 1999, 2001, Mendola, 2003). Osinga ve arkadaşları çalışmalarını Indo-Pasifik'ten bir Demosponge türü olan *Psudosuberites andrewsi* üzerine yoğunlaştırmış ve bu süngeri yapay deniz suyu içeren airlift biyoreaktörü temel alan *in vivo* kültür sistemlerinin incelenmesi ve geliştirilmesi için model canlı olarak seçmişlerdi (Şekil 2.6). Ayrıca bu çalışmayı takip eden yıllarda daha birçok sünger türünün (*Dysidea avara*, *Chondrosia reniformis*, *Crambe crambe*, vs..) Wageningen Üniversitesi akvaryumlarında barındırılması denenmiştir. Osinga et al (1999) kapalı devre sistemlerinde bu canlıların yetiştirilmesi ile ilgili oldukça detaylı bilgiler

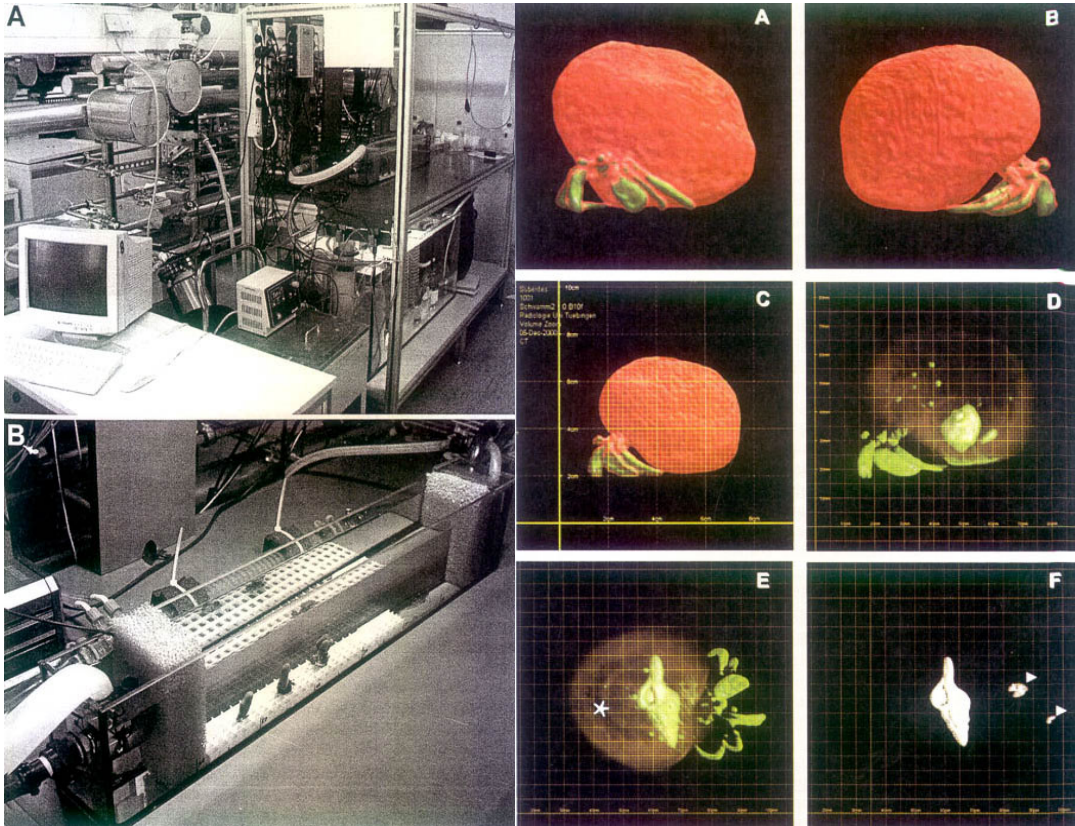
vermiş ve yöntemin başarısını etkileyebilecek unsurları ayrıntılı olarak incelemiştir. Bu unsurlar arasında en iyi besin kaynağının yanında, çözünür organik madde, su kalitesi, ışık rejimi, tuzluluk, sıcaklık, süngerin üzerinde yaşadığı substrat ve su akıntıları sayılabilir. Almanya'daki çeşitli üniversite ve enstitü akvaryumlarında Müller ve ekibinin araştırmalarında ise, Akdeniz'den getirilen 22 sünger türü barındırılmaya çalışılmıştır ve bu türlerden 14 ü birkaç aydan bir yıla kadar akvaryumda yaşatılabilmektedir ve beş türde ise büyüme gözlemlenmiştir.



Şekil 2.6 İki adet airlift biyoreaktör içeren *In vitro* sünger kültürü tasarımı. Birinci reaktörde, algler sürekli olarak yetiştirilmekte. Bu reaktörde gelişen canlı fazlalığı ise ikinci reaktördeki süngerlere sürekli ve kesintisiz besin sağlamaktadır. (Osinga et al. 1999)

Bu yapılan çalışmalarda kültür için seçilmiş türlerin içinde yaşamakta olduğu çevre koşulları hakkında detaylı ekolojik bilgiye ihtiyaç olduğu ve sünger araştırmacılarının bu koşulları akvaryum yada biyoreaktörde canlıya sağlamasının elzem olduğu sonucunu çıkarılmıştır. Gelişim hızının doğru belirlenebilmesi yapılan bütün çalışmalarda ortak görülen bir problemdir. Gelişim hızının belirlenmesi için kullanılmakta olan; oksijen tüketim hızını belirlenmesi, ortamda bulunan besin partiküllerinin ölçümü ve sualtı ağırlığının veya gövde alanı tespiti gibi bir takım seçenekler bulunmaktadır (Osinga et al. 1999, 2001). Müller ve arkadaşları ise, büyümeyi belirlemek için yalnızca kalitatif metotlar, fotografik örnekleme, bilgisayar destekli görüntü işleme ve istatistiksel analiz yöntemleri kullanarak, 4 Akdeniz Demosponge türündeki gelişim dinamikleri çıkardılar. Nickel (2001,2003) ise, *Suberites domuncula* sünger türü üzerinde gerçekleştirdiği çalışmalarda uyguladığı metot, X-ray CT'nin (multidetector computer tomography) sünger vücut hacimlerinin belirlenmesinde kullanılabileceğini gösterdi (Şekil 2.7).

Süngerlerin *ex situ* kültürü için kullanılan bu metodun avantajları arasında; denizde karşılaşılan fırtınalar, sünger hastalıkları, mevsimsel verim düşüklüğü gibi problemlerin oluşmaması, besin ve biyoaktif metabolitlerin üretimi için gerekli olan moleküllerin kontrollü olarak canlıya sağlanabilmesi ve süngerdeki büyüme ve gelişmeyi artırabilme, olanakları sayılabilir ancak, bu sistemle 1 yıldan fazla sürekli bir kültür gerçekleştirilememiştir ve deniz süngerlerinin laboratuvar fareleri olmadığı çeşitli denemelerde görülmüştür ama artan miktarda araştırmacı denizin dışında kültüre etmede bazı ufak başarılar sağlamaktadır (Sipkema 2004).



Şekil 2.7 1) Tüm büyüme koşullarının kontrollü olduğu kapalı kültür sistemi, Institute of Biochemical Eng./Stuttgart University, soldaki fotoğraf 2) *Suberites domuncula* sünger türünde büyüme gelişimini 3D computer tomography yöntemiyle izlenmesi, sağdaki şekil (Nickel 2001, 2003).

2.5.3 Hücre ve Primmorph Kültür

Uzun dönemli sünger yetiştiriciliği çalışmalarında kaydedilen düşük başarı oranlarından dolayı, in-vitro sünger kültürleme çalışmalarının çoğunluğu, kısa dönem, küçük ölçekli

denemeler tarzında yapılmış, bu çalışmalar sünger biyokütlesini artırmak için değil de temel sünger biyolojisini anlamaya yönelik olmuştur. Bu alandaki ilk *in vitro* deneysel sünger araştırmacılarından Wilson, (1907) yumurtalardan fonksiyonel süngerler yetiştirilmesini tarif etmiştir. Wilson çalışmalarında, *Microconia prolifera* dokularını, hücreleri ayırmak için ince bir ağ ile sıkmaktaydı. Salıverilen hücreler yeniden bir araya gelip işlevsel kanal sistemleri olan küçük süngerler bir haftada oluşmuştu. Bu süngerler akvaryum ortamında birkaç hafta barındırılabilirdi (Osinga et al. 1999). Wilson sünger hücrelerinin ferdi olarak yeniden canlanarak yeniden bir sünger oluşturabildiklerini tespit etmişti (totipotent) ve hücre kültürüyle homojen, kontaminasyonlardan arındırılmış bir sünger popülasyonu oluşturulabileceği düşüncesindeydi.

2.5.3.1 Hücre Kültürü

Wilson'ın yaptığı çalışmaların ardından süngerlerin ayrılma ve yeniden bir araya gelebilme fonksiyonları geniş bir şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmalarda genellikle 2 ayrı yöntem hücreleri yapay yöntemlerle ayırtmada kullanılmaktaydı; 1) Wilson tarafından önerilen mekanik metot ve 2) magnezyum ve kalsiyum içermeyen yapay deniz suyu ile kimyasal ayırım. İkincil metot Ca 2+ iyonlarının hücreden hücreye yapıştırma işleminde oynadıkları önemli role dayanmakta idi (Müller 1982). Elde edilen hücre süspansiyonları *in vitro* kültür ortamına başlangıç teşkil edebilecek küçük sünger bütünlüğü oluşturmakta kullanılabilmekteydi. Yoğunluk farkı kullanarak sünger hücre ayırımı teknikleriyle birleştirilmiş yapay sünger hücre ayırımı, (De Sutter ve Van de Vyver 1977, De Sutter ve Tulp 1981) sünger hücre kültürü için birincil hücre pasajları oluşturmak içinde kullanılmaktaydı. Kullanılan bir başka kısa dönem küçük ölçekli tatlı su sünger yetiştirme metodu ise Ankel ve Eigenbrodt (1950)'un sandviç metoduydu. Yeni oluşmuş gemmulardan (genellikle tatlı su süngerlerinde bulunan yumurta benzeri redüksiyon gövdeleri,) alınan genç süngerler, cam ayraçlar veya tabakalar arasında yetiştiriliyorlardı. Bu yolla ince, neredeyse iki boyutlu süngerler elde edilmekteydi ve bunlar mikroskop altında incelenmeye elverişliydi. Bu yöntemin anatomik ve fizyolojik çalışmalarda kullanılabilecek önemli bir metot olduğu daha sonraları görülmüştür. Langenbruch (1983) bu metodu bir deniz türüne (*H. panicea*) uygulayan ilk kişiydi. Gemmulerin yerine 1mm küplük explantlar kültürlenmeyi başlatmak için kullanılmıştı.

Birincil hücre kültürleri, süngeri oluşturan ve büyük ölçüde ayrılmamış hücre kütlelerinin dağıtılmasıyla oluşturulmaktadır (Pomponi and Willoughby 1994, Ilan et al. 1996, Müller

et al. 1999b, De Rosa et al. 2003). Pomponi ve Willoughby tek hücre süspansiyonu ve ardından süngerden birincil hücre kültürü gerçekleştirebilmek için gereken basamakları detaylı olarak ele almıştır. Bu araştırmacılar üç konuyu, sünger dokusunun dağıtılması, seçici zenginleştirme ve antibiyotiklerin kullanımı ayırdılar. Prensipinde bu uygulama günümüzde de hemen hemen aynı şekilde uygulanmaktadır. Pomponi ve Willoughby (1994) temel bir sünger yetiştirme ortamı geliştirmiş, Ilan (1996) çok benzer bir protokol kullanarak farklı tür bir süngerden hücre pasajı elde etmeyi denemiştir. İki denemede de sürekli gelişen hücre pasajları oluşturmayı başaramamıştır. Daha yakın bir tarihte Pomponi (1997) üretimi ve proliferasyonu uyaran yeni çabalar gösterdi, bu çalışmada farklı büyüme faktörleri uygulanmasıyla hücre bölünmesinin başarıyla gerçekleştirildi. Ancak bu sünger hücreleri de sürekli büyüme gösteremediler ama aynı yayında kültüre edilmiş hücrelerden elde edilen ilk ikincil metabolizma ürünü rapor edildi. Bu kültür metodunu devam ettirerek memeli hücre kültürü ortamını temel alarak sünger hücreleri için daha gelişmiş bir büyüme ortamı geliştirildi (Willoughby ve Pomponi, 1994). Daha yakın zamanda ise, tek katmanlı sünger hücreleri kullanarak biyoaktif bileşiklerin *in vitro* kültürünün başarıyla uygulandığı çalışmalar yayınlandı (De Rosa et al. 2001).

Şu güne kadar, herhangi bir deniz omurgasızına yönelik, proliferasyonla sonuçlanan ve üretim sağlanan hücre pasajlarının elde edildiği uzun dönemli *in vitro* hücre kültürü gerçekleştirilememiştir (Rinkevich 1999). Hücre kültürüne yönelik bir diğer zorluk ise sünger hücrelerinin süspansiyondaki kontamine edici hücrelerden ayrılabilmesinin zor olmasıdır. Geçmişte protozoa ve thraustochytrides, sünger hücresi olduğu zannedilerek yetiştirilmiştir (Klautau et al. 1994, Custodio et al. 1995, Rinkevich 1999). Kontaminasyonu önlemek ve kültüre edilen hücrelerin düzenli olarak güvenilirliğin onaylanması için DNA metotlarıyla test edilmesi veya spesifik metabolitlerin varlığının analizi gerekmektedir (Pomponi et al. 1997). Bazı birincil hücrelerin hem önce hem de uyarılmış hücre bölünmesinin ardından ilgilenilen metabolitleri ürettikleri Pomponi tarafından gösterilmiştir ancak, süspansiyondaki birincil sünger hücreleri bölünme için uyarılabilmesine rağmen çoğalma birkaç bölünme evresinin ardından durmaktadır (Pomponi et al. 1997). Hücre bölünmesinin devamlılığının sağlanamaması, kültüre edilmiş hücreleriyle metabolit üretiminin önünde önemli bir engel olarak durmaktadır. Doğada süngerler 1500 yıldan fazla yaşayabilmektedir. Bu uzun yaşam, bu canlıların sergilediği yüksek telomeraz aktivitesiyle örtüşmektedir. Kümelenemeyen hücrelerin uzun yaşayamaması muhtemelen, proliferasyon yeteneğinin mümkün kılan hücre-hücre kontağı

gerekliliğidir. Koizol et al. (1998) *S. domuncula* ve *Geodia cydonium* sünger türlerinin hücre birlikteliklerinin yüksek telomeraz aktivitesine bağlı olarak yüksek bir proliferasyon yeteneğine sahip olduklarını gözlemlemiş, fakat bir araya gelemeyen hücrelerin hızlıca telomeraz aktivitelerini kaybettiklerini görmüştü.

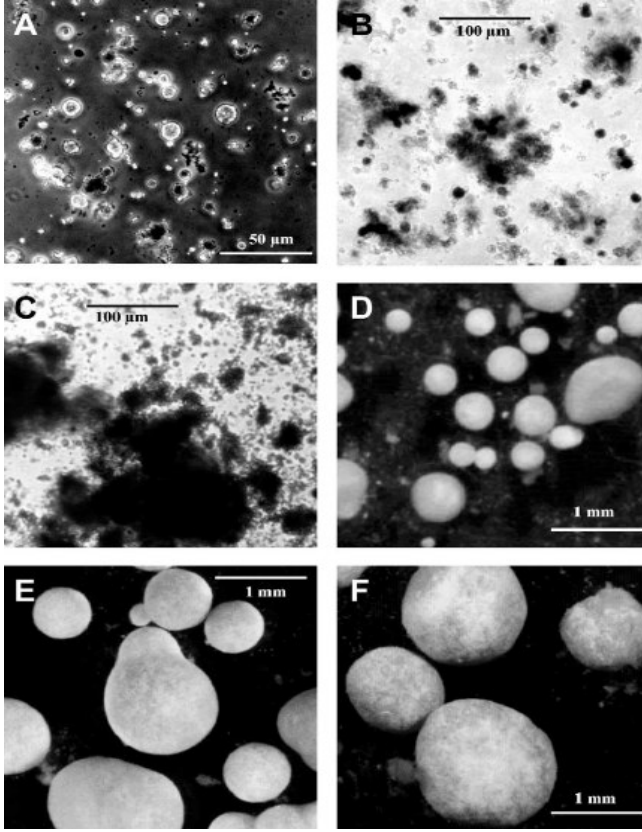
Eğer sünger hücrelerinin sürekli kültürleri oluşturulabilir ve istenilen metabolitleri ürettikleri kanıtlanabilirse, hayvan hücreleri için oluşturulmuş biyoreaktörlerde yetiştirilmeleri mümkün olabilir (Spier et al. 2000). Şu anda ticari hayvan hücre kültüründe kullanılan biyoreaktörlerin oluşturulması konularına yönelik bütün noktaların sünger hücreleri içinde elden geçirilmesi gerekmektedir (Chisti 2000,2001). Ticari mikrotaşıyıcılara çapalanmış sünger hücre kültürleri en az bir sünger türü için başarıyla gerçekleştirilmiştir. Yapay matrislerdeki sünger hücrelerinin hareketsiz hale getirilmesi Wijffels tarafından (2001) denenmiştir ve bir miktar proliferasyon en azından az bir zaman için gözlemlenebilmiştir.

2.5.3.2 Primmorph Kültür

Primmorphlar, süspansiyon kültürde birincil hücreler tarafından üretilen organize, genellikle küresel, kümelenmiş hücrelerdir. Birincil hücrelerin kültürü genellikle saatler içinde aggregatları ve günler içinde primmorphları oluşturur (Zhang et al. 2003a). Süngerin türüne bağlı olarak primmorphlar 40µm den 3mm büyüklüğe kadar olabilmektedirler. Primmorphlar uzatılmış açlığa dayanabilmektedirler (Şekil 2.8).

Disosiye olmuş sünger hücrelerinin aksine primmorphlar, telomeraz aktivitesine sahiptirler. Eğer sünger simbiyotlarının varlığında oluşurlarsa, simbiyotik organizmalar primmorphlarda da görülür. Buna karşılık, süspansiyonda bulunması muhtemel olan hücresel atıklar ve simbiyotik olmayan mikroorganizmalar, aggregatların oluşması aşamasında primmorphların dışında kalabilir. Gelişmiş sünger hücrelerinin karakteristiği olan metabolitlerin bazı primmorph kültürlerinde de üretildiği gözlemlenmiştir (Müller et al. 2000). Primmorphlar, günümüze kadar birçok sünger türünden üretilmiştir. Süngerlerden sürekli gelişen hücre kültürleri geliştirilememesinin sebebi, hücrelerin tek hücre süspansiyonu içerisinde dağılma esnasında hızlı bir şekilde telomeraz aktivitelerini kaybetmesi (Koizol et al. 1998) olabilir ve bu sebepten ötürü, sünger hücrelerin proliferasyonu sağlayabilmek için hücre-hücre kontağına ihtiyaç duyduklarını düşünülmektedir. Bu bilgilerin ışığında, üç boyutlu çok hücreli aggregatlara dair

bilinenlerle ve süngerlerin yeniden kümelenme alışkanlıklarına dayanarak primmorph kültür sistemi diye adlandırılan çok hücreli sünger organizma metodu geliştirilmiştir. (Custodio et al. 1998, Müller et al. 1999a,b, Nickel et al. 2001).



Şekil 2.8

Stylissa massa sünger hücrelerinde primmorph oluşumu, A) Hücre süspansiyonu 2×10^6 hücre/ml B) İnkübasyondan 15 dk sonra hücre agregatları C) 1 saat sonra D) Ufak primmorphlar, 7. gün E) 11. gün F) 14. gün

Primmorphlar olumsuz çevre koşulları, açlık gibi durumlarda canlının bu dönemleri atlamasını sağlamak amacıyla süngerin kendisi tarafından üretilen yuvarlak şekilli küçük süngerçiklerdir.

Fiziksel strese olan dayanıklılıkları primmorphlardan ekstraksiyon sıvısı yardımıyla sağlanması için yararlanılabilir. Ancak metabolitler bunlarda istenilen miktarlarda değildir

Bu metoda yönelik şüpheler arasında, primmorphlarda biyokütle artışı görülememesi ve bu oluşumların gelişme olmadan fonksiyonel bir süngere dönüşebileceğinin bilinmemesi yer almaktadır. Bu metodun özünde primmorphların fiziksel strese karşı oldukça dayanıklı olmaları ve uzun süreler yaşatılabilmeleri yatmaktadır. Eğer primmorphların yüksek miktarlarda üretebileceği düşünülen ikincil metabolizma ürünleri, talere edebildikleri bir ekstraksiyon sıvısı yardımıyla alınabilirse bu yöntem değerli olabilir. Ancak bu durumda ikincil metabolizmaların üretiminde önemli olan bazı spesifik substratların primmorphlar tarafından alınması gerekmektedir ve bunun içinde ikincil metabolizma yollarının anlaşılması gerekmektedir (Sipkema, 2004).

2.6 Sünger Biokütlesi İçin Alternatif Yöntemler

2.6.1 Kimyasal Sentez

Bu metot biyolojik kararsızlıklara ve bilinmezlere bağımlılığı yok ettiği için süngerlerden biyoaktif bileşiklerin üretimi için tercih edilen yöntem olabilme özelliğine sahiptir. Birçok sünger ikincil metabolizma ürünü bilimsel kullanım için kimyasal olarak sentezlenmiştir (Aiello et al. 1999, Faulkner 2001). Ancak çoğu ilginç sünger metabolizma ürünü oldukça kompleks yapılara sahiptir ve sentetik yollarla düzinelere bireysel reaksiyon basamağından oluşur. Ara-C bu yöntemle ticari olarak kendine raflarda yer bulmuş tek örnektir. Genellikle biyoaktif moleküllerin kimyasal sentezi için maksimum 30 basamak ekonomik olarak makul bir sayıdır. Ancak birçok sünger biyoaktif molekülü bu sayının çok üzerinde sentezlenebilmektedir buda kimyasal sentez yoluyla oluşturulan bileşiklerin raflarda yer almasını engellemektedir.

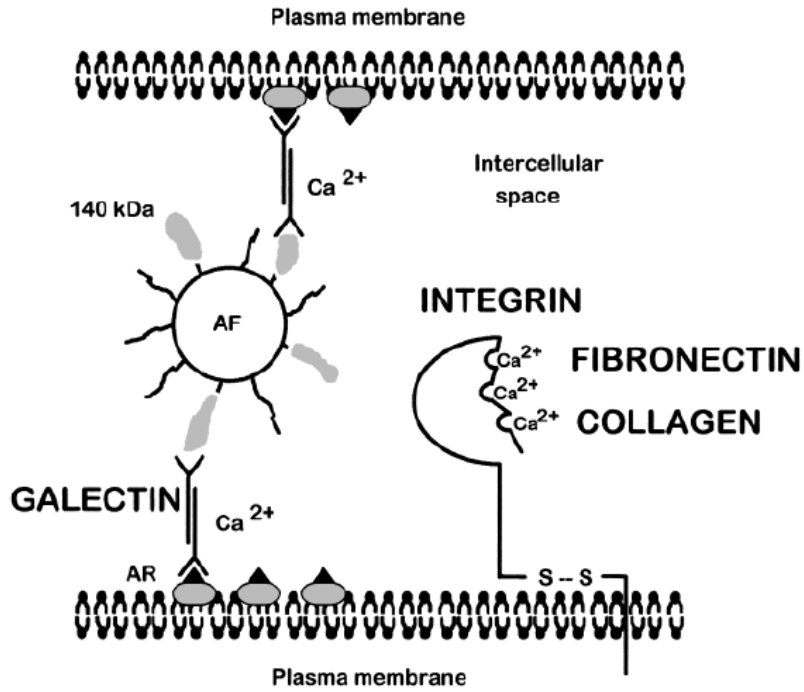
2.6.2 Genetik modifikasyon

İkincil metabolizma ürününün üretimiyle görevli DNA bölümünün hızlı büyüyen ve bu genleri fazlaca eksprese eden bir organizmaya aktarılması yüksek ürün konsantrasyonuyla sonuçlanabileceği için değerli bir yöntem olabilir (Sipkema 2004). Ancak buradaki problem, genellikle sünger metabolitleri tek bir gen transferiyle organizmada ekspresyonda başarı sağlanabilen proteinler değil, çoğunlukla kompleks ve bilinmeyen metabolik yolların ürünleridir. Ayrıca sünger metabolitlerinin çoğunluğunun hücre büyümesini engelleyici ve toksik özellikleri vardır bu yüzden taşıyıcı canlıya zarar verebilir. İlâveten bu yöntemin uygulaması şu ana kadar yapılmadığı için herhangi bir yorum belirtmek yanlış olabilir bu sebepten daha ileriki yıllarda ele alınabilecek bir yöntem olabilir.

2.7 Süngerlerde protein çalışmaları

Hücrel organizasyonlarının basit olması nedeniyle, süngerler çok hücreli canlılardaki yapışma (adhesion) mekanizmalarının incelenmesinde kullanılan ilk ökaryotik canlılar olmuşlardır. Süngerlerin esnek ve gevşek şekilde *mesohyl* içerisinde yer alması, hücrelerin yüksek hareketliliği, düşük özelleşme ve yüksek farklılaşma gibi bir takım karakteristik özelliklerinde ötürü hücrelerarası, hücre-matriks ilişkilerinin temel mekanizmaların incelenmesinde model canlılar olmuşlardır. Süngerlerde iki çeşit adhezyon sistemi bulunmuştur; hücrelerarası ve hücre-matriks, hücrelerarası adhezyon sistemi iki ana

yapıdan oluşur; intracellular kümelenme faktörü (AF) ve AF'ye bağlanmakta olan hücre yüzeyi ilintili kümelenme reseptörü (AR). İlk extracellular partikül AF'lerin *M. prolifera* (Henkart et al. 1973) ve *G. cynodium* (Müller ve Zahn 1973) süngerlerinde aynı yıl içerisinde bulunmasıyla beraber moleküler düzeyde hücre adhezyon moleküllerinin çalışması anlaşılmış oldu. AF'ler 90S çökeltme katsayısına sahip bir multiprotein kompleksidir (Şekil 2.9). Monoklonal antibodiler ve konfokal mikroskop vasıtasıyla AF'lerin bağlanma alanı incelenmiş ve bu bölgede çeşitli proteinlerine rastlanmıştır.



Şekil 2.9 *Geodia cynodium* süngerindeki AF dolaylı hücre tanınması. İki galectin proteinin AR vasıtasıyla plasma zarına bağlanması görülebilmekte. Bunun yanı sıra sünger, fibronectin ve collagen proteinleri ile ilişkide olduğu varsayılan bir integrin reseptörüne sahiptir (Müller et al. 1999).

2.7.1 Galectin proteini

Galectin proteini süngerlerdeki adhezyon sistemi ile ilişkili olan polypeptitlerden biridir, klonlanan ilk hücrelerarası adhesion molekülüdür (Pfeifer et al 1993) ve bu kompleksi zar bağımlı AR'ye bağlar (Wagner-Hülsmann et al. 1996). Sünger galectini 3 farklı sekans izo biçiminde bulunur; galectin, 36-kDA varsayılan AF ve 86 kDA AF bağımlı polypeptit (Müller 2003). Bu izo biçimlerin hepside çözülebilir ve zara bağımlı şekildedir. Çıkarılan bütün aminoasit sekanslarında aynı karakteristik karbonhidrat tanıma bölgesi vardır

LHFNPR-G-V-N-W-E-R[H]-PF ve bu bölge süngerlerden insanlara korunmuştur (Pfeifer et al 1993).

2.7.2 Kollajen proteini

Kollajen yalnızca Metozoa filumunda bulunan bir molekül olup 20 farklı tip kollajene sahip yüksek metozoa'larla kıyaslandığında süngerlerde yalnızca iki grup kollajen tanımlanmıştır.; lifsi kollajen ve tip IV ilintili kollajen (Garrone 1978). Elektron mikroskop çalışmaları göstermiştir ki, sünger kollajeni ince liflerden oluşmaktadır ve 20–25 nm çapındadır (Şekil 2.10). Lifler sıradan bant deseni sergilemekle beraber 60 nm periyot uzunluğunda ve üç periyot içermektedirler.



Şekil 2.10 *G. cynodium* süngerinden izole edilen kollajen demetlerinin elektron mikroskop görüntüleri, büyütme $\times 40,000$ (Garrone 1978).

Exposito ve Garrone (1990) kollajen cDNA'sını bir tatlı su süngerinden başarılı bir şekilde izole eden ilk kişilerdir. Yakın zamanda ise, *S. domuncula*'nın myotrophin büyüme faktörüne bir tepki olarak, kollajen geni ekspresse ettiği tespit edilmiştir (Schröder et al. 2000). *S. domuncula* kollajeninin izole edilmesiyle birlikte kısa bir 24G-x-y kollajen kümesinden ve üç kısımdan oluştuğu anlaşılmıştır; (1) kollajen olmayan N-terminal bölgesi [NC1] (2) iç kollajen bölgesi [COL] ve (3) kollajen olmayan C-terminal bölgesi [NC2]. Buna karşılık tatlı su süngeri *E. muelleri*'de iki iç kollajen bölgesinden ve 79 -x-y kollajen kümesinden oluştuğu anlaşılmıştır. İlginç olan bir nokta ise *P. jarrei* türünün

kollajen Tip IV ile benzerlikler gösteren bir kollajene sahip olduğunu anlaşılmıştı ki, bu tip kollajen omurgalıların temel membran kollajenidir (Boute et al 1996).

2.7.3 Fibronectin proteini

Fibronectinler yüksek molekül ağırlıklı glycoproteinler olup extracellular matriksin (ECM) ve kan plazmasının alışımlı elemanlarıdır. Sünger ECM'inin bir diğer ana bileşenin fibronectin proteini olduğuna dair kanıtlar edinilmiştir. Labat-Robert et al (1981) süngerlerin omurgalı fibronectini için geliştirilmiş antibodylerle çapraz-reakte olduğunu göstermiştir. Müller ve ekibinin *G. cynodium* proteinlerinin üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarda ise immünolojik olarak insan fibronectin antiserumu ile ters-reakte oldukları görülmüştür. Ana bantlar 230 ve 210 kDa boyutlarındaydı. *G. cynodium*'daki sonraki cDNA taramalarında üç varsayılan birimden oluşan bir proteine rastlandı: Tip III fibronectin birimi FN₃, sisteince zengin reseptör grup B ünitesi ve kısa consensus tekrarı olarak adlandırılan (SCR) tamamlayıcı kontrol proteini.

2.7.4 Integrin proteini

Integrinler hayvanlardaki muhtelif adhezyon ve sinyal işlemlerinde görev alıp geniş bir hücre yüzey reseptörleri ailesini kapsamaktadırlar. Omurgalılarda en az 20 farklı α, β heterodimerik integrini bulunmaktadır ve bunlar embriyonik morfogenez, lökosit migrasyonu, platelet aggregation ve hücre proliferasyonu, farklılaşması gibi işlemlerde önemli görevler üstlenirler. Bazı integrinler direk olarak transmembran proteinlerine bağlanmasına rağmen çoğunluğu ECM bileşenleridir (Brower et al. 1997). Her integrin homolog olmayan transmembran proteini α, β alt ünitelerine sahiptir ve takriben 100 kDa civarındadır (Hynes et al. 1992). *G. cynodium* ve *S. domuncula* süngerlerinde tanımlanan cDNA sekansları ve karakterizasyon işlemlerinin sonucunda ikisinin de integrin α alt ünitesi kodlamakta olduğu bulunmuştur (Pancer et al 1997, Wimmer et al. 1999). Filogenetik analizler sonucunda sünger integrinin α alt ünitesinin karşılık gelen sekanslarının omurgasız türlerinden *Drosophilla melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans* ile, omurgalı canlılardan ise; fare αV integrini, piliç αVII integrini ve insan fibronectin reseptör α alt ünitesiyle yüksek benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Buna ilaveten bu analiz sonucunda sünger sekansının önce iki omurgasız sekansından dallanmakta olduğu daha

sonra ise bundan üç omurgalı sekansının dallandığı çıkartılmıştır (Wimmer et al. 1999). Daha sonra ise bir sünger integrin reseptörü klonlanmıştır (Brower et al. 1997). Dejenere oligonükleotid primerler kullanılarak *G. cynodiu*m’da tanımlanan β -integrinin potansiyel açık okuma çerçevesinin 878 aminoasitten oluştuğu ve 95,215 kDa’luk polypeptit kodladığı görülmüştür. Ayrıca sünger β -integrinin üç karakteristiği olduğu görüldü: (1) epidermal büyüme faktörü benzeri birim sistince zengin desen işareti (2) transmembran segmenti ve (3) bir varsayılan Ca^{2+} bağlayıcı bölgesi (Wimmer et al. 1999). Brower et al’un(1997) bir deniz süngeri ve deniz mercanı kullanarak β -integrin üzerine gerçekleştirdiği çalışmada ise sünger β -integrinin insan $\beta 1$ integrini ile %49 benzer, %38 identik olduğunu tespit etti.

Çizelge 2.3 Integrin β alt ünitesi aa sekanslarının karşılaştırılması. Üstteki sayılar % benzerlik, alttaki sayılar % aynılık. Sağdaki şekil, türler arası β alt ünite sekansı ilişkilerini gösteren ağaç (Brower et al. 1997).

	Mercan β_{Co1}	Solucan β_{Pat3}	Kerevit β	Sinek β_{PS}	Deniz Kestanesi β_G	İnsan β_1
Sünger β_{PO1}	48 38	45 35	45 37	43 35	44 35	49 38
Mercan β_{Co1}		51 41	48 42	48 41	51 43	54 45
Solucan β_{Pat3}			50 41	55 47	51 42	53 43
Kerevit β				54 44	50 41	52 43
Sinek β_{PS}					54 46	54 47
Deniz Kestanesi β_G						54 45

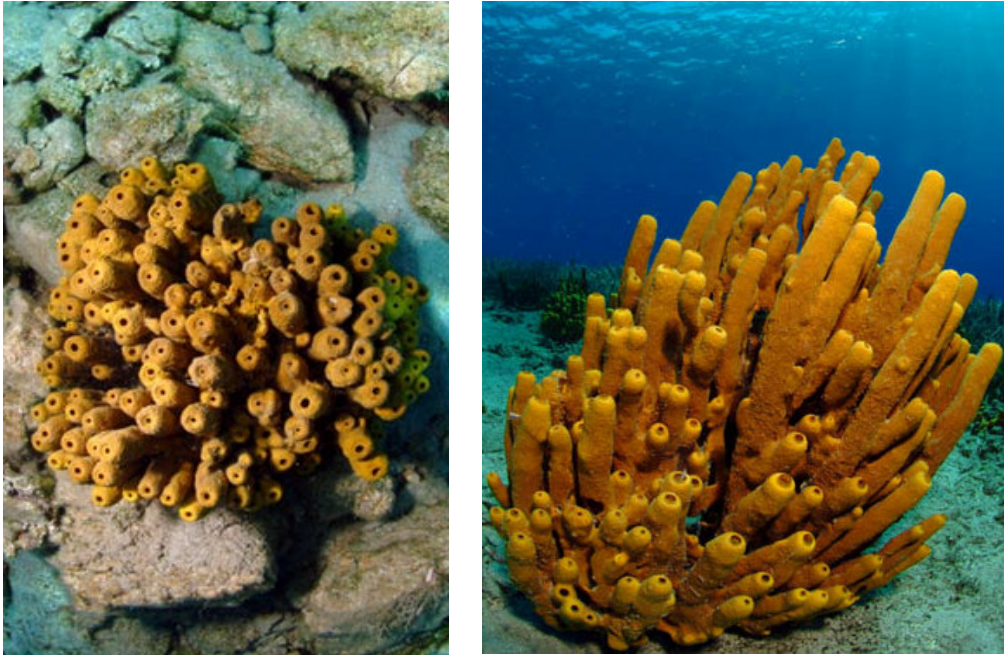
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 MATERYAL

3.1.1 Kullanılan Sünger Materyali

3.1.1.1 *Aplysina aerophoba* (Schmidt 1862)

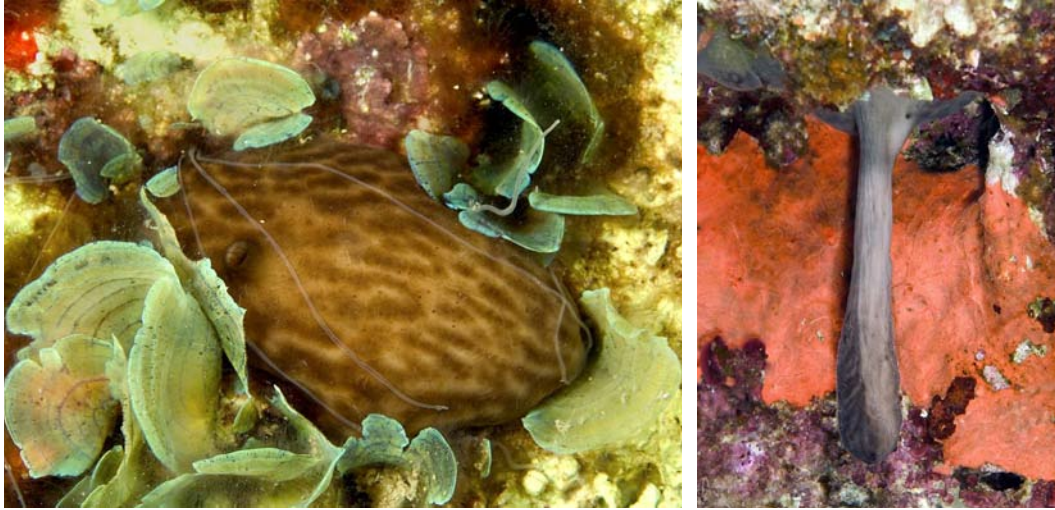
A. aerophoba türü (Schmidt 1862- Aplysinidae familyası, Verongida takımı) Akdeniz-Atlantik'te bazı bölümlerinde sık rastlanabilen bir sünger türü olup, güneş ışığının rahatlıkla erişebildiği aydınlık derinliklerde (5–25 m) görülebilmektedir. *Aplysina* cinsine ait süngerler etli, yumuşak, temelinde birleşmekte olan birçok dikey tüpçükten oluşmakta ve aynı zamanda silika iskeletinden yoksundurlar. *A. aerophoba* süngerinin rengi açık sarı olup yüzeyindeki dokularda barınan cyanobakterilerden ötürü yeşilimsi kırmızımsı bir tona sahiptir. *A. aerophoba*'nın üzerinde bulunan bakterilerin çoğunluğu extracellular olarak mesohyl matriksinde lokalize olmaktadır ve sünger biokütlesinin %38'ini oluşturmaktadırlar (Vacelet 1975). Su üstüne çıkarıldıklarında mürekkekbimsi bir sıvı çıkartan bu süngerler, ürettikleri ikincil metabolizma ürünleri nedeniyle çeşitli bilim çevrelerinin yoğun ilgisini çekmektedirler. Barselona (1995) sözleşmesi gereğince nesli tükenmekte olan türler arasında yer alan süngerin kendisine çok benzeyen ancak daha derinlerde, karanlık kovuk mağara ortamlarında yaşamakta olan *A. cavernicola* adlı yakın bir akrabası vardır.



Şekil 3.1 *A. aerophoba* türü sualtı görüntüleri, (Can 2005)

3.1.1.2 *Chondrosia reniformis* (Nardo 1833)

C. reniformis türü (Hadromerida takımı, Chondrillidae ailesi) Akdeniz-Atlantik'te 5 ila 30 metreler arasında çok sık bulunan bir sünger olup, genellikle çıkıntılıların altındaki loş yerleri, düz duvar yüzeylerini ve duvarlardaki delikleri tercih eder. Genellikle kahverengi tonlarında olan ve desenli bir yüzeye sahip olan bu tür aldığı ışık azaldıkça rengi kararır, pürüzsüz ve parlak yüzeyi dokunulduğunda kaygan ve lastiksidir. Tipik sünger iskelet yapısı olan spiküller ve spongin lif *C. reniformis*'te bulunmaz, onun yerini kollajen lif alır. Yakın zamanda barındırdığı kollajenin miktarından ve kolay yetiştirilebilmesinden ötürü Akdeniz'de akvakültür ve *in vitro*/primmorph kültür çalışmalarının odağı olmuştur. En önemli özelliklerinden biride yakınlarda atlayabilecek bir çıkıntı, kaya veya kumul bulursa kendini uzatıp bu bölgeden yayılma özelliğine sahiptir. Bu özelliğini etrafını saran diğer türlerin yoğunluğundan ötürü süngerin zaman içerisinde kazandığı bir yetenek olabilir.

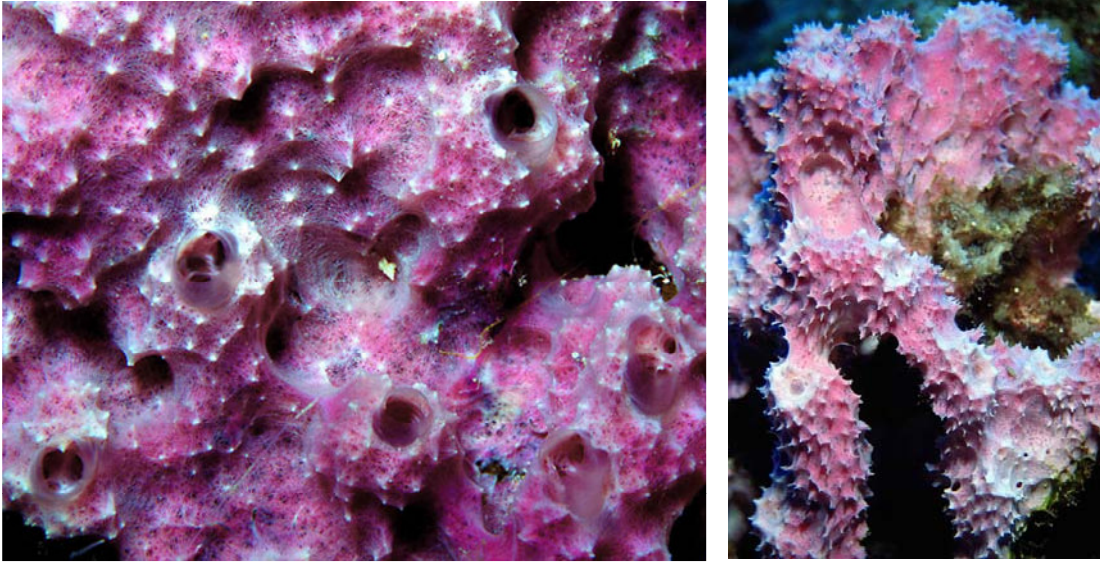


Şekil 3.2 *C. reniformis* türü sualtı görüntüleri, (Can 2005)

3.1.1.3 *Dysidea avara* (Schmidt, 1862)

D. avara türü, (Dendroceratida takımı Dysideidae ailesi) Akdeniz'de ve Atlantik'te rastlanan bir tür olup, kayalık zeminleri, çatlak, kovuk, kayalık altı gibi nispeten daha karanlık noktaları yaşam alanı olarak tercih etmektedir. 20 metrelerden itibaren rastlanmakta olup kaya üzerine yayılan (encrusting) süngerlerdendir. İskelet yapısını diğer yayılımcı süngerlerde olduğu gibi silika spiküller oluşturur. Rengi aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere pembe tonlarıdır ve yakından bakıldığında çok ilginç yüzey şekillerine

sahiptir. Anti-Aids özellik gösteren Avarol bileşiminin bulunmasının ardından bu tür çok yoğun ilgi görmüştür. Daha sonraki araştırmalarda avarol bileşiminin hem *in vitro* hem de *in vivo* olmak üzere biyoaktivite gösterdiği tespit edilmiş, sitotoksik, anti tümör, anti bakteriyel, antiviral özelliklere de sahip olduğu görülmüştür (Müller et al, 1985b; Seibert et al, 1985; Sarin et al, 1987). Ayrıca Schröder et al, (1991) avarolun lökotrien ve prostoglandin yollarına olan etkisini de göstermiştir. *D. avara* sergilediği bu çok yönlü medikal potansiyelden ötürü hem *in vitro* hemde akvakültür çalışmalarının açısından önemli bir türdür. Alman araştırmacılar bu türü primmorph kültürlenme çalışmalarında kullanmakta olup Hollanda’da ise bu türün hem hücre kültürü hem de akvakültür/biyoreaktör çalışmaları devam etmektedir. Avarol bileşiği nedeniyle bu türün ticari olarak yetiştirilmesi Klinifarm isimli Alman şirketi tarafından Yunanistan’ın Mykonos adasında yapılmaktadır (Osinga 2005, sözlü görüşme).



Şekil 3.3 *D. avara* türü sualtı görüntüleri, (Can 2005)

3.1.1.4 *Axinella polypoides* (Schmidt, 1868)

A. polypoides türü (Axinellida takımı, Axinellidae ailesi) Akdeniz ve Atlantik’te sığ derinliklerden (20-100m) başlayarak görülebilmektedir. Kayalık ve kumul zeminlerde, resiflerin üzerinde ve etrafında yaşamayı seven bu tür Barselona Sözleşmesine (1995) göre nesli tükenmekte, Bern antlaşmasına göre ise Koruma altında olan türler arasındadır. Gövdesinden çıkan çok sayıda çeşitli büyüklükte daldan oluşmakla beraber rengi sarı tonlarındadır. İskelet yapısını silika spiküller ve spongin fibrilleri oluşturur.



Şekil 3.4 *A. polypoides* türü sualtı görüntüleri, (Can 2005)

3.2 YÖNTEM

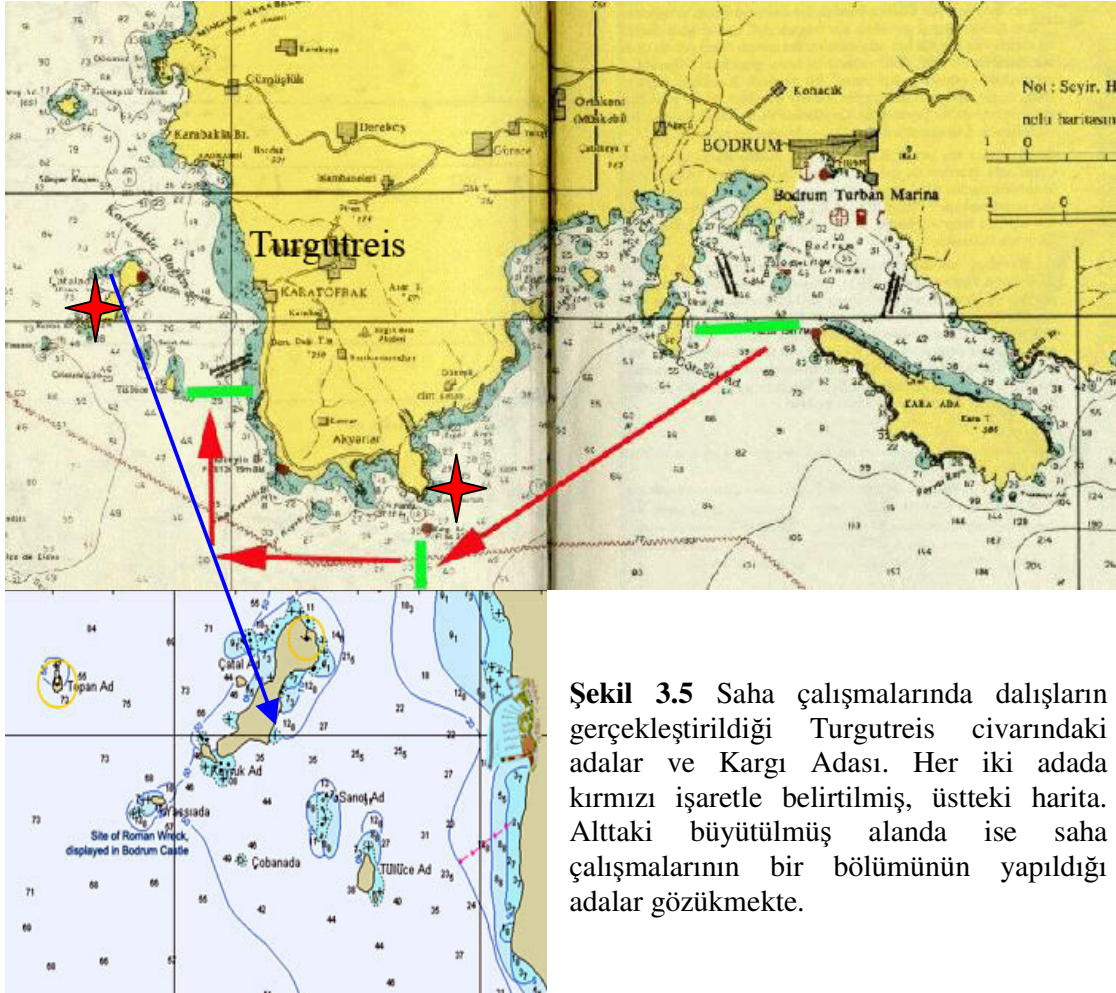
Araştırma kapsamında, çeşitli kıyı bölgelerindeki biyoteknolojik potansiyeli olduğu düşünülen sünger türleri örneklenmiş, görüntülenmiştir. Mikroskobik incelemeler ve moleküler genetik çalışmaları için iki farklı şekilde örneklenmesi gerçekleştirilmiş olan deniz süngerleri elimizdeki olanaklar dahilinde en hızlı biçimde, protein yapıları zarar görmeden laboratuvarlarımıza transfer edilmiştir.

3.2.1 Saha Çalışmaları

Bu çalışma için kullanılacak sünger türlerinin örneklenmesi için saha çalışmaları, sünger popülasyonu, lojistik destek, dalış olanakları ve bölgenin sualtı yapısına yönelik bilgiler, güvenlik, gibi faktörler dolayısıyla Muğla ili Turgutreis ilçesindeki adalarda ve Akyarlar Köyü-Kargı Adası'nda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).

Ayrıca bu dalış sahasının seçiminde, bu bölgede daha önce gerçekleştirilen dalışlarda bu türlere rastlanmasının ve bölgenin geçmişte uzun seneler süngercilikle geçimini saptayan bir süngerci kasabası olmasının büyük etkisi oldu. Yöre halkının bölge hakkındaki eşsiz sualtı bilgilerinden yararlanma düşüncesi de bölge seçimindeki bir diğer etkendi ve bu seçimin doğruluğu zamanla görüldü. Bölge kıyılarının maruz kaldığı oldukça yoğun yazlık ev ve turistik tesis baskına rağmen, bu kıyılarla İstanköy Adası/Yunanistan arasında

bulunan güçlü Kos akıntısı dolayısıyla temiz kalmış olduğunu dalışlarda gözlemlenebildi. Bütün bir yıl boyunca devamlılığını sürdüren Kos akıntısının deniz sirkülasyonuna ve suların temizliğine olan katkısının yanında, getirmiş olduğu partiküller neticesinde oldukça zengin bir sualtı ekosistemine, süngerler ve diğer bentik canlılar açısından çeşitliliğe neden olabileceği de ifade edilebilir. Mikroskobik ve moleküler genetik çalışmalarında kullanılan tüm süngerler Turgutreis Adalar ve Kargı Adası'nda yapılan dalışlarda örneklenmiştir. *C. reniformis* türü hemen hemen tüm Akdeniz kıyılarında ve sığ derinliklerde görülebilen,



Şekil 3.5 Saha çalışmalarında dalışların gerçekleştirildiği Turgutreis civarındaki adalar ve Kargı Adası. Her iki adada kırmızı işaretle belirtilmiş, üstteki harita. Altta ki büyütülmüş alanda ise saha çalışmalarının bir bölümünün yapıldığı adalar gözükmemekte.

kaya yüzeylerinde kolay tespit edilen bir tür olduğu için bu türe oldukça kolay ulaşıldı. *A. polypoides* türü 20'li metrelerden başlayarak derinlere doğru görülebilen bir tür olarak resiflerdeki kayaların üzerinde ve etrafında rastlandı ve bu türün bu bölgedeki popülasyonunun oldukça yoğun olduğu görüldü. *D. Avara* türünün bu bölgedeki dağılımının seyrek olduğu 20 metrelerden başlayarak kaya yüzeylerinde, çatlaklarında olduğu görüldü.

Ancak 30 metreler civarındaki bazı noktalarda büyük alana yayılmış sağlıklı bireylere ve topluluklara rastlandı. *A. aerophoba* türünden yalnızca bir birey tek bir bölgede görülebildi. Bu türe Bodrum Yarımadası'nın kuzey tarafındaki balık çiftlikleriyle dolu kumul alanlarda sıkça rastlanması, nispeten serbest partikül yoğunluğu daha yüksek olan ve akıntıları daha sakin suları tercih ettiği düşüncesini ortaya koydu.

3.2.2 Süngerlerin Örneklenmesi ve Taşınması

3.2.2.1 Sualtı Örnekleme

Sünger örnekleme, Temmuz 2005 ve Mart, Nisan 2006 tarihleri olmak üzere 3 kez yapılmıştır. Örnekleme çalışmaları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Örnekleme daha önce deniz canlıları, dalış ortamı açısından bilinen, tecrübe sahibi olunan noktalar dan seçilmiştir. Güvenlik, lojistik, ulaşım, ekipman desteği, mevsim ve sünger yoğunluğu gibi faktörler değerlendirilerek aşağıdaki çizelgede verilen dalış noktaları seçilmiştir. Örnekleme derinlikleri hedeflenen süngerlerin bulunma sıklığı, dalış ekibinin ekipman olanakları ve tecrübeleri doğrultusunda planlanmıştır. Dalışların güvenli yapılabilmesi için sualtı kalış süreleri ve derinlikleri dalış cetvelleri yardımıyla belirlenmiş ve güvenliği artırmak için dalış bilgisayarları kullanılmıştır. Telsiz, ilk yardım üniteleri, acil durum oksijen tüpü ve diğer acil durum olanakların ötürü bütün dalışlar, dalış merkezi vasıtasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmanın sualtı çalışmalarında kullanılan tüm dalış malzemeleri dalış merkezinden sağlanmıştır.

Çizelge 3.1 Saha Çalışmaları

Saha çalışması	Örnekleme Bölgesi	Derinlik	Dalıcı ve dalış sayısı
2-4 Temmuz 2005	Bodrum/ Turgutreis - Akyarlar	15-35m arası	2 / 4
18-19 Mart 2006	Bodrum/ Turgutreis - Akyarlar	10-35m arası	2 / 4
14-19 Nisan 2006	Bodrum/ Turgutreis - Akyarlar	20-40 m arası	3 / 4

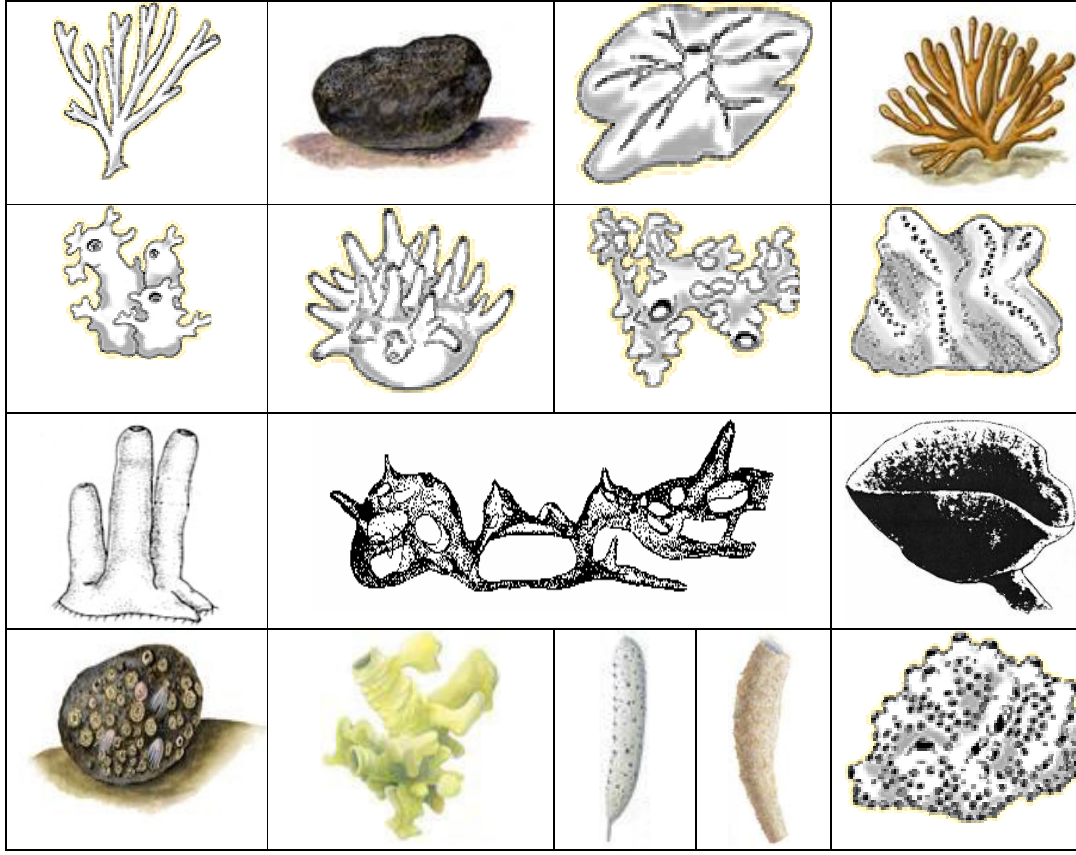
Örnekleme için literatürde var olan sualtı örnekleme metotlardan yararlanılmıştır (Katagan et al. 1991; Mac Millan 1996, Osinga et al. 1999). Hedeflenen süngerlerin örnekleme için, dalıcılara tehlike oluşturmayacak dalış noktalarındaki, sağlıklı görünümde olan bireyler seçilmiştir. Diseksiyon esnasında çevredeki diğer süngerlere ve

deniz canlılarına en az miktarda zarar verecek şekilde, incelemeler için yetecek kadar, ama canlının sağlıklı olarak idame ettirmesini engellemeyecek şekilde örnekleme yapılmıştır. Süngerlerin, totipotent, kendilerini yenileyebilen canlılar olmalarından ötürü, diseksiyon esnasında canlıya zarar vermemek ve enfeksiyon kapma ihtimalini en aza indirmek için temiz ve keskin diseksiyon aletleri kullanılmış, kesimler tek seferde gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri sünger vücudundan çalışmalarda kullanmaya yetecek miktarlarda kesilmiştir. Süngerlerin vücut yapıları ve üzerinde yaşadıkları materyel çok çeşitli olduğu için diseksiyon için çeşitli aletler kullanılmıştır. Bazı ufak/encrusting tipte süngerler substratlarıyla beraber alınmıştır. Uzun ağaç biçimli olanların dal uçlarından, yuvarlak olanlardan üçgen biçimli parçalar alınmış, osclulum bölgeleri dışa doğru çıkıntılı olanların ise bu bölümleri kesilmiştir. Kesilen bölgeler proteinlerin daha yoğunlukta olduğunu bildiğimiz, süngelerin uç kısımlarından seçilmiştir. Kesilen parçalar, basınçtan ötürü çatlama ve örneklerin stres altına girmemesi için daha önce deniz suyuyla doldurulmuş olan 15 ml ve 50 ml lik plastik tüplerin içerisine sualtında yerleştirilmiştir. Daha sonraki tanımlamalara yardımcı olması açısından, kesim öncesinde ve sonrasında çeşitli açılardan süngerlerin fotoğrafları alınmış, örneklenen süngere ait örnekleme derinliği, renk, koku, büyüklük, ortam, sıcaklık vs.. bilgiler sualtı yazı slaytlarına kaydedilmiş ve hemen günün sonunda bilgisayar ortamına aktarılmıştır.

Mikroskobik incelemeler, moleküler genetik çalışmaları için yapılan örneklemelede kesilen parça büyüklükleri histolojik incelemelerde kullanılacak boyutlarda belirlenmiş olup aynı sünger türünden birkaç kez incelenebilecek büyüklükte parçalar alınmıştır.

3.2.2.2 Örneklerin Laboratuara Taşınması

Örnekleme için yapılan her bir dalışın ardından, teknede bulunan destek ekibine bu örnekler teslim edilmiş ve fotoğraflama işlemlerine geçilmiştir ve deniz suyu içerisindeki tüplerden özenle çıkarılan parçalar yüzeyde bir kez daha fotoğraflanmıştır. Sünger doku örnekleri, sünger yoğunluğu tespit edilen bölgelerden çıkarılması ve örnekleme aşamalarında proteinlerde herhangi bir değişiklik meydana gelmeyecek biçimde korunabilmesi için ayrıca örneklerin toplanması ve işlemde geçirilmesi birkaç günü alabildiğinden, örneklerin içerisindeki proteinlerin her tür değişikliğe karşı sabitlenmesi gerekli görülmüştür. Bu sabitleme işleminin gerçekleştirilebilmesi içinse, mikroskobik incelemeler için toplanan parçalar, yüzeyde 80% etanol içeren 15ml ve 50ml lik plastik



Şekil 3.5 Süngerlerin tiplerine ait bazı örnekler

tüplerin içerisine yerleştirilmiş ve başka bir işlem uygulanmadan bu şekilde transfer edilmiştir. Moleküler genetik çalışmaları için örneklenen parçalar ise yüzeye getirildiği tüpler içerisinde bırakılıp bu tüpler protein ve diğer elzem yapılarının etkilenmemesi amacıyla buzla doldurulmuş soğutma amaçlı kullanılan köpük kutular içerisine yerleştirilmiştir. Daha sonra bu örnekler Ankara'daki laboratuarlarda çalışmalara tabi tutulmak üzere seri bir biçimde transfer edilmişlerdir. Labarotuara getirilen moleküler genetik çalışmalarında kullanılacak örnekler ise ekstraksiyon işlemine kadar dondurucuda - 20 derece sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir (Brower et al. 1997).

3.2.3 Histolojik Yöntem

Histolojik incelemeler için örneklenen süngerlerden, *Aplysina aerophoba*, *Dysidea avara*, *Chondrosia reniformis*, *Axinella polypoides* türleri kullanılmıştır. Daha öncede belirtildiği üzere seçilen süngerlerin her birinin farklı özellikleri (yüzey şekilleri, en, boy, kalınlık,

osculum adedi, osculum şekli, üzerinde bulunduğu substrat, sertlik) olduğu için, her biri farklı şekillerde sualtında örneklenmiştir. Örneğin *A. aerophoba* türünde osculumun bulunduğu çıkıntının ilk 4–5 cm'si, *C. reniformis* türü için osculumun bulunduğu düz yüzeyi içine alacak 2-3cm kenarlı bir kare ve 3–4cm içeriye derinlik gibi. Transfer edilen parçalar laboratuara getirildikten sonra ileriki histolojik uygulamalar için birkez daha diseke edildi (1x1 cm ebatları) ve tekrar %80 etanole konuldu.

3.2.3.1 Kriyokesit Yöntemi

- Kesitler %50'lik etanolde 1 saat bekletildi. *C. crambe* ve *C. reniformis*'in battığı ancak *A. aerophoba*'nın batmadığı, içerisine alkolün tam olarak nüfuz etmediği gözlemlendi.
- Bu türü batırabilmek için vakum işlemi yapıldı, yavaş yavaş hava kabarcıklarının çıktığı ve süngerin battığı görüldü.
- Kesitler %50'lik etanolde ikinci kez 1 saat bekletildi, kesitlerin tümü battı.
- %30'luk Etanolde 1 saat bekletildi. *A. aerophoba* yine tam olarak batmadı. Bu türe bir kez daha vakum işlemi uygulandı ve batırıldı.
- %30'luk Etanolde 1 saat daha bekletildi.
- Kesitler 2 saat suda bekletildi.
- Kesitler önce %20'lik sukroz solüsyonunda, sonrasında %30'luk sukroz solüsyonunda batana kadar bekletildi.
- Doku kesitleri kriyomatrikse (Shandon, USA) gömüldü. Üç tür süngerden alınan toplam 5 kesit -20 dereceye donduruldu, her türden 20 şer tane 10-12 µm kalınlığında dilim Cryomicrotome cihazı (Shandon, USA) ile dilimlendi, cam preparatlara 2 şer tane doku gelecek şekilde konuldu ve oda sıcaklığında bekletildi (Barthel ve Raymond 1990).

3.2.3.2 Boyama

3.2.3.2.1 Hemotoksilin-Eozin

Öncelikle, kriyokesitleri alınan sünger örneklerinin genel yapısının tarafımızdan anlaşılabilmesi için Hemotoksilin-Eozin (Hein 1981) boyası uygulandı.

- Kriyomatriksi eritmek için preparatlar 1'er dakika suda bekletildi.
- Preparatlar hemotoksilinde 1'er dakika bekletildi.

- Su ile yıkandı.
- Eozinde 2-4 dakika bekletildi.
- Daha sonra preparatlar su ile tekrar yıkandı.
- Sırasıyla 75, 96 ve 100% lük alkollerden hızlıca geçirildi.
- Ksilol içerisinde bekletildi.
- Ve son olarak preparatlar entellanla kapama yapıldı.

3.2.3.2.2 Mallory Azan Boyası

Kesitlerdeki kolajen lifleri göstermek amacıyla kesitler Mallory Azan (Heidenhein 1905) ile boyandı.

- Kriyomatriksi eritmek için preparatlar 1 er dakika suda bekletildi.
- Preparatlar 1 saat Azokarmin G içerisinde ve 60 derecede Etüvde bekletildi.
- Anilin Alkol (2sn) ile dekolarize edildi.
- Asit Alkol (2sn) ile dekolarize edildi.
- Heidenhein mavisi içinde bekletildi (10dakika).
- Dereceli alkollerden geçirildi.
- Ksilolde içerisinde bekletildi (30 dakika).
- Entellanla kapama yapıldı, ardından preparatlar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

3.2.3.2.3 İmmünfluoresan Boyama

Türlerden elde edilen kriyokesitlere tip I kollajen (Sigma, ABD), tip II kollajen (Labvision, ABD), tip IV kollajen ve β -1 integrine (Chemical Credential, ABD) karşı farede geliştirilmiş monoklonal antikorlar fosfat tamponlu salinle (PBS, Phosphate Buffer Saline) 1:50 dilüe edilerek uygulandı. Sekonder antikor olarak Cy3 GAM (fareye karşı keçide geliştirilmiş antikor - Sigma, ABD) PBS'te 1:100 dilüe edilerek kullanıldı. Çekirdekleri görüntülemek amacıyla Sytox Green (Molecular Probes, ABD) 2x SSC'de (Sodium Chloride, Sodyum Citrate) 1:300 dilüe edilerek kullanıldı. Preparatlar 5 mg/ml Hoechst (Sigma, ABD) içeren 1:1 PBS/gliserol karışımıyla kapatıldı.

- Dokuların çevresi konulan sıvıların taşmasını engellemek için hidrofobik kalem ile çevrelendi.

- Çevrelenen dokuların üzerine bütün dokuyu kaplayacak biçimde PBS damlatıldı. Dokular PBS'te iki kez üçer dakika bekletildi.
- PBS filtre kâğıdıyla dokulara temas edilmeden dokuların üzerinden alındı.
- Her bir doku başına dokuyu kaplayacak kadar (10-20µl) primer antikor konuldu.
- Kontrol gruplarına primer antikor konulmadı, dokular PBS'te bırakıldı.
- Preparatlar 120 dakika, nemli, 37 derece ve karanlık ortamda bekletildi.
- Süre sonunda preparatlar PBS'le iki kez üçer dakika yıkandı, sıvının fazlası kurutma kağıdı ile alındı.
- Tüm dokulara dokuyu kaplayacak kadar (10-20µl) sekonder antikor konuldu.
- Preparatlar 120 dakika, nemli, 37 derece ve karanlık ortamda bekletildi.
- Süre sonunda preparatlar PBS'le iki kez üçer dakika yıkandı, sıvının fazlası kurutma kağıdı ile alındı.
- Çekirdek boyası olarak Sytox Green uygulanan preparatlar 3 dakika, oda ısısında, karanlık bir ortamda bekletildi.
- Süre sonunda dokular 2x SSC ile yıkandı ve sıvının fazlası kurutma kağıdı ile alındı.
- Dokular Hoechst'lü kapatma sıvısıyla kapatıldı ve lamellerin çevresi dokuların kurummasını önlemek için oje ile çevrelendi.

3.2.3.3. Mikroskopik Gözlem

Mallory azan ve Homotoksilin-eozin boyamaları yapılan ve kapamaları gerçekleştirilen preparatlar Olympus Işık Mikroskobu ile gözleme alındı. İmmünfluoresan boyamaları yapılan ve kapatma işlemi tamamlanan preparatlar ise, Zeiss LSM 510 Meta Konfokal Mikroskop'u ile gözlemlendi.

3.2.4 Moleküler Genetik Çalışmaları

3.2.4.1 RNA Ekstraksiyonu

Araştırmada incelenen sünger türleri; *D. avara*, *A. polypoides*, *C. reniformis* ve *A. aerophoba* 'ya ait yaklaşık 1 gr ağırlığında parçalar, steril cam petri kutularına alındı ve çift bistüri yardımıyla iyice küçültüldü. Parçalar içerebilecekleri deniz tuzundan arındırmak amacıyla steril distile su içerisinde çalkalanmak suretiyle 4 kez yaklaşık 20 dakika süreyle yıkandı. Yıkama işlemi tamamlanan örnekler, RNA ekstraksiyonu amacıyla Trisolution (GENEMARK, G. Kore) içinde homojenize edildi. Bu amaçla homojenizatör (B. Braun,

Almanya) tüplerine konulan yıkanmış sünger doku parçaları üzerine 1 ml hacimde Trisolution ilave edildi ve buz banyosunda en yüksek devirde cihaz probu yardımıyla homojenizasyon gerçekleştirildi.

Bu basamak itibarıyla takip edilen RNA ekstraksiyon protokolü aşağıda sunuldu;

- 1ml Trisolution içerisindeki sünger parçaları homogenizatör yardımıyla parçalandı.
- Elde edilen süpernatant plastik santrifüj tüplerine alındı 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- 4000 rpm'de 1dk santrifüj edilen tüplerden 1'er ml süpernatant alındı ve steril 1.5ml Ependorf tüplerine konuldu.
- Bu tüplerin içerisine soğutulmuş kloroformdan 0,2 ml ilave edildi, tüpler 15 sn çalkalandı ve oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi.
- Tüpler 4°C de 12.000 rpm'de 2-3 dk santrifüj edildi.
- Yaklaşık olarak 0,6 ml hacimdeki sıvı faz interfaz bozulmadan sıvı alındı.
- Alınan sıvının üzerine 0.25 ml. soğutulmuş izopropil alkol (AppliChem, Germany) ve 0,25 ml. Proteoglikan ve Polisakarit uzaklaştırıcı solüsyon (PG&PS Removal Solusyonu, GENEMARK, G. Kore) eklendi, hafifçe karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk bekletildi.
- Tekrar 4°C de 10 dk 12000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüjlanan tüplerden RNA pelletini bozmadan süpernatantlar alındı.
- Tüplerin içerisine %70' lik etanoldan 2 mL konuldu ve tüpler aynı şartlarda santrifüj edildi.
- Elde edilen pellet hava akımı olmayan oda derecesinde 5-10 dk kurutuldu ve 20 µL DNase-RNase free distille su (GIBCOBRL, ABD) ile resüspanse edildi.

3.2.4.2 cDNA Sentezi

Tüm hücrel RNA'lara ilgili cDNA kütüphanesi Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) Reverse Transcriptase (RT) ile ve tesadüfî heksanükleotid'ler kullanılarak oluşturuldu. Bu çalışmaya ait reaksiyon karışımları bileşimleri ve uygulanan ısı döngüleri aşağıda verildi.

Karışım 1: Her bir örnek için olmak üzere:

4 µL Deionize su (GIBCO-BRL, USA)
1 µL Random Hexamer Primer (Fermentas, Litvanya) konuldu
5 µL RNA

Karışım 2: Her bir örnek için olmak üzere:

3 µlt 5X Reaction buffer (Fermantes, Litvanya)
1 µlt M-MLV RT (Fermantes, Litvanya)
1 µlt 10mM dNTP (Fermantes, Litvanya) konuldu

1) Hazırlanan 1. karışımı Thermal Cycler (TECHNE, Great Britain) cihazına konuldu ve 70°C de 5 dakika süreyle ikincil RNA yapılarının eliminasyonu sağlandı.

2) Bu arada 2. karışım hazırlandı

3) İkinci siklus sonunda tüplere Mix II konulmadan önce tüp sıcaklığı düşürüldü.

4) İkinci siklustaki süresini tamamlamış 1. karışımın üzerine 2. karışımdan her bir tüp başına 5 µlt hacminde ilave edildi.

5) Tüpler Thermal Cycler (TECHNE, Great Britain) cihazına yerleştirilerek şu ısı döngüsü uygulandı;

25°C de, 10 dk (Tesadüfi heksanükleotid bağlanması için)

37°C de, 1 saat (cDNA sentezi için)

70°C de, 5 dk. (MMLV RT inaktivasyonu için)

3.2.4.3 PCR Amplifikasyonu

Elde edilen cDNA kütüphanesinden özel primerler kullanılarak Kollajen 1, Kollajen 2 ve İntegrin β 1 kodlayan gen bölgelerinin çoğaltılması amacıyla gerçekleştirildi. Bu amaçla tasarlanan primerler Dünya Gen bankasından elde edilen *Suberites domuncula* Kollajen 1 (AJ252241), Kollajen 2 (AJ272012) ve İntegrin beta alt ünitesi (Y18468) nükleotid dizinlerinden faydalanıldı. Bu dizinler kullanılarak tasarlanan primer çiftleri ve bazı özellikleri Çizelge 3.2 de sunulmuştur.

Çizelge 3.2 Dünya Gen bankasından elde edilen *Suberites domuncula* Kollajen 1, Kollajen 2 ve İntegrin beta alt ünitesi nükleotid dizinleri kullanılarak tasarlanan primer çiftleri ve bazı özellikleri

Primer Kodu	Primer Dizini (5'→3')	GenBank No	Lokasyon	Tm (°C)	Ürün (bp)
Col1-F	CAG CCA ATG GAC CAC A	AJ 252241	259–274	50	504
Col1-R	CTG GGA CAG ATT CTT GAT		762–745	52	
Col2-F	TCC CAG CAG ACA GAA CAG	AJ272012	271–288	56	599
Col2-R	AAA CAC GGC AAT CCA TAA		869–852	50	
Int-F	ACC AGT ACA GAC AGA GGG AC	Y18468	1324–1343	62	690
Int-R	CTC ATT GAC GGC AAC ATA		2013–1996	52	

PCR reaksiyonu her örnek için 50 µL toplam hacimdeki karışımda gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımının bileşimi aşağıda verildiği gibidir;

cDNA	3.0 µL
Taq DNA Polymerase (Fermentas, Lituanya)	0.5 µL
10 X Taq Tamponu (KCL'li, Fermentas, Lituanya)	5 µL
MgCl ₂ (Fermentas, Lituanya)	2,4 µL
dNTP Mix (Fermentas, Lituanya)	0,8 µL
Primer I (Forward)	0,8 µL
Primer II (Reverse)	0,8 µL
DNase RNase ari distile su (GIBCO-BRL, ABD)	36,7 µL

Bu standart reaksiyon karışımı Kollajen 1, Kollajen 2 ve İntegrin β_1 kodlayan gen bölgelerinin amplifikasyonu amacıyla, sadece primerler değiştirilmek suretiyle ayrı ayrı hazırlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Thermal Cycler'a yerleştirilerek, örneklere aşağıda verilen ısı döngüleri uygulandı:

96°C de 4 dk.	} 35 siklus	(Ön denaturasyon)
47°C de 1 dk.		
72°C de 1 dk.		
92°C de 4 dk.		

72°C de 10 dk. (Son uzama)

3.2.4.4 Jel Elektorofrez

PCR'nu sonrası elde edilen DNA ürün /ürünlerinin kontrolü %1 agaroz jel içinde yapılan elektorofrez ve transilluminasyon ile gerçekleştirildi. Bu amaçla agaroz jel istenilen konsantrasyonda olacak şekilde tartıldı ve 0,5X TAE tamponu içinde eritildi. Jelin soğumasını takiben içine Etidyum Bromid boyası ilave edildi ve jel taşıyıcıya döküldü. Jel sertleşmesini takiben, 3 µL hacimde PCR ürünü 6x yükleme boyası ile jele yüklendi ve 3 V/cm elektrik akımı altında elektoreze (Thermo Electron Corporation, ABD) tabii tutuldu. Elektorez işlemini takiben jel, UV transilluminatörde (DNA Image Analysis, Kodak, Japonya) analiz edildi.

3.2.3.5 PCR Clean Up

DNA dizin analizi için kullanılmak üzere, PCR ürünlerinin temizliği gerçekleştirildi. Bu amaçla ticari bir sistemden (GENEMARK, G. Kore) yararlanıldı. Temizleme işlemi aşağıda detayları verilen basamaklar halinde gerçekleştirildi.

- 1) 64 µL Etanol 16 µL yıkama slüsyonu ile karıştırıldı.
- 2) PCR ürünlerinden 40 µL alınarak yeni ependorf tüplere yerleştirildi.
- 3) 500µL bağlanma solüsyonu PCR örneğinin üstüne ilave edildi.
- 4) 12000rpm'de santrifuj edilen solüsyonu toplama tüplerinin içerisindeki resin kolonlarının üzerine konuldu.
- 3) Bunun üzerine 700 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 12000 rpm'de 1 dk santrifuj edildi. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi.
- 4) Toplama tüpündeki sıvı boşaltıldıktan sonra kalan etanol kalıntılarını uzaklaştırmak için 5 dk daha 12000 rpm'de santrifuj işlemi uygulandı.
- 5) Kolon sistemi temiz bir ependorf tüpe aktarıldıktan sonra resin yastığı üzerine 30 µL ayırma solüsyonu eklendi ve tüpler oda derecesinde 2 dk bekletildi. Son olarak sistem 12.000 rpm'de 1 dk. süreyle santrifuj edilerek temizlenmiş DNA ürünlerinin ependorf tüpe alınması tamamlandı. Elde edilen ürünler kullanılana kadar -20°C'de saklandı.

3.2.4.6 Nükleotid Dizin Analizi

Dizin analizi 4 temel basamakta tamamlandı.

- 1- Reaksiyon kokteylinin hazırlanması
- 2- Cycle sequencing (30 siklus)
- 3- Etanol presipitasyonu
- 4- Kapiller elektroforez yürümesi ve spektroskopik tespit.

1) Dizin analizi için gerekli reaksiyon 20 µL reaksiyon kokteyli içinde gerçekleştirildi. Bu amaçla;

- 6.0 µl DNA örneği (DNA kalitesine bağlı olarak değişir)
- 2.0 µl/µM sekans primeri
- 12.0 µl DTSC premiks karışımı

Geriye kalan hacim (gerekli olduğu durumda) için ise distile su ilave edildi.

DTSC (Dye terminator cycle sequencing) Premiks karışımı aşağıda verilen bileşimde önceden hazırlanarak, -20°C derin dondurucuda saklandı.

DTSC karışımı;

- 200 µl 10X sekans reaksiyon tampon
- 100 µl dNTP Mix
- 200 µl ddUTP Dye Terminator
- 200 µl ddGTP Dye Terminator
- 200 µl ddCTP Dye Terminator
- 200 µl ddATP Dye Terminator
- 100 µl DNA Polimeraz Enzimi

2) Thermal cycler'da 96°C de 5 dk. 30 siklus yapıldı.
50°C de 20 sn.
60°C de 20 sn.

3) Etanol presipitasyonu:

Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı ve 0.5 ml'lik reaksiyon tüpleri içerisinde karıştırıldı.

Durdurma Solüsyonu/Glikojen karışımı;

- 2 µl (pH 5.2) 3M sodyum asetat
- 2 µl 100 mM (pH 8.0) Na₂ EDTA

- 1 µl 20 mg/ml glikojen
- 5 µl durdurma solüsyonu

Karışımın üzerine 60 µL %95 lik soğuk etanol ilave edildi ve 4°C de ve 4.000 rpm'de 4 dakika süreyle santrifüj edildi. DNA pelleti bozulmadan süpernatant aspire edildi. Elde edilen pellet iki kez 200 µL 70% lik etanol ile temizlendi ve 14.00 rpm'de 3 dk. santrifüj edildi ve her santrifüj işleminin ardından supernatant atıldı. Daha sonra tüpler 1 gece boyunca kurmaya terk edildi.

Kuruyan pelletler formamid solüsyonu ile çözüldükten sonra propilen örnek kuyucuklarına yerleştirildi ve CEQ8000 Genetik Analizör'de (Beckman Coulter, USA) üretici firma tarafından önerildiği şekilde, sekans işlemi başlatıldı.

3.2.4.7 Filogenetik Analiz

PCR ürününden elde edilen nükleotid dizini Gen Bankasında bulunabilen 2 sünger integrin β_1 kodlayan dizin (*S domuncula* ve *G cynodium*) ile karşılaştırıldı ve dizinler arası özdeşlik katsayıları (sequence identity matrix) hesaplandı. Her üç dizin arasındaki genetik benzerlik PHYLIP 3,16 (Felsenstein 1989) programı kullanılarak hesaplandı. Bu program içindeki DNADIST ve NEIGHBOR analizleri sırasıyla gerçekleştirilmek suretiyle kısmi integrin dizinleri arasındaki benzerlik ortaya konuldu. Elde edilen sayısal veriler Treeview (Page 1996) programı yardımıyla dendogram formatında çizdirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Süngerlerin Tanınma Aşamaları

Ülkemiz denizlerinin önemli unsurlarından olan süngerlere dair ülkemizde yayınlanmış detaylı çalışmalar bulunmamaktadır ve süngerler üzerine yapılan az sayıda çalışmada ticari banyo süngerleri üzerine olmuştur. Bu çalışma kapsamında yer almamasına rağmen bu eksiklikten yola çıkılarak, hem bu canlıları daha iyi tanımak hem de bu canlılara yönelik zamanla zenginleştirilecek ve daha sonraki çalışmalarda kullanılacak bir arşiv oluşturma ihtiyacı duyuldu. Bu nedenlerle, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışma olanaklardan yararlanılarak denizlerimizde yaşamakta olan ve sık görülen deniz süngerlerinin de görüntülenmesi fırsatı bulunmuştur. Ayriyeten iki seneye yayılan bu çalışmalar sırasında gerçekleştirilen tez bağımlı/bağımsız dalışlar, fotoğraflama, arşiv çalışmaları neticesinde süngerlere ve bu türlerin bulunabileceği sualtı ortamlarına dair bir göz aşinalığı ve bilgi birikimi edinilmiştir. Şunu eklemek gerekir ki, sualtında herhangi bir süngeri görebilmek, iki ayrı süngeri ayırt etmek çok zahmetli olabilmektedir ve eğitilmiş gözler dışında bu canlıları ait ön tanımlanmayı yapmak oldukça güç ve sağlıksız olabilir. Bu konuda oldukça bilgiye sahip birinin dahi göz/fotoğrafla yaptığı tanımlamasının % 20–30 oranında sağlıksız olabilmektedir. Bu yüzden yapılan sünger tanımlamasının bilimsel olabilmesi için mutlaka ve mutlaka mikroskopik incelemelerde dahil, bir takım sünger tanımlama çalışmalarını gerçekleştirmek, örneklenen süngerlerin doğruluğunu teyit etmek açısından önemlidir. Süngerleri tanımlamada en etkili yöntem spikül gibi iskelet yapılarının mikroskopik yöntemlerle incelenmesidir. Bu konuya ait en önemli doküman Hooper'ın (2000) “Sponge Guide” isimli sünger tanımlama çalışmasıdır. Gerçekleştirilen tanımlama çalışmalarında spikül inceleme şansı olmadı, fotoğraf, literatür, kitaplar yardımıyla tanımlamalar yapıldı. Tanımlaması yapılan türlerin doğruluğunu anlaşılması için ve tanımlanamayan türlerin belirlenmesi için ise bu konunun uzmanı olan şahıslarla temaslar kuruldu.

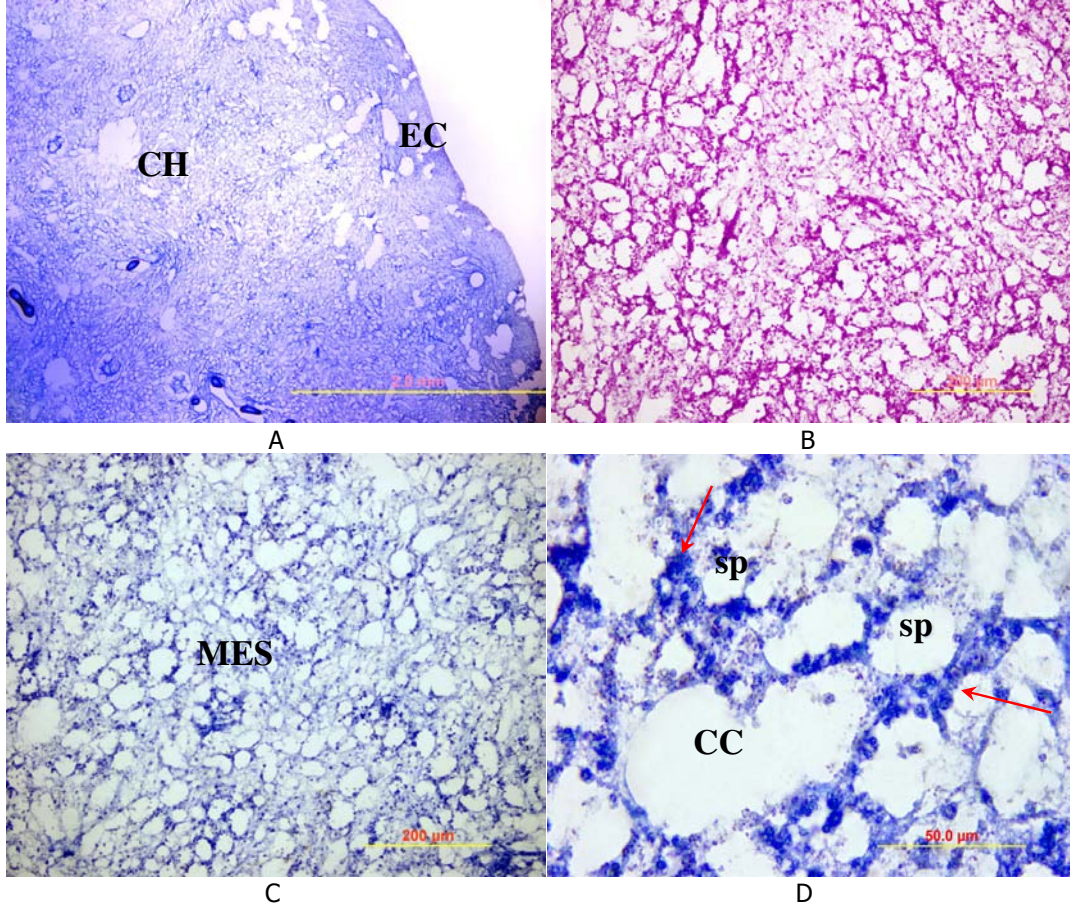
Bu çalışma kapsamında gerçekleştirilen dalışlar sırasında edinilen bilgiler, görüntüler arşivlendi. Bu çalışmalar sonucunda elimizde şu anda 40 tür deniz süngerine ait sualtı fotoğrafları, arşiv bilgileri mevcuttur. Bunlardan 33 tanesinin tür tanımlaması, alınan sualtı görüntülerinden ve sualtı gözlemlerinden yararlanılarak ve yüzeye getirilen örneklerin fiziksel özelliklerinin kapsamlı olarak incelenmesi yoluyla yapılmıştır. Geriye kalan türlerin fotoğrafları ve örnekleme bilgileri konunun uzmanı araştırmacılara gönderilmiş

olmasına rağmen tanımlamaları yapılamamıştır. Bu arşiv çalışmalarının neticesinde ise Türkiye sularında sıkça rastlanmakta olan süngerlere dair bir poster hazırlandı (Can ve Gökalp 2005).

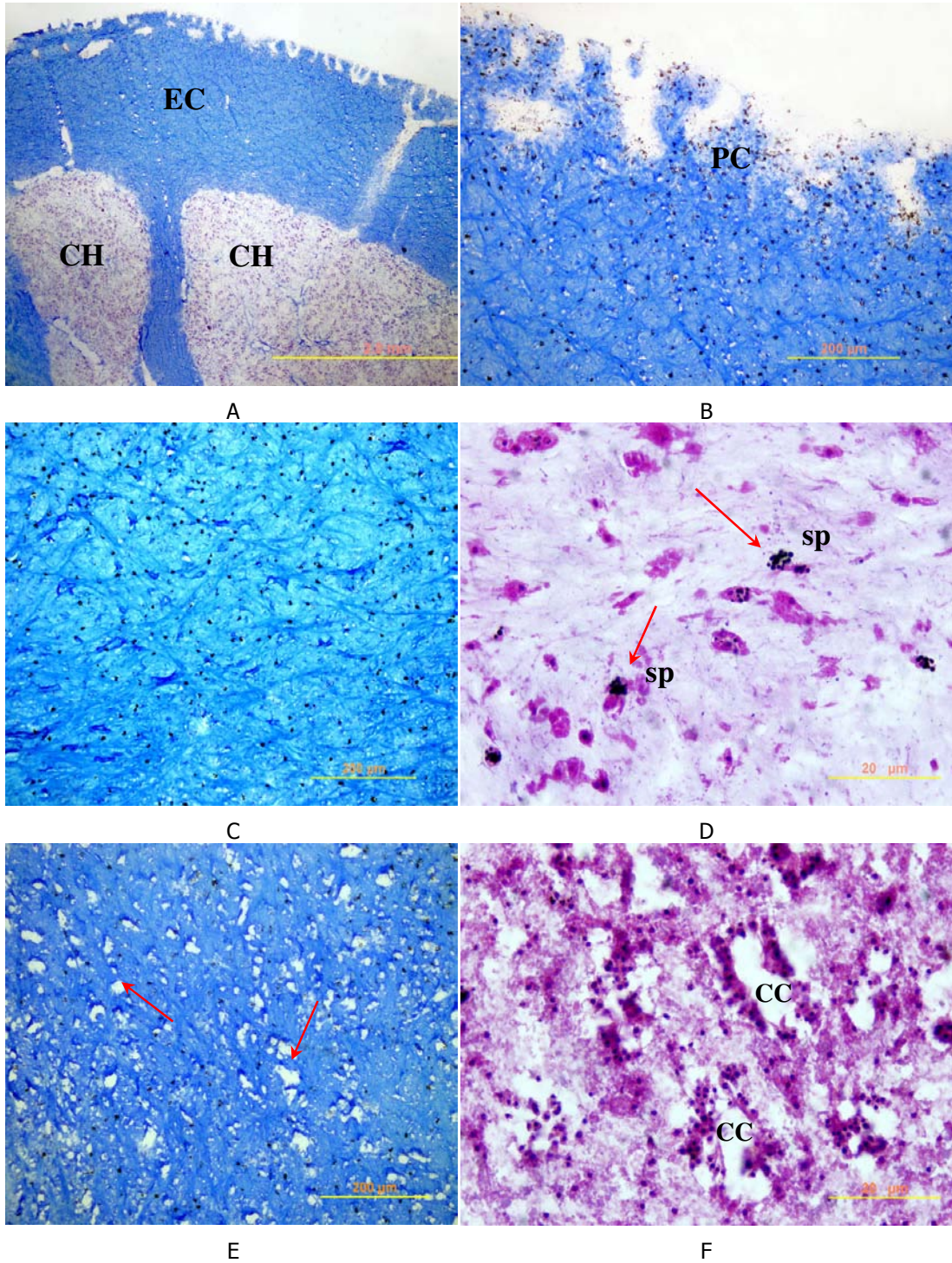
4.2 Mikroskobik İnceleme Sonuçları

4.2.1 Işık Mikroskobu

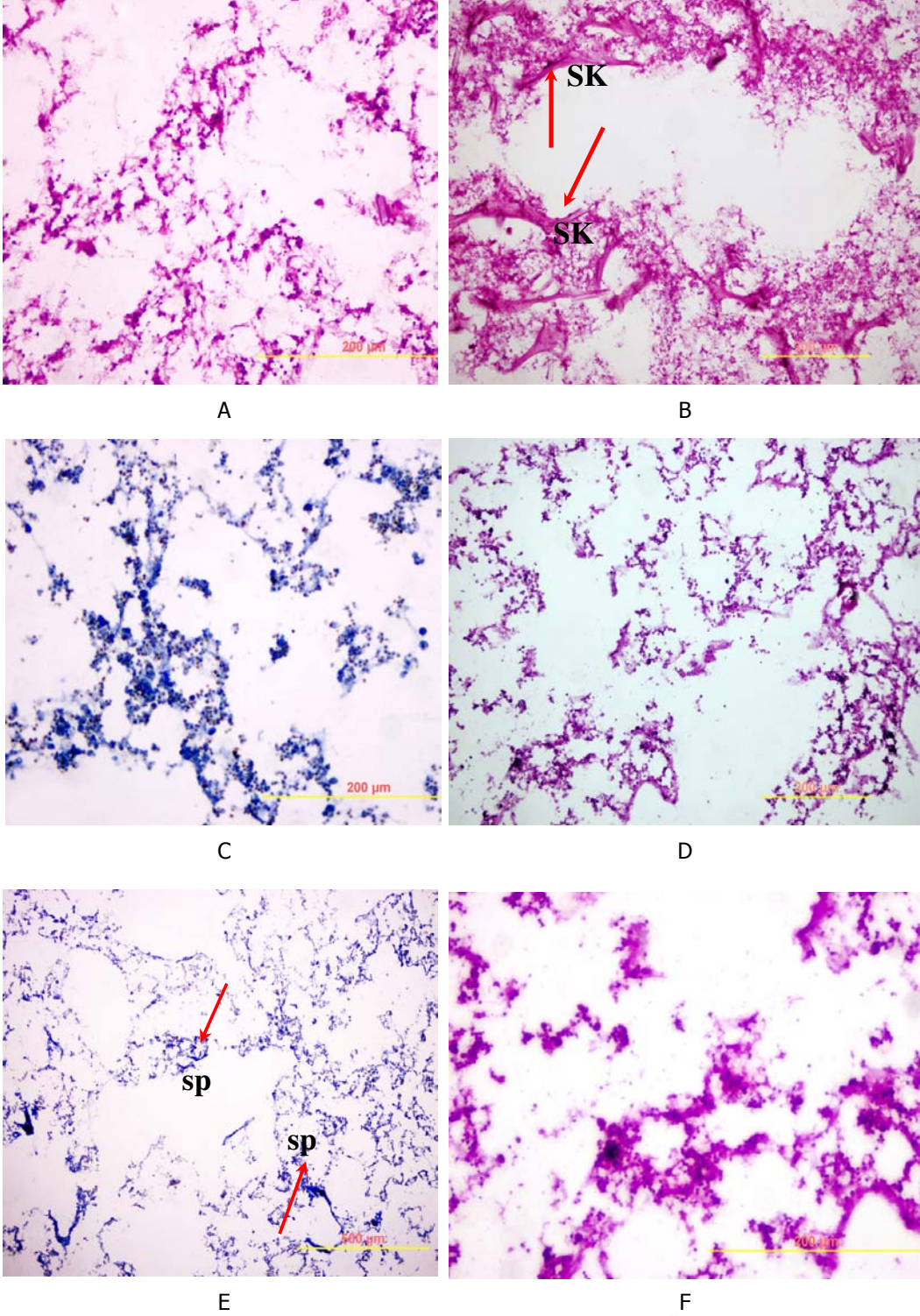
Çalışma kapsamında örneklenen sünger türlerinin dokularına uygulanan kriyokesit işlemlerinin ardından, kollajen liflerini göstermesi amacıyla mallory azan, hücreler ve genel doku görüntüsü hakkında bilgi sağlaması amacıyla ise hemotoksilin-eozin boyamaları uygulandı. Kriyokesit ve boyama işlemleri sırasında *C. reniformis* ve *A. aerophoba* türleri problem yaratmadı. Uygulanan tespit işleminin başarılı olduğu hem kesit alımı esnasında hem de gerçekleştirilen çeşitli boyamalarda görüldü. Çok sert ve esnek yapısı olan *C. reniformis* türünün uygulanan yöntemlere çok iyi cevap verdiği görüldü ve bu türde oldukça etkin boyama elde edildi, özellikle tabakalar arasındaki ayrımlar ve kollajen lifleri açıkça görüldü. *A. aerophoba* türünde de genel olarak güzel bir doku kesiti alındı, kollajen lifleri bir miktar görülebildi ve boyamalar genel olarak başarılı oldu. *D. avara* ve *A. polypoides* türlerinde ise iki süngerin de spikül içeren türler olması ve *D. avara*'nın yayılımcı tipte (encrusting) bir sünger olmasından nedeniyle kesit alma işlemlerinde bir miktar zorlanılmasına rağmen doku kesitleri lamellere alınabildi. Ancak bu türlerdeki girintili çıkıntılı yapı nedeniyle doku yapısı lamellere çok iyi aktarılamadı. Karşılaşılan bu problem, bu türlere ait detaylı mikroskop görüntüsü elde edilememesine neden olmuş olabilir. Genel sünger dokusunu anlayabilmek ve tanıyabilmek amaçlı gerçekleştirilen bu işlemlerde, *C. reniformis* türünün oldukça yardımcı oldu. Bu türde bütün tabakalar, oluşumlar, hücreler o kadar iyi görüldü ki bu türü model alıp diğerleriyle kıyaslayarak diğer türleri daha iyi tanıma şansına sahip olundu. Özellikle *D. avara* ve *A. polypoides* türlerinin mikroskop görüntülerinin literatürde yer almaması nedeniyle bu türlerin doku yapılarının anlaşılmasında oldukça zorlanıldı.



Şekil 4.1 Işık mikroskobu görüntüleri. **A. aerophoba**, A-C-D mallory-azan, B hemotoksilin-eozin boyası. A) kollajen lifleri açıkça görülmekte, bu türde ectosome doku kenarında ve çok ince, choanosome ise tüm dokuya yayılmış B) birbiriyle bağlantılı sık kanallar ve odacıklar C) sünger **mesohyl'i MES**, hücreler ve sünger ağırlığının 40% ını oluşturan ortakçıl organizmalardan oluşmakta D) kanallar ve choanocytes odacıkları-**CC** çevreleyen mesohyl içerisindeki hücre toplulukları-**sp**.



Şekil 4.2 Işık mikroskobu görüntüleri *C. reniformis*, soldaki maviye boyanmış görüntüler mallory azan boyası, sağdaki magentaya boyanmış görüntüler ise hemotiksilin-eozin boyası. A) mavi bölgeler-ectosome, beyaz bölgeler-choanosome B) doku yüzeyi pinocoderm tabakası ve hücreler C) ectosome tabakası, kollajen lifleri ve hücreler D) ectosome, **spherulous** hücreleri **sp** E-F) choanosome içerisinde **choanocytes** odacıkları **CC**



Şekil 4.3 Işık mikroskobu görüntüleri, silika spiküllü süngerler. Üstteki ilk iki görüntü **A. polyoides**, alttaki 4 görüntü **D. avara** dokularına ait. Bu tarz süngerlerde görülen geniş boşluklar her iki türde de görülmekte. A-B-D-F hemotoksilin-eozin, C-E mallory-azan boyama, **SK-spikül**, **sp-spherolous** hücreleri.

4.2.2 Konfokal Mikroskobu Gözlemleri

Konfokal mikroskop gözlemleri sırasında ve alınan görüntülerin değerlendirilmesi aşamasında bu türlere ait doku yapısını biraz daha algılanabilme ve tanınma şansı bulundu.

4.2.2.1 *Aplysina aerophoba*

Bünyesinde birçok bakteri barındıran *A. aerophoba* türünün çok sık odacık ve kanal içeren birbirine sıkı sıkıya bağlı bir *mesohyl* yapısına sahip olduğu görüldü. Literatürde belirtildiği üzere bu türdeki *ectosome* bölgesinin kalınlığının oldukça az olduğu (1–2 mm), dokunun çok büyük bir kısmını *choanosome* bölgesinin oluşturduğu ve *choanocyte* odacıklarının sünger dokusunun içlerine gidildikçe büyüdüğü tespit edildi. *A. aerophoba mesohly*'i içerisinde Tip I, Tip II ve Tip IV kollajen liflerine ve Integrin β_1 'e rastlandı. Tip I ve Tip IV kollajen yoğun olmakla birlikte, Tip II kollajen nispeten daha az sinyal verdi. Integrin β_1 ise oldukça iyi sinyal verdi. Sytox boyama ile yapılan çekirdek boyama gözlemlerinde oldukça yoğun hücre çekirdeği görüldü. Sünger hücrelerinin oldukça ufak olması nedeniyle bunların bir kısmının sünger hücreleri bir kısmının ise süngerin barındırdığı inanılmaz miktarlardaki bakterilerin oluşturduğunu düşünülmektedir.

4.2.2.2 *Chondrosia reniformis*

Bu türde ise oldukça kalın bir *ectosome* tabakasını *choanosome* tabakasını çevrelemekteydi. *Choanocyte* odacıklarına *choanosome* bölgesinde sık rastlanırken *ectosome* tabakasında bu yapılar görülmedi. Her iki tabakada da görülen *spherulous* hücreler *choanosome* bölgesinde daha yoğun olmakla beraber, *choanocyte* odacıklarının etrafında kümelenmekteydiler. Bu türün *ectosome* bölgesinin inanılmaz boyutlarda Kollajen Tip I lifleri ile çevrelenmiş olduğu görüldü. Süngerin *ectosome* bölgesinde yoğunlaşmış bu lifler *choanosome* bölgesinde bir anda kesilmekteydi. Tip II, IV kollajen ve Integrin β_1 proteinlerine bu gözlemlerde rastlanmadı.

4.2.2.3 *Axinella polypoides*

Genellikle denizlerimizde 20 metreler civarında görülmeye başlayan bu süngerde encrusting süngerlerde rastlanan silikalı spikül iskelet yapısı gözlemlendi. Geniş boşluklardan oluşan dokuların arasında irili ufaklı pek çok odacık ve hepsi birbiriyle

bağlantılı bir kanal yapısı bulunmaktaydı. Hücrelerin odacık ve kanalların etrafında yoğunlaştığı görülmekle birlikte, neredeyse tüm dokuyu *choanosome* oluşturuyor diyebiliriz. Bu tür bizi oldukça zorlayan bazı sinyaller verdi, hücre yapısını çok iyi tanımamızdan ötürü alınan sonuçlara temkinli yaklaşmaktayız. Görüntülerde tespit edilen kollajen sinyallerinin kontrol boyamalarla kıyaslanmalarında boyamalarda herhangi bir hata olmadığı anlaşıldı ancak kollajen sinyalleri lifsel değil daha çok noktasaldı. Bu bilgilerden yola çıkarak çok az bir miktar kollajen Tip I, II, IV sinyali alındı diyebiliriz. Integrin β_1 için ise az bir sinyal alındı ve bu proteinin varlığı gözlemlerde tespit edildi.

4.2.2.4 *Dysidea avara*

Bu tür encrusting süngerlerin genel yapısından beklendiği üzere çok sayıda saman şeklinde spiküller görüldü ve dokuların arasında oldukça büyük boşluklar gözlemlendi. Odacıkların irili ufaklı olduğu ve kanalların çevresinde çok yoğun hücre barındığı gözlemlendi öyle ki, en yoğun hücre topluluğu bu türde diyebiliriz. Tabakaların yapısı hakkında ise bir yorum yapmak ise oldukça güç oldu. Bu türde de alınan kollajen sinyalleri çok zayıftı ve sinyaller lifsel değil nokta noktaydı. Kollajen Tip I ve Tip IV için çok az bir sinyal alındı ancak biz bu sinyallerden kollajen liflerinin noktasal olmasından ötürü ve canlılığın hücre yapısını çok iyi bilmediğimiz için şüpheliyiz. Kollajen Tip II' nin ve Integrin β_1 proteinlerinin ise bu türde bulunmadığı görüldü.

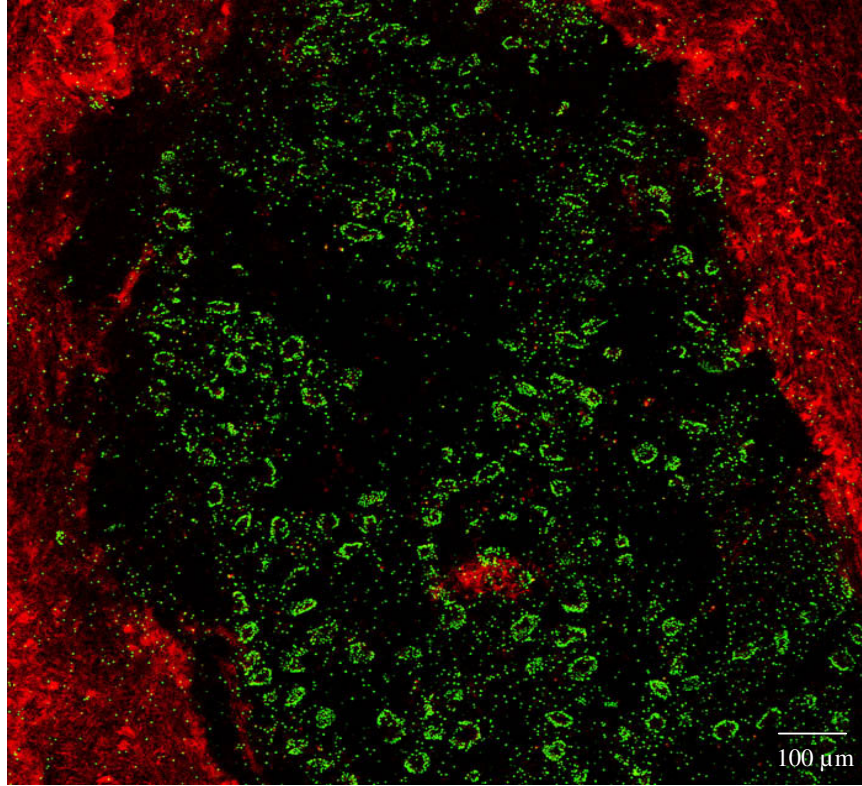
Bu 4 türe uygulanan kollajen Tip I, II, IV ve Integrin β_1 monoklonal antikorlarının gözlemleri neticesinde elde edilen pozitiflik seviyeleri aşağıdaki çizelgedeki gibidir.

Çizelge 4.1 *Konfokal mikroskobu gözlem sonuçları*

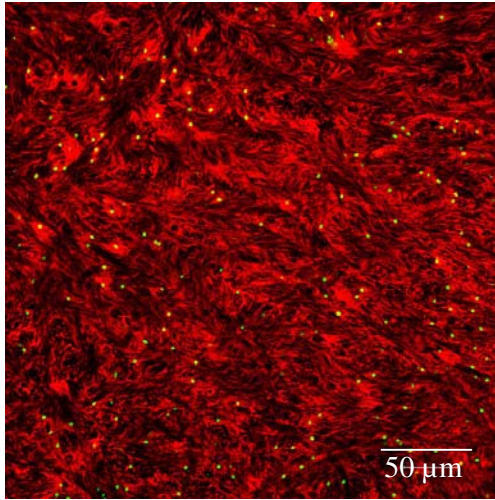
	<i>A. aerophoba</i>	<i>C. reniformis</i>	<i>D. avara</i>	<i>A. polypoides</i>
Tip 1 kollajen	++	+++	+?	+?
Tip2 kollajen	+	-	-	+?
Tip 4 kollajen	++	-	+?	+?
Integrin β_1	++	-	-	+

+++ Mükemmel, ++ Var, + Az miktarda, +? Emin değiliz, - Yok

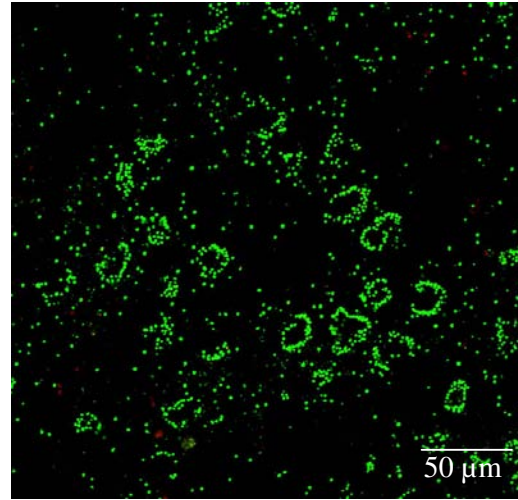
4.2.2.5 Tip I Anti-kollajen



C. reniformis dokusu *ectosome-choanosome* bölgeleri. *Ectosome* bölgesi neredeyse tamamen kollajen liften oluşmuşken *choanosome* bölgesinde bu lifler hemen hiç bulunmamakta. *Choanosome* bölgesinde bulunan *choanocyte* odacıkları da *ectosome* bölgesinde göremiyoruz. Spherulous hücrelerin *choanosome* bölgesinde daha yoğun bulunduğunu burada görebiliyoruz.

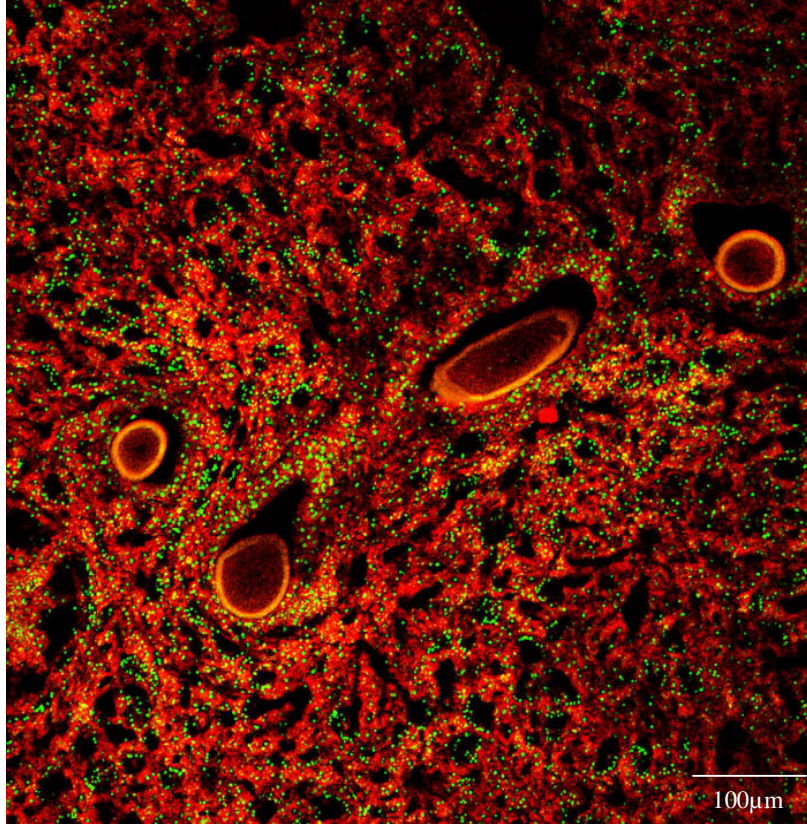


C. reniformis ectosome

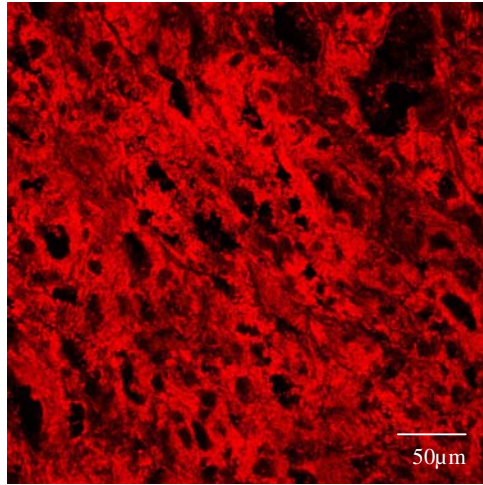


C. reniformis choanosome

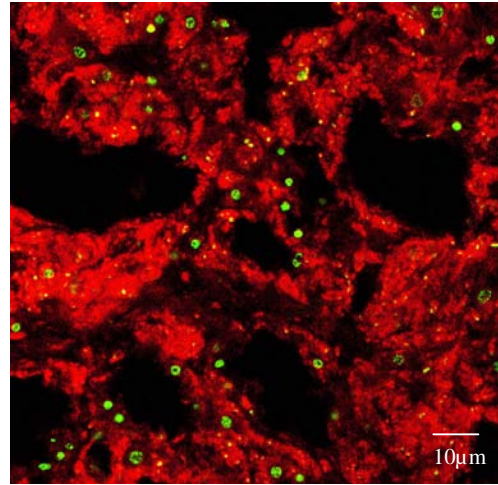
Şekil 4.4 Sünger dokusu *ectosome* bölgesindeki kollajen lifleri ve spherulous hücreleri. Kollajen lifler kırmızı renk, spherulous hücreler ise yeşil renk, alt soldaki görüntü. Sünger dokusu *choanosome* bölgesindeki *choanocyte* odacıkları görülmekte. Spherulous hücrelerin bu odacıkların çevresinde toplanmış. Herhangi bir kollajen izine bu bölgede rastlanmamakta, alt sağ.



A. aerophoba, kollajen lifleri kırmızı, hücreler ise yeşil renkte boyanmış. Sünger dokusunun kanallar ve odacıklarla dolu olduğunu bu görüntüde rahatlıkla görülebilmekte. Odacıkların içerisinde görülen yuvarlak yapılar ise muhtemelen kalsit birikintileri



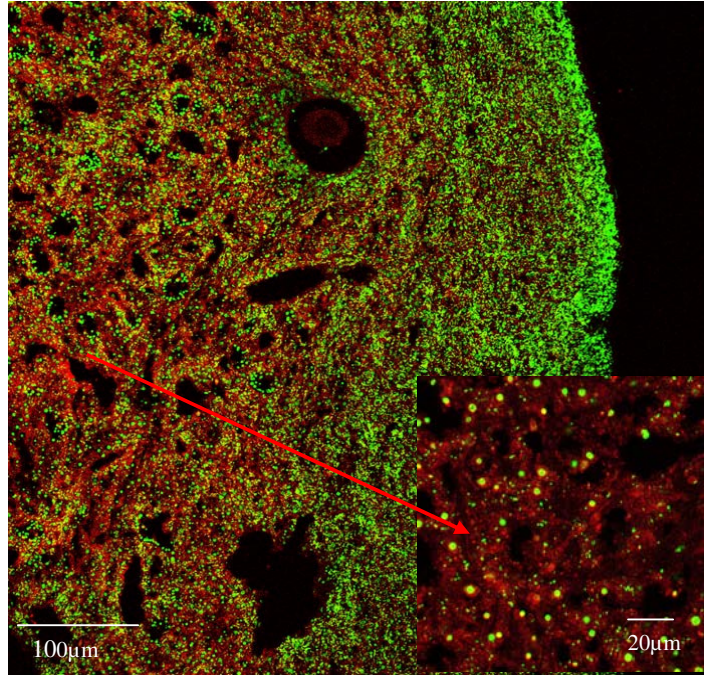
Tip I kollajen lifleri



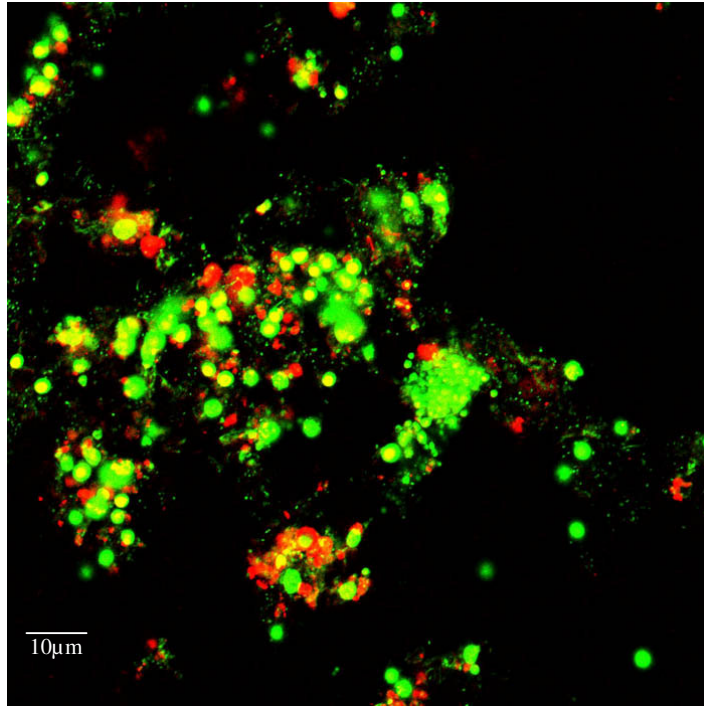
Tip I kollajen lifleri ve hücreler

Şekil 4.5 *A. aerophoba* dokusu, kollajen lifleri *C.reniformis* türünde olduğu kadar yoğun olmasa da bu türde kendini gösterdi. Sol alt görüntüde liflerin genel görüntüsünü açıkça görebiliyoruz, sağ alt daha yakın görüntüde ise liflerin arasında hücreler görülmekte.

4.3.2.6 Tip II Anti-kollajen

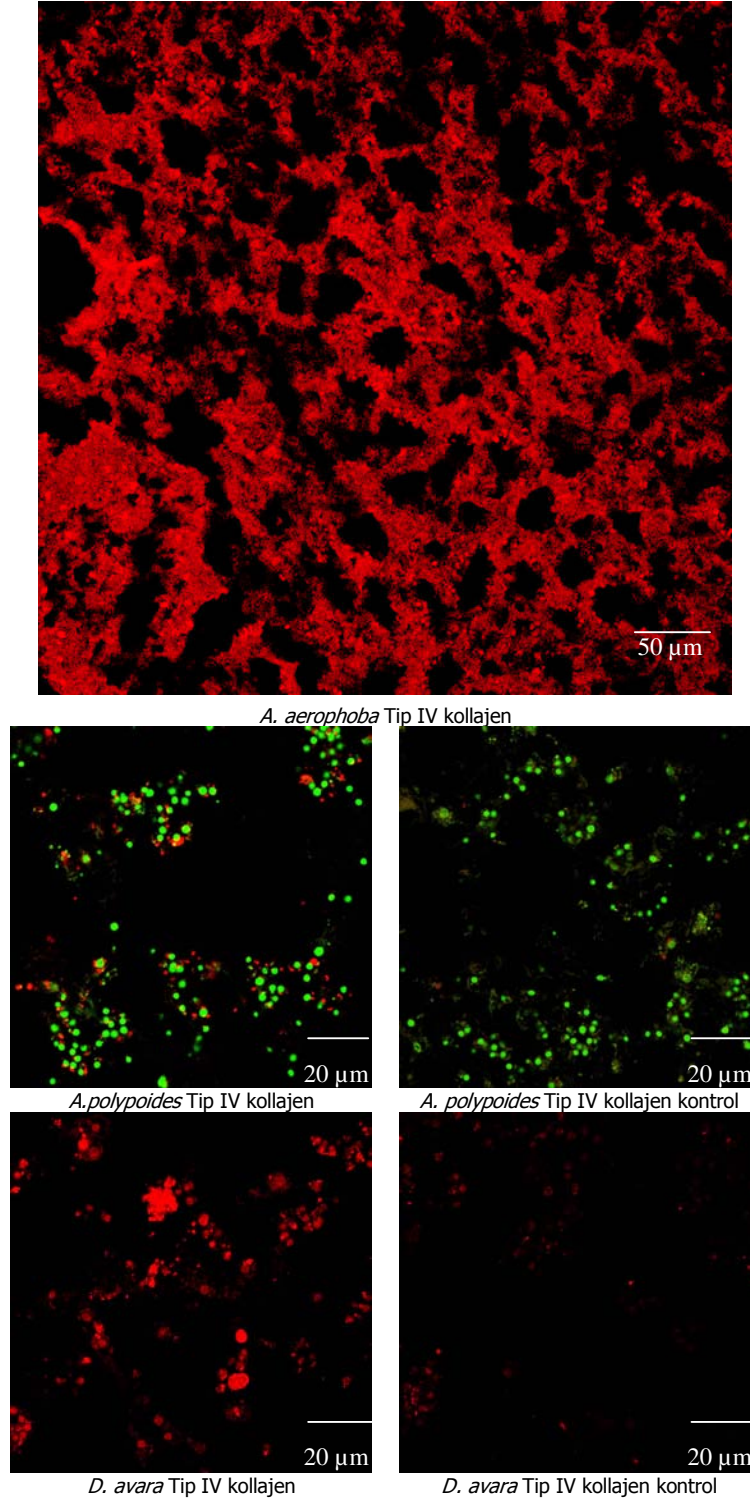


Şekil 4.6 *A. aerophoba* konfokal görüntüsü sünger dokusunun geniş bir bölümünü göstermektedir. Görüntüde azda olsa Tip II kollajen lifleri kendini belli ediyor. Hücrelerin ise doku kenarlarına doğru yoğunlaştığını görebiliyoruz



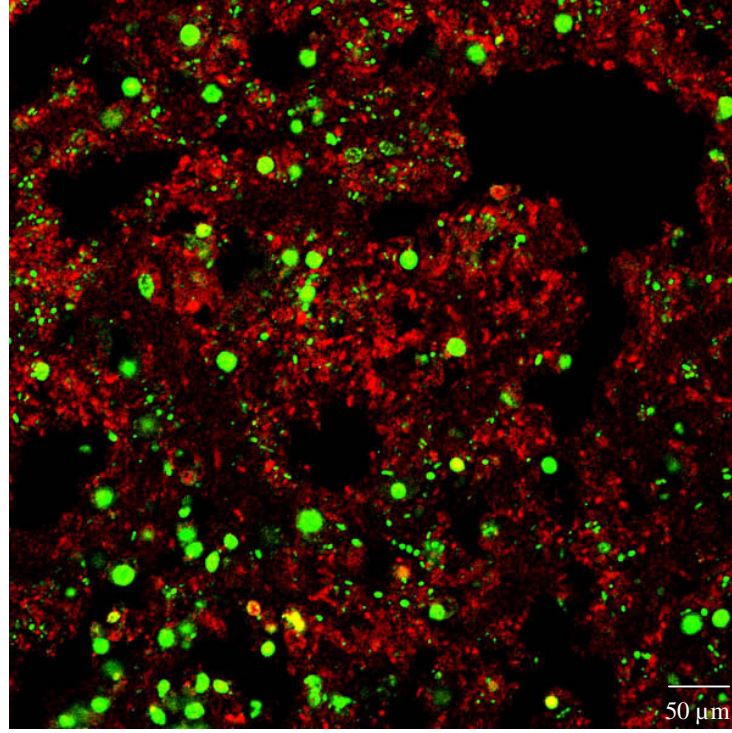
Şekil 4.7 *A. polypoides*, hücrelerin kenarlarında bir miktar Tip II kollajen görünmekte ancak kollajen yapısının lifsi değil de noktasal olması bazı soru işaretleri oluşturdu.

4.3.2.7 Tip IV Anti-kollajen

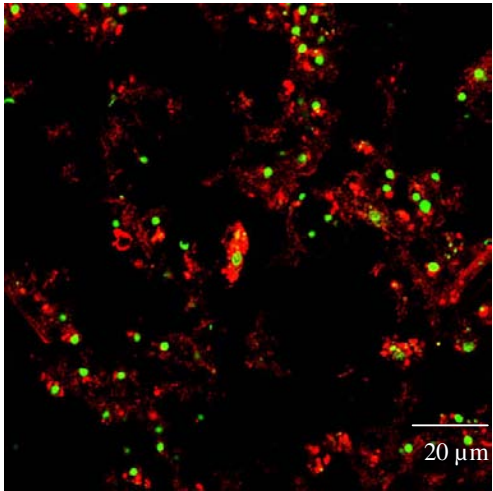


Şekil 4.8 *A. aerophoba*'da görülen Tip IV kollajen lifleri – üst, *A. polypoides* ve *D. avara* dokularından alınan kollajen IV görüntülerinin kontrol görüntüleriyle kıyaslanması – alt 2. ve 3. sıra

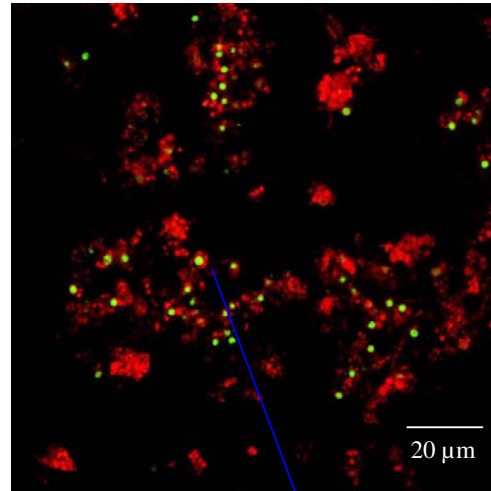
4.3.2.8 Anti-Integrin β_1



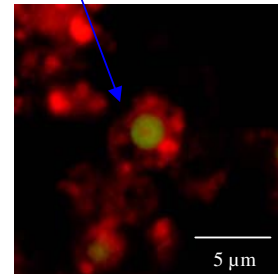
A. aerophoba Integrin β_1



A. polypoides Integrin β_1



A. polypoides Integrin β_1



Şekil 4.9 *A. aerophoba* dokularında hücrelerin (yeşil) etrafında kümelenmiş oldukça güzel sinyaller veren integrinler görülebilmekte, üstteki görüntü. *A. aerophoba* kadar yoğun olmasa da integrin, hücrelerin etrafında *A. polypoides* dokularında görülmekte.

4.3 Moleküler Genetik çalışmaları

4.3.1 RNA Ekstraksiyonu

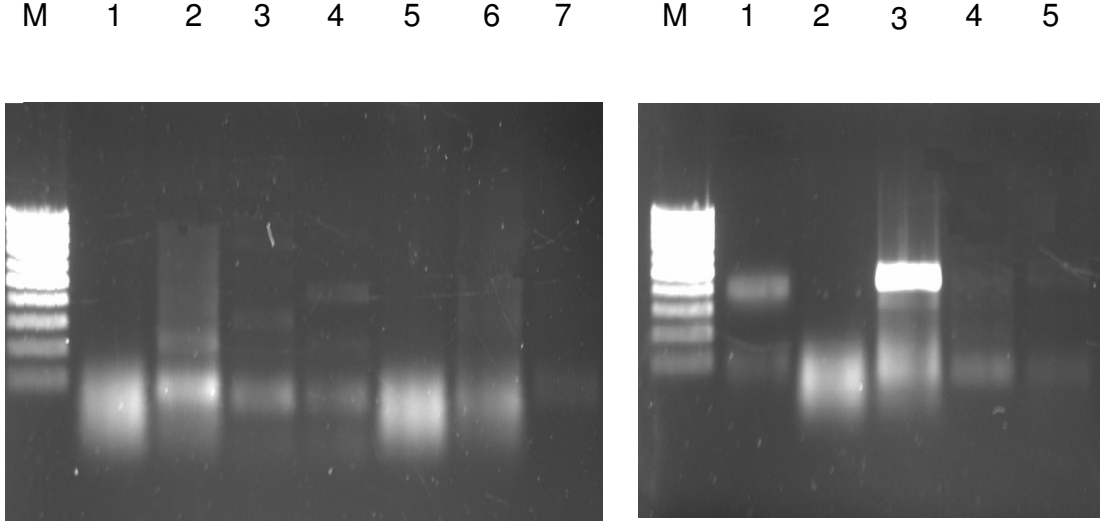
Araştırma kapsamına alınan sünger dokularından total RNA elde edilmesine yönelik çalışmalarda oldukça önemli sorunlar yaşandı. Bu sorunların altında yatan temel neden, sünger dokularının sahip olduğu farklı doku tonositeleri nedeniyle arzu edilen düzeyde homojenizasyon işleminin yapılamamış olmasıydı. Özellikle *C. reniformis* türü aşırı derecede sert olup, hem sıvı nitrojen ve hem de steril kum ilavesine rağmen arzu edilen düzeyde homojenize edilemedi. Diğer taraftan *D. avara* ve *A. polypoides* türlerinin elastikiyetlerinin yüksek olması nedeniyle homojenizasyon işeminde güçlük yaşandı.

4.3.2 RT-PCR

S. domuncula sünger türüne ait kollajen tip I, tip II ve integrin β_1 kodlayan gen bölgelerine ait nükleotid dizinleri esas alınarak tasarlanan primerler kullanılmak suretiyle yapılan *in vitro* amplifikasyon denemelerinde kollajen tip I ve tip II mRNA'larından köken alan DNA yapıları içinde beklenen büyüklüğe yakın DNA ürünleri kollajen tip I için *D. avara*'da, kollajen tip II için ise, *A. aerophoba* ve *A. polypoides* dokularında tespit edildi (Şekil 4.10 A). Diğer taraftan *A. aerophoba*'dan elde edilen RNA ile integrin β_1 alt ünitesine ait yüksek kopya sayısında DNA ürününe ulaşılabilirdi (Şekil 4.10 B). *A. polypoides* ve *D. avara* dokularından hazırlanan RNA örneklerinden yapılan RT-PCR sonrasında ise Int β_1 DNA kopyası oldukça düşük düzeyde tespit edildi.

4.3.3 DNA Dizin Analizi

RT-PCR uygulaması sonrasında jel görüntüleri dikkate alınmak suretiyle spesifik veya non-spesifik olarak değerlendirilen tüm DNA ürünleri temizlenmek suretiyle dizin analizi işlemine tabii tutuldu. Bu uygulama sonrasında değerlendirilebilir düzeyde dizin verisi sadece *A. aerophoba*'dan Integrin β_1 primerleri ile elde edilen DNA ürününden sağlandı. Bu DNA kullanılarak toplam 427 nükleotid uzunlukta okuma yapıldı. Araştırmada elde edilen Integrin β_1 bölgesine ait kısmi DNA dizisi EK1'de fasta formatında sunulmuştur. Gerek forward ve gerekse reverse primerler kullanılarak elde dizinler arasında tam özdeşlik



Şekil 4.10 Jel görüntüleri, kollajen tip I, tip II, İntegrin β_1

A - M, 100 bp DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya); 1) *C. reniformis* kollajen I 2) *A. aerophoba* kollajen I 3) *A. polypoides* kollajen I 4) *D. avara* kollajen II 5) *C. reniformis* kollajen II 6) *A. aerophoba* kollajen II 7) *A. Polypoides* kollajen II.

B - M, 100 bp DNA merdiveni (Fermentas, Litvanya); 1, *D. avara* kollajen II 2) *C. reniformis* integrin β_1 3) *A. aerophoba* integrin β_1 4) *A. polypoides* integrin β_1 5) *D. avara* integrin β_1 .

elde edildi. Diğer tüm DNA ürünleri ya anlamsız kısa dizinler halinde sonuçlandı ya da dizin analiz sistemi (Beckman Coulter CEQ8000) değerlendirme programı (software) tarafından kullanılmayan ham veriler oluşturdu. Elde edilen kısmi dizin *S. domuncula* integrin β_1 (GenBank Accession No Y18468) ve *G. cydonium* integrin β_1 (GenBank Accession No Y18168) dizinleri ile karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4.11). Her üç dizin arasındaki özdeşlik katsayıları hesaplandı. Buna göre araştırmada tespit edilen *A. aerophoba* integrin β_1 dizini ile *S. domuncula* arasında % 22,6 oranında *G. cydonium* arasında ise % 21 düzeyinde nükleotid identikliği saptandı. Diğer taraftan *S. domuncula* ve *G. cydonium* arasında ise bu oran % 49,5 olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Nükleotid dizinleri bazında elde edilen Sequence Identity Matrix (SIM) değerleri.

	<i>S. domuncula</i> -Int β_1	<i>G. cydonium</i> -Int β_1	<i>A. aerophoba</i> -Int β_1
<i>S. domuncula</i> -Int β_1	ID	0,495	0,226
<i>G. cydonium</i> -Int β_1	0,495	ID	0,210
<i>A. aerophoba</i> -Int β_1	0,226	0,210	ID

```

      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                10         20         30         40         50         60
S. domuncul ACCAGTACA- -GACAGAGGG ACTTGTGTGT GTGGAGAGTG TCAATGTAGG AGAGACTCAG
G cydonium TGCAGTGCTC CGGAAGAGGG ACCTGCACAT GTGGCATCTG CGAGTGCAGA AGAGACTCTA
A. aerophob -----
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                70         80         90         100        110        120
S. domuncul CTGGTAACCC CATTACTTT GGACCTGCTT GCGAGTGTGA CCGTTCAGT TGTCCATCTT
G cydonium ACGGAGAGGA GAGGTTCTAT GGACCAGCAT GTGAATGTGA CAACACTGTA TGTGAACGTG
A. aerophob CCGGTGA--- TGTACAGTAT GAGTTCGC-- ACTAGCGGGC CAGGTTGCAT CGTTTACCGT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                130        140        150        160        170        180
S. domuncul TCAATGGG-- -GAGCTTTGT GCTGGTC--- ---GTGGTGC CTGTACATGT GACGGTTGTC
G cydonium GGATTGGGAA CGAGATTTGC TCGGGACCCT CCAACGGAGA GTGTACATGT GACGGTTGCC
A. aerophob TAGATGAATT GGACTGAGAC GCCGCTTCG TCGATTTCTT TCTTGACCAT TACGAGGTCC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                190        200        210        220        230        240
S. domuncul GTTGCAATTT GGAACCAAAT ACTCAACAAC CTTACTTTGG AACGGC-TTG CGAGTGTTCa
G cydonium GCTGCCTACC TGAGCCCGTC ACTGGTCTCC CGTACACAAT GAGCGA-TTG CAGCTGCACG
A. aerophob AGAGCGATTc CTGGCCAAAC GGTCGG-GGT CGTACACAAA AAGTGCATTG ATTTcGTTGT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                250        260        270        280        290        300
S. domuncul CCCGATACCA A---TTGTGT AGATCCTAAC AACTCCACTG ATATCTGCAA TGGACG-TGG
G cydonium CCCAACACCC AGACCTGCGT TGACCCAACC AATACAAC TG ATCTATGCAA CGGAAG-GGG
A. aerophob TCCGAACGGC A---TCGCGT AGGCCTGCA ACTCGGTCCG GAATACGTTc TGCGCGCTGG
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                310        320        330        340        350        360
S. domuncul TACCTGCGGC TGCAGTGGAC GA---TGTGA TTGTCAATTC CCATATCGTG GTGAC--TTC
G cydonium CGTGTGCGAG TGTGGCCAGT GCATCTGTGA CCCTGACAGC CCCTACTTTG GAGAT--TAC
A. aerophob TGGTTTCTCG CCAAACGTGG CGGTCTTcGA CGGTGTAGCC AGCCAGTTGG GCGGCCATAC
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                370        380        390        400        410        420
S. domuncul TGTGAAGTCT GTTCTGGAGA T-----GAA AGCTGCTTTG ATCT---TAC TTGTGACAG-
G cydonium TGTGACGAGT GTTCCACGGG CTCCCCGATT TGCCGTCTCC AGCTCTGTGC TGCCGACAGT
A. aerophob GGCAACGCTC TTCTTGCgTT TCCAGAGACG TACCGTCTTG C-----TGC TG--GGTTGT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                430        440        450        460        470        480
S. domuncul --CAATGCAG AGTGCGCCAA CTGCGCTGTT GATATTCTGG ACCTGTTCC- CAATGTCAAC
G cydonium GACAACACAC TCTGTGCCTC GTGTGTCGTT GACCTCCTTG AAGAACTCAA CACTCTCGGC
A. aerophob ACTGACGCGG AGGTAGATGC CTGCCTTCAT GGTGAGCCTC CAATAATCT- GGGCCTTCGT
      ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                490        500        510        520        530        540
S. domuncul GAATCTGACG --TTCTTCAC GAATGAAA-- ----- CTCTAAACAG T-----CTA
G cydonium GTGAACAACA ACCTCTTTAC AGCGGAAATA TTCGCAGAGG CTCTGAGGAA CGGAACACTT
A. aerophob GTG-----

```

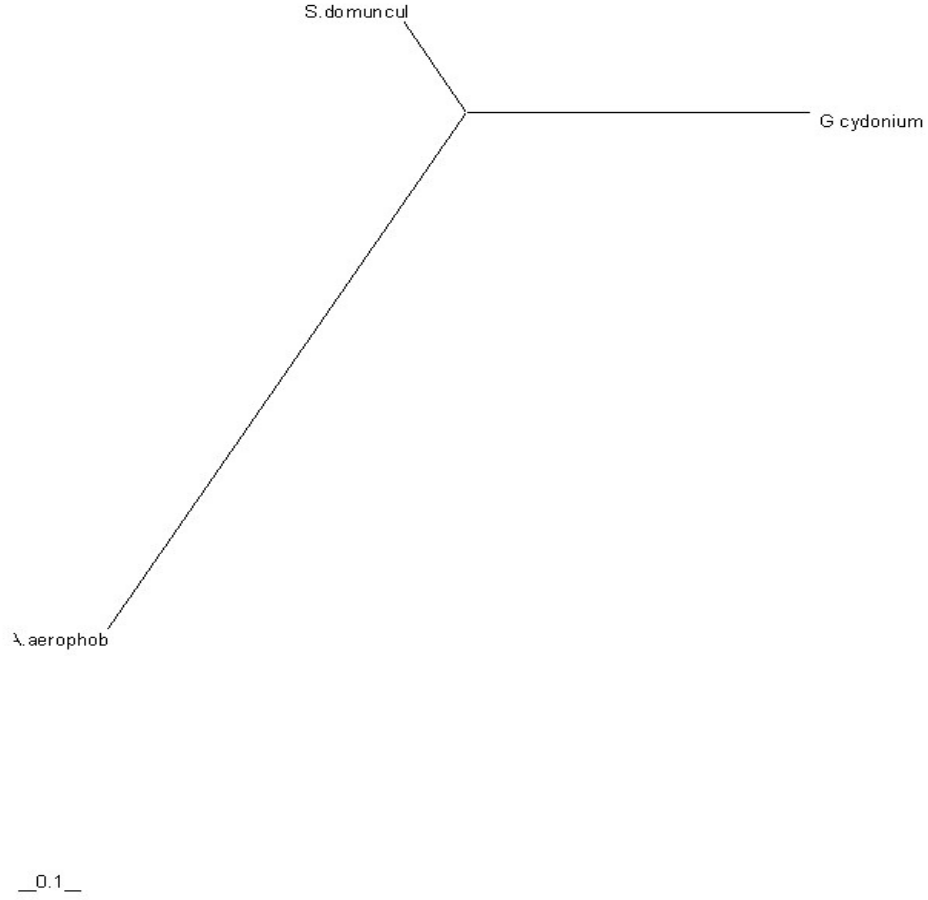
Şekil 4.11 *A. aerophoba*'ya ait integrin β_1 kodlayan gen bölgesi kısmi dizininin *S. domuncula* ve *G. cydonium*'a ait ilgili gen bölgeleriyle çoklu karşılaştırması (multiple alignment).

Genetik manada *S. domuncula*, *G. cydonium* ile *A. aerophoba* arasında uçurumlar olduğu olduğu görüldü. Konfokal mikroskop görüntüleri daha anlamlı sonuçlar ortaya koymuştur. Tanımlayıcı molekül olarak monoklonal antikorlar kullanılması epitopik düzeyde reaktiviteyi hatta bunun ötesinde özdeşliği ifade etmektedir. Genetik analizlerinde ortaya koyduğu gibi nükleotid dizinindeki uyumsuzluk integrin β_1 monoklonal antikorun reaktivitesindeki düşüklükle bir yerde ispatlanmış oluyor. İnternetteki veri bankalarından sadece *S. domuncula* sekansları bulundu, primer design'ı yapılırken yalnızca bu sekanslar kullanıldı, oysa ki sadece integrinden elde edilen sekans sonuçları *S. domuncula* integrini ile *A. aerophoba* integrini arasında %20 civarında identite matriksi verdi. Bu oran Çizelge 2.3'te verilen integrin β alt ünitesi farklı canlılar arasındaki sekans karşılaştırmasında yer alan sonuçlar göz önüne alındığında ilginç görünmektedir. Brower et al.'un (1997) çalışmasında kullandığı sünger türü *O. tenius* integrin β alt ünitesi ile insan integrin β alt ünitesi arasındaki %49 aynılık ve %38 identiklik sonucuna dayanarak *A. aerophoba* türü içinde uygulanması ilginç sonuçlar verebilir. *A. aerophoba* türünün *G. cydonium* ve *S. domuncula* türlerine olan nükleotid identiklik oranı abaca insan integriniyle identiklik kıyaslamasında nasıl bir sonuç verecektir, bu üzerinde durulması gereken bir nokta olabilir. Buradan yola çıkarak diğer kollajen I ve II'ye ait RTPCR çalışmalarında spesifik ampikon elde edilememesi sebebi olarak değişik türler arasındaki bu derece ciddi sekans farklılıkları olabileceği düşünülmektedir.

Bunun yanısıra örneğin *C. reniformis* türü konfokal görüntüleri kollajen tip I için, memeli türleriyle yüksek derecede uyumlu kollajen varlığını göstermiştir. Buradan bu türün yüksek kalitede kollajene sahip olması nedeniyle kollajen kaynağı olarak kullanılabileceğine dair bir sonuç çıkarılabilir. Bu tür bir çalışma ise şu an proje aşamasında olup, EU 6. çerçeve programında yer almaktadır.

4.3.4 Filogenetik Analiz

Elde edilen kısmi Integrin β_1 dizinlerinin DNADIST ve bunun temelinde yapılan Neighborhood-Joining analizi sonunda, *S. domuncula* ve *G. cynodium*'un birbirine *A. aerophoba*'dan daha yakın oldukları tespit edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Sünger türlerine ait İntegrin B1 kodlayan kısmi gen dizilerinin Filogenetik analizi. Dendogram, dizilerin PHYLIP 3.16 programı (Felsenstein, 1989) ile DNADIST ve NEIGHBOR ardışık analizlerinin yapılmasını takiben Treeview (Page, 1996) programı ile çizdirildi. Bar 0.1 nükleotid değişimini ifade etmektedir.

5. SONUÇ

Karasularımızdaki süngerler arasından çok sınırlı sayıda örnek kullanılarak yapılan bu çalışma sonucunda, değişik türlerde memeli kollajen tip I, tip II, tip IV ve integrin β_1 proteinleriyle veya altyapılarıyla uyumlu yapılara immünohistokimyasal olarak değişik oranlarda tespit edilmiş olmasına rağmen, genetik çalışmaların esasını teşkil eden ve referans dizinler olarak kullanılan *S. domuncula* dizinleri ile diğer sünger tipleri arasında kitlesel nükleotid dizinleri farkları nedeniyle beklenen detaylar elde edilememiştir. Bu noktada sağlıklı olarak elde edilen tek dizin *A. aerophoba* türünün integrin β_1 gen bölgesine ait kısmi dizinidir. Elde edilen bulguların genel değerlendirilmesi ülkemiz karasularındaki bu biyolojik birimlerin kollajen başta olmak üzere diğer proteinler açısından önemli bir kaynak olarak çok yakın bir gelecekte kullanılabileceği yönündedir, buna yönelik olarak zaman kaybetmeden karasularımızdaki potansiyel teşkil eden ve etmesi muhtemel sünger türlerinin genetik ve biyokimyasal analizlerinin ve karakterizasyonlarının tamamlanarak deniz yetiştiriciliği (marikültür) metoduyla üretilmesi ve üretim sonrası değerlendirme alternatiflerinin sorgulanması gerekmektedir.

Bu çalışmanın bir devamı mahayitedinde araştırma gurubumuz 6. çerçeve kapsamındaki Avrupa Birliği destekli SPONGES Projesinde (Cooperative Research-CRAFT project entitled SPONGES) ülkemiz karasularındaki biyoaktif molekül ürettiği tespit edilen sünger türlerine yönelik denizel yetiştiricilik ön denemelerine başlamış bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında seçilen iki sünger türünden (*D. avara* ve *C. reniformis*) bir takım medikal formüllerde biyolojik materyal olarak faydalanılması amaçlanmaktadır. Denemelerde süngerlerin ortam şartlarına olan tepkilerini ve dolayısıyla gelişme düzeylerini kıyaslamak amaçlı olarak iki farklı yetiştirme noktası belirlenmiştir. 1- Doğal koşullardan (besin, akıntı, ışık, substrat vs.) maksimum seviyede fayda sağlamalarını olarak tanımak için, doğal sünger popülasyonlarının yakın çevresi 2- Besin açısından avantaj dolayısıyla beraberinde gelişme hızı getirebilecek olan balık çiftlikleri. Bu düşünce 5. uluslararası Sünger Konferansında bu konuya değinen Pronzato et al. (1998) tarafından ilk olarak ortaya atılmıştır. Bu düşüncenin altında ise balık çiftliklerine verilen besinin tamamının tüketilememesi, bir kısım partiküllerin kafeslerin dışına taşması ve ortamdaki çeşitli planktonun sayılarının artışı ile ilgilidir. Ülkemizde ve dünyada büyük problem yaratan ve sonu bitmeyen tartışmalara sebebiyet veren yüzer balık çiftliklerinin çevreye olan etkilerinin süngerlerin etkin boyuttaki filtre kabiliyetleriye azaltılabileceği düşüncesi bu

yöntemin bizim denemelerimizde değerli bir alternatif olarak yer almasına neden olmuştur. Bahsedilen ön denemeler 6 ay sürecektir ve başarı durumunda ise halen üzerinde çalışılan daha sonraki basamaklara geçilmesi planlanmaktadır.

Son olarak denizlerimize yönelik yapılan araştırmaların azlığı göz önüne alınırsa ve bu çalışmanın değindiği deniz canlıları, süngerlerin önemli biyomedikal ve biyoteknolojik potansiyelleri düşünülürse, bu paralelde ülkemizde süngerlerde dahil olmak üzere deniz canlılarına yönelik araştırmaların artması gerekmektedir. Yapılan bu çalışmanın, yıllardır bir şekilde göz ardı edilen denizaltı potansiyellerimizden süngerlerle çalışacak bilim insanlarına ve yetiştiricilerine ışık tutacağı ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Aiello, A., Fattorusso, E., Menna, M. 1999. Steroids from sponges: recent reports. *Steroids* 64, 687-714.
- Ang, K.K.H. Holmes, M.J. Higa, T. Hamann, M.T. Kara, U.A.K. 2000. In vivo antimalarial activity of the betacarboline alkaloid manzamine A. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 1645–49.
- Ankel, W.E. and Eigenbrodt, H. 1950. Über die Wuchsform von Spongilla in sehr flachen Raumen. *Zool Anz* 145:195–204.
- Barthel, D. 1986. On the ecophysiology of the sponge *Halichondria panicea* in Kiel Bight, I. Substrate specificity, growth and reproduction. *Mar Ecol Prog Ser* 32:291–298.
- Barthel, L.K., and Raymond, P.A. 1990. Improved method for obtaining 3 micron cryosections for immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 38:1383-1388.
- Battershill, C.N. and Page, M. 1996. Sponge aquaculture for drug production. *Aquaculture Update Spring*: 5–6.
- Battershill, C.N., Page, M.J., Munro, M.H.G. (2002). A chemical ecology of sponges in culture. *Boll. Mus. Ist Biol. Univ. Genova* 66-67, 23.
- Belarbi, E.H. Gomez, A.C. Chisti, Y. Camacho, F.G. Grima, E.M. 2003. Producing drugs from marine sponges. *Elsevier Biotechnology Advances* 21: 585–598
- Bergmann, W., and Feeney, R.J. (1951). Nucleosides of sponges: discovery of the arabinose-based nucleosides—*Tethya crypta*. *J Org Chem* 16:981–987.
- Bergquist, P.R. 1978. Sponges. London, Hutchinson & Co.
- Boute, N. Exposito, J.Y. Boury-Esnault, N. Vacelet, J. Noro, N. Miyazaki, K. Yoshizato K. and Garrone R. 1996. Type IV collagen in sponges, the missing link in basement membrane ubiquity. *Biology of the Cell* 88, (37–44)
- Bultel-Poncé, V., J.P. Berge, C. Debitus, J.L. Nicolas, and M. Guyot. 1999. Metabolites from the Sponge-Associated Bacterium *Pseudomonas* Species. *Mar. Biotechnol.* 1, 384-390.
- Brower, D.L. Brower, S.M. Hayward, D.C. Ball, E.E. 1997. Molecular evolution of integrins: genes encoding integrin b subunit from a coral and a sponge. *Proc Natl Acad Sci USA*94:9182–9187.
- Can, A. Bilecenoğlu, M. 2005. Türkiye denizlerinin dip balıkları atlası. Arkadaş Yayınevi, 224, Ankara
- Can, A. Gokalp, M., 2005. Marine Sponges of Eastern Mediterranean Turkish Coast. *Biotechnology Congress*, 15-199 2005, Ankara.
- Cahn, A.R. 1948. Japanese sponge culture experiments in the South Pacific Islands. *US Fish Wildl Serv, Fish Leaflet* 309.
- Chisti, Y. 2000. Animal-cell damage in sparged bioreactors. *Trends Biotechnol*; 18:420–32.
- Chisti, Y. 2001. Hydrodynamic damage to animal cells. *Crit Rev Biotechnol* ; 21:67–110.
- Clare, A.S., 1996. Biofouling. 9, 211-229.
- Cotte, J. (1908). Sponge culture. *Bull Bur Fish* 28:587–614.
- Custodio, M.R. Imsiecke, G. Borojevic, R. Rinkevich, B. Rogerson, A. Müller, W.E.G. 1995. Evolution of cell adhesion systems: evidence for Arg-Gly-Asp-mediated adhesion in the protozoan *Neoparamoeba aestuarina*. *J. Euk. Microbiol.* 42, 720-724.
- Custodio, M.R. Prokic, I. Steffen, R. Koziol, C. Borojevic, R. Brümmer, F. Nickel, M. Müller, W.E.G. 1998. Primmorphs generated from dissociated cells of the sponge

- Suberites domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Dev.* 105, 45-59.
- De Rosa, S. De Caro, S. Tommonaro, G. Slantchev, K. Stefanov, K. Popov, S. 2001. Development in a primary cell culture of the marine sponge *Ircinia muscarum* and analysis of the polar compounds. *Mar. Biotechnol.* 3, 281-286.
- De Rosa, S. 2002. Mediterranean marine organisms as source of new potential drugs. In: Rauter, A., Palma, F.B., Justino, J., Araujo, M.E., Santos, S.P. (eds.). *Natural Products in the New Millennium: Prospects and Industrial Applications*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 441-461.
- De Rosa, S. De Caro, S. Iodice, C. Tommonaro, G. Stefanov, K. Popov, S. 2003. Development in primary cell culture of demosponges. *J. Biotechnol.* 100, 119-125
- De Sutter, D. and Van de Vyver, G. 1977. Aggregative properties of different cell types of the freshwater sponge *Ephydatia fluviatilis* isolated on Ficoll gradients. *Wilhelm Roux's Arch* 181:151-161.
- De Sutter, D. and Tulp, A. 1981. A method for large scale sponge cells separation: 1 g sedimentation (cellular composition of the fractions obtained. *Biol Cell* 40:63-68.
- Donia and Hamann. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases Vol 3.* 338-48.
- El Sayed, K.A. Bartyzel, P. Shen, X. P.K. Perry, T.L. Zjawiony. J. K. Hamann, M.T. 2000. Marine Natural Products as Antituberculosis Agents. *Tetrahedron*, 56, 949-953.
- Exposito, J.Y. Ouazana, R. & Garrone, R. 1990 *Eur. J. Biochem.* 190, 401-406.
- Faulkner, D.J. 2000. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 17, 7-55.
- Faulkner, D.J. 2001. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 18, 1-49.
- Faulkner, D.J. 2002. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* 19, 1-48.
- Felsenstein, J. 1989: Phylogeni inference package. *Cladistics*, 5, 164-166
- Fossa, S.A. and Nilsen, A.J. 1996. Korallenriff-Aquarium, Band 5. Einzellige Organismen, Schwämme, marine Würmer und Weichtiere im Korallenriff und für das Korallenriff-Aquarium. Kapitel 3: Schwämme. Bornheim: Birgit Schmettkamp Verlag, 35-65.
- Friedrich, A.B. Merkert, H. Fendert, T. Hacker, J. Proksch, P. and Hentschel. U. 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mar. Biol.* 134, 461-470.
- Garrone, R. 1978. Phylogenesis of connective tissue. Basel: Karger Verlag.
- Hassan, A. 2004. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from marine sponges, Heinrich-Heine University, 227 pages, Düsseldorf.
- Hein, I.F. 1981. Block staining of mamalian tissues with hemotoxylin and eosin *Stain Tech.* v 56, p. 119
- Henkart, P. Humphreys, S. Humphreys T. 1973. Characterization of sponge aggregation factor. A unique proteoglycan complex. *Biochemistry* 12:3045-3050.
- Hilbertz, W. Fletcher, D. Krausse, C. 1977. Mineral accretion technology: application for architecture and sea farming. *Ind forum* 8:4-5
- Hooper J. 2000. "Sponguide" - Guide to sponge collection and identification. Internet source <http://www.qmusem.qld.gov.au/naturewelcome>.
- Hooper, John N.A.; van Soest, Rob W.M. A. 2002. Guide to the Classification of Sponges
- Henrikson, A.A. and Pawlik, J.R. 1998. Biofouling. 12, 245-255.
- Heidenhein, 1905. *Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik*, v.22 pp.339.
- Hynes, R. O. 1992. *Cell* 69, 11-25.

- Katağan, T. Kocataş, A. Bilecik, N. Yılmaz, H. 1991. Süngerler ve Süngercilik. 60 sayfa Bodrum Su Ürünleri Araştırma Ens. Yayınları.
- Kinne, O. 1977. Cultivation of animals—research cultivation, 3: Porifera. In: *Marine Ecology, Vol III (Cultivation), part 2*, London: Wiley Interscience, 5.1:627–64.
- Klautau, M., Custodio, M.R., Borojevic, R. (1994). *In vitro* culture of primary cell lines from marine sponges. In: van Soest, R., van Kempen, T.M.G., Braekman, J.C. (eds.). *Sponges in time and space*. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 401-406.
- Koziol, C. Borojevic, R. Steffen, R. and Muller, W.E.G. 1998. Sponges (Porifera) model systems to study the shift from immortal to senescent somatic cells: the telomerase activity in somatic cells. *Mech Ageing Dev* 100:107–120.
- Konig, G.M. Wright, A.D. Sticher, O. Angerhofer, C.K. Pezzuto, J.M. 1994. Biological activities of selected marine natural products. *Planta Med*; 60: 532–37.
- Konig, G.M. Wright, A.D. Franzblau, S.G. 2000. Assessment of antimycobacterial activity of a series of mainly marine derived natural products. *Planta Med*; 66: 337–42.
- Konig, G.M. Wright, A.D. Angerhofer, C.K. 1996. Novel potent antimalarial diterpene isocyanates isothiocyanates and isonitriles from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*. *J Org Chem*; 61: 3259–67.
- Langenbruch, P.F. 1983. Untersuchungen zum Körperbau von Meeresschwämmen, II: das wasserleitungssystem von *Halichondria panicea*. *Helgolander Meeresunters* 36:337–346.
- Labat-Robert, J. Robert, L. Auger, C. Lethias, C. & Garrone, R. 1981. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6261–6265.
- Lee, Y.K. Lee, J.H. and Lee, H.K. 2001. Microbial Symbiosis in Marine Sponges. *Jour. of Mic.*, December, p.254-264
- Ichiba, T. Corgiat, J.M. Scheuer, P.J. Kelly-Borges, M. 1994. 8-Hydroxymanzamine A a β -carboline alkaloid from a sponge *Pachypellina* sp. *J Nat Prod*; 57: 168–70.
- Ilan, M. Contini, H. Carmeli, S. Rinkevich, B. 1996. Progress towards cell cultures from a marine sponge that produces bioactive compounds. *J. Mar. Biotechnol.* 4, 145-149.
- Ireland C.M. Copp, B.R. Foster, MP. McDonald, L.A. Radisky, D.C. Swersey, J.C. 2000. Bioactive compounds from the sea. In: Martin RE Carter EP Davis LM, eds. *Marine and freshwater products handbook*. Lancaster. PA: Technomic Publishing: 641–61.
- MacMillan, S.M. 1996. Starting a successful commercial sponge aquaculture farm. Publication No:120. Waimanalo, Hawaii: Center for Tropical and Subtropical Aquaculture.
- Mayer, A.M.S. Jacobson, P.B. Fenical, W. Jacobs, R.S. and Glaser, K.B. 1998. Pharmacological characterization of the pseudopterosins: novel anti-inflammatory natural products isolated from the Caribbean soft coral, *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Life Sci* 62:L401-L407.
- Mendola, D. 2003. Aquaculture of three phyla of marine invertebrates to yield bioactive metabolites: process developments and economics. *Biomol. Eng.* 20, 441-458.
- Mishra, S.K., Satpathy, S.K., Mohanty, S. 1999. Survey of malaria treatment and deaths. *Bull World Health Organ*; 77: 1020.
- Miyaoka, H. Shimomura, M. Kimura, H. Yamada, Y. 1998. Antimalarial activity of kalihinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge *Acanthella* sp. *Tetrahedron*; 54: 13467–74.
- Moore, H.F. (1910). A practical method of sponge culture. *Bull. US. Bur. Fish.* 28, 545-585.

- Munro, M.H.G., Blunt, J.W., Dumdei, E.J., Hickford, S.J.H., Lill, R.E., Li, S., Battershill, C.N., Duckworth, A.R. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *J. Biotechnol.* 70, 15-25.
- Müller, W.E.G. Falk D. Zahn, R.K. 1973. DNA-dependent DNA polymerase pattern in non-infected and herpes virus infected rabbit kidney cells. *Arch ges Virusforsch*; 42:278–84.
- Müller, W.E.G. 1982. Cell membranes in sponges. *Int Rev Cytol* 77:129–181.
- Müller, W.E.G. Zahn, R.K. Gasic, M.J. Dogovic, N. Maidhof, A. Becker, C. Diehl-Seifert, B. Eich, E. 1985. Avarol, a cytostatically active compound from the marine sponge *Dysidea avara*. *Comp. Biochem. Physiol.* 80, C46-52.
- Müller, W.E.G. Wiens, M. Batel, R. Steffen, R. Borojevic, R. Custodio, M.R. 1999. Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178, 205-219.
- Müller W, Blumbach B, Müller I (1999a). Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates. *Transplantation* 68: 1215-1227.
- Müller W, Wiens M, Batel R, Steffen R, Schröder H, Borojevic R, Custodio M (1999b). Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs. *Marine Ecology Progress Series* 178: 205-219.
- Müller WEG, Wimmer W, Schatton W, Böhm M, Batel R, Filic Z (1999c). Initiation of an Aquaculture of sponges for the sustainable production of bioactive metabolites in open systems: Example, *Geodia cydonium*.
- Müller, W.E.G. Böhm, M. Batel, R. De Rosa, S. Tommonaro, G. Müller, I.M. Schröder, H.C. 2000. Application of cell culture for the production of bioactive compounds from sponges: synthesis of avarol by primmorphs from *Dysidea avara*. *J. Nat. Prod.* 63, 1077-1081.
- Müller, W.E.G. 2003. Sponges (Porifera) Berlin: Springer.
- Müller WEG, Schroder HC, Wiens M, Perovic-Ottstadt, Batel R, Muller IM. 2004. Traditional and modern biomedical prospecting: Part II—the benefits. Approaches for a sustainable exploitation of biodiversity (secondary metabolites and biomaterials from sponges). eCAM;1.
- Nasu, S.S. Yeung, B.K.S. Hamann, M.T. Scheuer, P.J. Kelly-Borges, M. Goins, K.D. 1995. Puupehenone-related metabolites from two Hawaiian sponges *Hyrtios* spp. *J Org Chem*; 60: 7290–92.
- Nickel, M., Leininger, S., Proll, G., Brümmer, F. 2001. Comparative studies on two potential methods for the biotechnological production of sponge biomass. *J. Biotechnol.* 92, 169-178.
- Nickel, M., Brümmer, F. 2003. *In vitro* sponge fragment culture of *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847). *Mar. Biotechnol.* 100, 147-159.
- Osinga, R. Tramper, J. and Wijffels, R.H. 1998a. Cultivation of marine sponges for metabolite production: applications for biotechnology? *Trends Biotechnol* 16:130–134.
- Osinga, R. Planas Muela, E. Tramper, J. and Wijffels, R.H. 1998b. *In vitro* cultivation of four marine sponge species: determination of the nutritional demands. In: *Marine Microorganisms for Industry*. LeGal, Y., and Muller-Feuga, A. (eds.). *Actes des colloques 21*. Plouzane´: IFREMER, 121–127.
- Osinga, R., Tramper, J., Wijffels, R.H. 1999. Cultivation of marine sponges. *Mar. Biotechnol.* 1, 509-532.

- Osinga, R. Armstrong, E. Burgess, J.G. Hoffmann, F. Reitner, J. Schumann-Kindel, G. 2001. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiologia* 461, 55-62.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-35.
- Pancer, Z. Kruse, M. Muller, I. & Muller, W. E. G. 1997. *Mol. Biol. Evol.* 14, 391–398.
- Pawlik, J.R., Chanas, B., Toonen, R.J., and Fenical, W. (1995). Defenses of Caribbean sponges against predatory fish, I: chemical deterrence. *Mar Ecol Prog Ser* 127:183–194.
- Pomponi, S.A., Willoughby, R. 1994. Sponge cell culture for the production of bioactive metabolites. In: van Soest, R., van Kempen, T.M.G., Braekman, J.C. (eds.). *Sponges in time and space*. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, 395-400.
- Pomponi, S.A. Willoughby, R. Kaighn, M.E. Wright, A.E. 1997. Developments of techniques for *in vitro* production of bioactive natural products from marine sponges. In: Maramorosch, K., Mitsuhashi, J. (eds.). *Invertebrate Cell Culture: novel directions and biotechnology applications*. Science Publishers, USA, 231-237.
- Pomponi, S.A. 1999. The bioprocess-technological potential of the sea. *J Biotechnol* 70:5–13.
- Perry, T.L. Dickerson, A. Khan, A.A. 2001. New peroxy lactones from the Jamaican sponge *Plakinastrella onkodes* with inhibitory activity against the AIDS opportunistic parasitic infection *Toxoplasma gondii*. *Tetrahedron*; 57: 1483–87.
- Pettit, G.R. Knight, J.C. Collins, J.C. Herald, D.L. Young, V.G. 2000. Antineoplastic agents 430 Isolation and structure of cribrostatins 3 4 and 5 from the Republic of Maldives *Cribrichalina* sp. *J Nat Prod*; 63: 793–98.
- Pfeifer, K. Haasemann, M. Gamulin, V. Bretting, H. Fahrenholz, F. Muller, W.E.G. 1993. S-type lectins occur also in invertebrates: high conservation of the carbohydrate recognition domain in the lectin genes from the marine sponge *Geodia cydonium*. *Glycobiol* 3:179–184.
- Proksch, P., Ebel, R. Edrada, R.A., Wray, V. and Steube, K. 2003. In marine Molecular Biotechnology. Springer-Verlag, Berlin. Pp 177-142.
- Pronzato, R., Bavastrello, G. Cerrano, C., Magnino, G., Manconi, R., Pantelis, J., Sara, A., Sidri, M. 1998. Sponge farming in the Mediterranean sea: new perspectives. 5th International sponge farming symposium. Brisbane, Australia.
- Pronzato, R. 1999. Sponge fishing, disease and farming in the Mediterranean Sea. *Aquatic Conser Mar Freshwater Ecosyst* 9:485-493
- Rinkevich, B. 1999. Cell cultures from marine invertebrates: obstacles, new approaches and recent improvements. *J. Biotechnol.* 70, 133-153.
- Sarin, P.S. Sun, D. Thornton, A. Müller, W.E.G. 1987. Inhibition of replication of etiologic agent of AIDS by avarol and avarone. *J Natl Cancer Inst*;78:663–6.
- Schmidt, T.M. DeLong, E.F. and Pace, N.R. 1991. Analysis of a picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J. Bacteriol.* 173, 4371-4378.
- Schröder, H.C. Bégin, M.E. Klöcking, R. Matthes, E. Sarma, A.S. Gašić, M.J. Müller, W.E.G. 1991. Avarol restores the altered prostaglandin and leukotrin metabolism in monocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Virus Res.* 21, 213-223.
- Schröder, H.C. Krasko, A. Batel, R. Skorokhod, A. Pahler, S. Kruse, M. Müller, I.M. Müller, W.E.G. 2000. Stimulation of protein (collagen) synthesis in sponge cells by

- a cardiac myotrophin-related molecule from *Suberites domuncula*. *FASEB. J.* 14, 2022-2031.
- Seibert, G. Raether, W. Dogovic, N. Gasic, M.J. Zahn, R.K. Müller, W.E.G. 1985. Antibacterial and antifungal activity of avarone and avarol. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene A* 260, 379-386.
- Simpson TL 1984. The cell biology of sponges. New York, Springer.
- Sipkema, D. 2004. Cultivation of Marine Sponges: From Sea to Cell PhD.Thesis, Wageningen University, 184 p., Wageningen.
- Spier RE. 2000 Encyclopedia of cell technology, vols.1 and 2. New York:Wiley; p.1–1249.
- Thakur and W.E.G. Müller. 2004. Biotechnological potential of marine sponges. *Current Science*, Vol. 86, No. 11,10
- Thompson, J.E. (1985). Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. I. Biological evidence. *Mar. Biol.* 88, 23-26.
- Torres, Y.R., Berlinck, R.G.S., Nascimento, G.G.F., Fortier, S.C., Pessoa, C., De Moraes, M.O. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon* 40, 885-891.
- Wagner-Hulsmann, C. Bachinski, N. Diehl-Seifert, B. Blumbach, B. Steffen, R. Pancer, Z. Muller, WEG. 1996. A galectin links the aggregation factor to cells in the sponge [*Geodia cydonium*] system. *Glycobiology* 6:785–793.
- Webster, N.S. and Hill, R.T. 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by a Proteobacterium. *Mar. Biol.* 138, 843-851.
- Wilson, H.V. 1907. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges. *J Exp Zool* 5:245–258.
- Wilkinson, C.R. (1978a). Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar. Biol.* 49, 169-176.
- Wilkinson, C.R. (1978b). Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the *in situ* associations in coral reef sponges. *Mar. Biol.* 49, 177-185.
- Wilkinson, C.R. (1978c). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* 49, 161-167.
- Wilkinson, C.R. and Fay, P. 1979. Nitrogen fixation in coral reef sponges with symbiotic cyanobacteria. *Nature* 279, 527- 529.
- Wilkinson, C.R., Garonne, R. 1980. Nutrition of marine sponges. Involvement of symbiotic bacteria in the uptake of dissolved carbon. In: Smith, D.C., Tiffon Y. (eds). *Nutrition in the lower metazoa*. Oxford, Pergamon Press, 157-161.
- Wilkinson, C.R. 1987. significance of microbial symbionts in sponge evolution and ecology. *Symbiosis* 4, 135-146.
- Wijffels, R.H. Osinga, R. Pomponi, S. Tramper, J. 2001. Marine sponges as biocatalysts. In: Cabral, J.M.S. Mota, M. Tramper, J. *Multiphase bioreactor design*. London: Taylor & Francis; p. 477– 93.
- Wimmer, W. Perovic, S. Kruse, M. Krasko, A. Batel, R. and Muller, W. E. G. 1999. Origin of the integrin-mediated signal transduction: functional studies with cell cultures from the sponge *Suberites domuncula*. *Eur. J. Biochem.* 260, 156–165
- Vacelet, J. 1975. Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dyctiocerata). *Journal de microscopie Biologie cellulaire* 23: 271-288.
- Vacelet, J. 1985. Bases historiques et biologiques d'une éventuelle spongiculture. *Océanis* 11:551–584.

- Yousaf, M., El Sayed, K.A., Rao, K.V., Lim, C.W., Hu, J.-F., Kelly, M., Franzblau, S.G., Zhang, F., Peraud, O., Hill, R.T., Hamann, M.T. 2002. 12,34-Oxamanzamines, novel biocatalytic and natural products from manzamine producing Indo-Pacific sponges. *Tetrahedron* 58, 7397-7402.
- Zhang, W. Zhang, X. Cao, X. Xu, J. Zhao, Q. Yu, X. Jin, M. Deng, M. 2003a. Optimizing the formation of *in vitro* sponge primmorphs from the Chinese sponge *Stylotella agminata* (Ridley). *J. Biotechnol.* 100, 161-168.
- Zhang, X. Cao, X. Zhang, W. Yu, X. Jin, M. 2003b. Primmorphs from archaeocytes-dominant cell population of the sponge *Hymeniacidon perleve*: improved cell proliferation and spiculogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* 84, 583-590.

İnternet Kaynakları

- <http://www.ldeo.columbia.edu/edu/dees/ees/life/slides/phyla/porifera.html>
- <http://www.ucmp.berkeley.edu/porifera/porifera.html>
- <http://www.ucmp.berkeley.edu/porifera/pororg.html>
- <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Porifera.html>
- <http://www.uni-essen.de/nomatec/>
- <http://tolweb.org/tree?group=Porifera&contgroup=Animals>
- <http://www.interchg.ubc.ca/csmecher/sponge.htm>
- <http://www.habitas.org.uk/marinelife/index.html>
- <http://nephi.unice.fr/Medifaune/HTM/por/lpo001.htm>
- <http://ebiomedica.com/prod/BOanimals.html>
- <http://www.marbef.org/training/porifera/#1>
- <http://www.mer-littoral.org/02/spongiaires-2.php>
- <http://www.mer-littoral.org/02/galerie-spongiaires.php>
- <http://www.qmuseum.qld.gov.au/naturewelcome>

- EK1-

> *A. aerophoba* Integrin β 1 kısmi dizini

```
ACCAGTACAGACAGAGGGACTTGTGTGTGTGGAGAGTGTCAATGTAGGAGAG
ACTCAGCTGGTAACCCCATTTACTTTGGACCTGCTTGCGAGTGTGACCGTTC
CAGTTGTCCATCTTTCAATGGGGAGCTTTGTGCTGGTCGTGGTGCCTGTACA
TGTGACGGTTGTCGTTGCAATTTGGAACCAAATACTCAACAACCTTACTTTG
GAACGGCTTGCGAGTGTTCAACCGATACCAATTGTGTAGATCCTAACAACTC
CACTGATATCTGCAATGGACGTGGTACCTGCGGCTGCAGTGGACGATGTGAT
TGTCAATTCCCATATCGTGGTGACTTCTGTGAAGTCTGTTCTGGAGATGAAA
GCTGCTTTGATCTTACTTGTGACAGCAATGCAGAGTGCGCCAACTGCGCTGT
TGATATTCTGGACCTGTTCCCAATGTCAACGAATCTGACGTTCTTCACGAAT
GAAACTCTAAACAGTCTACCAAATGGGACTAGTCTGACATACGATGCACTTT
CCAACACATTCAGACTGAGACTCCCCACTGGTGAGTGCCCCGAGACGTGTTT
CCCTGTTGTTATTATCAATGGTACTGATGATGTGGACTATATGATACAGGAT
GAGATGTCCATTCGTTGTGAACTTGTGAGGGGATGCACCTATCGTTATTATG
TTGCCGTCAATGAG
```

ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 1978 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1997 yılında girdiği O.D.T.Ü Mühendislik Fakültesi Petrol ve Doğalgaz Mühendisliği Bölümü'nden 2001 yılında Petrol Mühendisi ünvanıyla mezun oldu. Eylül 2001 - Haziran 2002 yılları arasında, O.D.T.Ü Mühendislik Fakültesi Petrol ve Doğalgaz Mühendisliği Bölümü'nde Yüksek Lisans öğrenimine başlayıp, Ağustos 2002- Kasım 2003 yılları arasında burslu olarak kabul edildiği Miami Üniversitesi Rosenstiel Deniz ve Atmosfer Bilimleri Fakültesi Fiziksel Oşinografi Bölümü'nde araştırma görevlisi olarak devam etti.

Halen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans öğrenimine devam etmektedir.