

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Chlamydomonas reinhardtii YEŞİL ALGİNDE AĞIR
METAL STRESİ VARLIĞINDA ISI ŞOKU PROTEİNİ VE
METALLOTİYONİN EKSPRESYONUNUN
İNCELENMESİ

139628

Prof. Dr. Nezhun Gören
N. Gören

Prof. Dr. Günseli KURT
Biyolog Günseli KURT

Prof. Dr. Güler Temizhan
G. Temizhan

F.B.E Biyoloji Anabilim Dalında
Hazırlanan

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doc. Dr. Ayşepül Gopal Sarıkaya

Prof. Dr. Sule Arı

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nezhun GÖREN (Y.T.Ü.)
İkinci Tez Danışmanı : Prof. Dr. Abdul Rezzak MEMON (TÜBİTAK)

İSTANBUL, 2003

TEZ YÜKLEME
DOKÜMANLARI ENSTİTÜSÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	iii
KISALTMA LİSTESİ.....	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÇİZELGE LİSTESİ.....	vii
ÖNSÖZ.....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	3
2.1 Ağır Metal Kirliliği	3
2.2 Ağır Metal Kirliliğinin Giderilmesi	7
2.2.1 Ağır Metal Gideriminde Kullanılan Klasik Yöntemler.....	7
2.2.2 Alglerin Ağır Metal Gideriminde Kullanılması	7
2.2.2.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Yeşil Algi	9
2.3 Alglerde Ağır Metal Stresine Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları.....	11
2.3.1 Metallerin Plazma Membranından Geçişini Engelleyen Mekanizmalar.....	11
2.3.2 Metallerin Plazma Membranından Dışarı Verilmesini Sağlayan Mekanizmalar..	12
2.3.3 Hücre İçinde Metal İyonlarının Detoksifikasyonunu Sağlayan Mekanizmalar	12
2.3.3.1 Metalotiyoninler.....	13
2.3.3.2 Isı Şoku Proteinleri.....	16
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Kullanılan organizmalar.....	18
3.1.2 Kullanılan Besiyerleri.....	18
3.1.2.1 TAP Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanmasında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	18
3.1.2.2 “Luria Bertani” Besiyeri.....	19
3.1.3 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler.....	19
3.1.3.1 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	19
3.1.3.2 DNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	21
3.1.3.3 Protein Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	22
3.2 Metod.....	24
3.2.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Yeşil Alg Kültürü	24
3.2.2 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarının Farklı Bakır Konsantrasyonlarında Üreme Eğrilerinin Çıkarılması	24
3.2.3 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Toplama Kapasitesinin Belirlenmesi.....	24

3.2.4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Varlığında HSP70 ve Metalloitiyonin Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi	26
3.2.4.1	Radyoaktif İşaretli Probların Hazırlanması	26
3.2.4.2	RNA Deneylerinde Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması	31
3.2.4.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Hücrelerinden RNA İzolasyonu	31
3.2.4.4	RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi	33
3.2.4.5	Denatüre Edici Agaro Jel Elektroforezi	33
3.2.4.6	Northern Blotting	33
3.2.4.7	Otoradyografi	35
3.2.5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun Protein Düzeyinde İncelenmesi	35
3.2.5.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Yeşil Alg Kültüründen Protein Ekstraksiyonu	35
3.2.5.2	Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	37
3.2.5.3	Protein Elektroforezi	37
3.2.5.4	Protein Örneklerinin Jele Yüklenmesi	38
3.2.5.5	Protein Jellerinin Boyanması	39
3.2.5.6	Bakır Boyama	39
4.	BULGULAR	40
4.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Yeşil Alg Kültürü	40
4.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarının Farklı Bakır Konsantrasyonlarında Üreme Eğrileri	40
4.3	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Toplama Kapasitesinin Belirlenmesi	42
4.4	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Varlığında HSP70 Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi	45
4.5	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi	49
4.6	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun Protein Düzeyinde İncelenmesi	56
4.6.1	Protein Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu	56
4.6.2	Protein Miktarının Belirlenmesi	57
4.6.3	Metalloitiyonin Protein Ekspresyonunun Doğal PAGE ile İncelenmesi	58
5.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	62
	KAYNAKLAR	68
	İNTERNET KAYNAKLARI	72
	ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGE LİSTESİ

Ag	Gümüş
Al	Alüminyum
As	Arsenik
Au	Altın
Ba	Baryum
°C	Santigrat derece
μCi	Mikro küri
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
Cd	Kadmiyum
cm	Santimetre
Co	Kobalt
Cr	Krom
Cu	Bakır
dH_2O	Distile su
ddH_2O	İki kez distile edilmiş su
Fe	Demir
Hg	Civa
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
l	Litre
m^3	Metre küp
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
Mn	Manganez
Mo	Molibden
N	Normalite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
Pb	Kurşun
pg	Pikogram
ppb	Milyarda bir kısım
ppm	Milyonda bir kısım
Sn	Kalay
rpm	Devir/dakika
v/v	Hacim/hacim
w/v	Ağırlık/hacim
w/w	Ağırlık/ağırlık
Zn	Çinko

KISALTMA LİSTESİ

a.a.	Amino Asit
AAS	Atomik Absorpsiyon Spektrometrisi
A ₂₆₀	260 nm Dalga Boyunda Yapılan Absorbsiyon
A ₂₈₀	280 nm Dalga Boyunda Yapılan Absorbsiyon
A ₅₉₅	595 nm Dalga Boyunda Yapılan Absorbsiyon
Ab	Antikor
bç	Baz Çifti
BSA	Sığır Serum Albumini
Cys	Sistein
dATP	Deoksiadenozin 5'-trifosfat
dCTP	Deoksitozin 5'-trifosfat
DEPC	Dietilpirokarbonat
dGTP	Deoksiguanozin 5'-trifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonukleik Asit
DTT	Ditiyotritol
dTTP	Deoksitimidin 5'-trifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ER	Endoplazmik Retikulum
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik Asit
HS	Isı Şoku
HSE	Isı Şoku Elementi
HSF	Isı Şoku Faktörü
HSP	Isı Şoku Proteini
HSP70	70 kDa Ağırlığındaki Isı Şoku Proteini
HSP70	70 kDa Ağırlığındaki Isı Şoku Proteinini Kodlayan Gen
Lys	Lizin
Met	Metionin
MOPS	3-[N-Morfolino] propansülfonik asit
MT	Metallotiyonin
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
PAGE	Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
PC	Fitokelatin
PEG	Poli etilen glikol
PMSF	Fenil Metil Sülfonil Fluorid
RNA	Ribonukleik Asit
RNaz	Ribonukleaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS/PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat/ Poliakrilamid Jel Elektroforezi
TEMED	N,N,N',N'- tetrametil etilendiamin
UV	Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> yeşil alginin elektron mikrografı	9
Şekil 2.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10
Şekil 3.1	<i>HSP70B</i> DNA'sını taşıyan pUC18 vektörü	26
Şekil 3.2	MT-1b DNA'sının içinde bulunduğu pBSK klonlama vektörü.....	27
Şekil 4.1	Katı ve sıvı TAP besiyerinde yetiştirilmiş bir haftalık <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> yeşil alg kültürleri.....	40
Şekil 4.2	0,50, 100 μM CuCl_2 varlığında yetiştirilen CC-1690 hücrelerine ait üreme eğrisi.....	41
Şekil 4.3	0, 50, 100 μM CuCl_2 varlığında yetiştirilen CC-400 hücrelerine ait üreme eğrisi	41
Şekil 4.4	0, 50, 100 μM CuCl_2 varlığında yetiştirilen pCB 740 hücrelerine ait üreme eğrisi.....	42
Şekil 4.5	CC-1690 hücrelerinde CuCl_2 biyokonsantrasyon faktöründeki değişim.....	43
Şekil 4.6	CC-400 hücrelerinde CuCl_2 biyokonsantrasyon faktöründeki değişim.....	44
Şekil 4.7	pCB 413 suşuna ait <i>HSP70B</i> fragmenti	45
Şekil 4.8	0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerine ait RNA örnekleri.....	46
Şekil 4.9	<i>HSP70B</i> DNA'sının, pCB 740 <i>HSP70B</i> mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram	46
Şekil 4.10	0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerine ait RNA örnekleri.....	48
Şekil 4.11	pCB 873 <i>HSP70B</i> mRNA'sının <i>HSP70B</i> DNA'sı tarafından belirlenmediğini gösteren otoradyogram	48
Şekil 4.12	<i>Vicia faba</i> MT-1b fragmenti	49
Şekil 4.13	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku ile indüklenen pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram.....	50
Şekil 4.14	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku ile indüklenen pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram.....	50
Şekil 4.15	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram ..	51
Şekil 4.16	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram ..	52
Şekil 4.17	0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerine ait RNA örnekleri	53
Şekil 4.18	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram.....	54
Şekil 4.19	0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerine ait RNA örnekleri.....	55
Şekil 4.20	<i>Vicia faba</i> MT-1b DNA'sının 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram.....	55
Şekil 4.21	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> yeşil alginden farklı yöntemlerle özütlenen proteinlerin SDS-PAGE analizi	56

Şekil 4.22	BSA standartlarına göre çizilen kalibrasyon eğrisi	57
Şekil 4.23	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-1690 metallothiyonin proteinleri.	59
Şekil 4.24	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 100 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-1690 metallothiyonin proteinleri.	59
Şekil 4.25	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50, 100, 500, 1000 μM CuCl_2 ile 24 saat indüklenmiş CC-1690 metallothiyonin proteinleri.....	60
Şekil 4.26	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallothiyonin proteinleri.	60
Şekil 4.27	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 100 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallothiyonin proteinleri.	61
Şekil 4.28	% 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50, 100, 500, 1000 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallothiyonin proteinleri	61

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3.1	pCB413 <i>HSP70B</i> fragmentini taşıyan pUC18 plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu.....	29
Çizelge 4.1	CC-1690 hücreleri tarafından biriktirilen CuCl_2 miktarı ve CuCl_2 'nin hücrelerdeki Biyokonsantrasyon Faktörü	43
Çizelge 4.2	CC-400 hücreleri tarafından biriktirilen bakır miktarı ve biyokonsantrasyon faktörü	44
Çizelge 4.3	0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	46
Çizelge 4.4	0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	47
Çizelge 4.5	0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	51
Çizelge 4.6	0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	52
Çizelge 4.7	0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılmış pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	53
Çizelge 4.8	0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılmış pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları	54
Çizelge 4.9	Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesinde kullanılan standart proteinlerin absorpsiyon ve konsantrasyonları	57
Çizelge 4.10	CC-400 süpernatant fraksiyonundan elde edilen proteinlerin BCA yöntemine göre belirlenen 595 nm'deki absorbans değerleri ve konsantrasyonları	58
Çizelge 4.11	CC-1690 süpernatant fraksiyonundan elde edilen proteinlerin BCA yöntemine göre belirlenen 595 nm'deki absorbans değerleri ve konsantrasyonları	58

ÖNSÖZ

Öncelikle en zor anlarımdaki cesaret ve umut verici yaklaşımları ve sonsuz desteği ile bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesini sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Nezhun Gören'e teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Deneylerin gerçekleştirilebilmesi için laboratuvar koşullarından yararlanmamı sağlayan TÜBİTAK-GMBAE Bitki Moleküler Genetiği Laboratuvar Sorumlusu danışman hocam Prof. Dr. Abdul Rezzak Memon'a teşekkür ederim.

Çalışmamla ilgili bilimsel katkıları ve manevi destekleri için sevgili Dr. Şenay Vural Korkut, Birsen Cevher Keskin, Diğdem Aktopraklıgil, Aylin Özdemir, Emel Bıçakçı, Esra Yüca ve Dr.Cemal Ün'e ve teknik yardımları için Ömer Kaçar'a teşekkür ederim.

Bugüne gelmemi sağlayan ve sonsuz destekleriyle her an yanımda olan sevgili aileme, özellikle canım anneme ve zor anlarımda sevgi ve desteğiyle beni yalnız bırakmayan Mehmet Gür'e yaşamımdaki varlıkları için sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Y.T.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: 21-01-07-01).

ÖZET

Bu çalışmada bitkilerle ilgili bir çok çalışmada model organizma olarak kullanılan ve ağır metallerin biyolojik olarak temizlenmesinde kullanıma potansiyeline sahip tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'nin farklı suşları kullanılmıştır. Öncelikle bakır metalinin suşların üremesi üzerindeki etkisini belirlemek, daha sonra üremenin eksponensiyel fazındaki hücrelere bakır uygulayarak alg hücresinin ağır metal toplama kapasitesini saptamak ve son olarak bakır, kadmium ve kurşun uygulanan suşlarda bu metaller varlığında ısı şoku proteini ve metallothiyonin ekspresyonunu incelemek amaçlanmıştır.

Chlamydomonas reinhardtii yeşil alginin farklı suşlarına ağır metal stresi verilmesi halinde, bu metalin hücre üremesi üzerindeki etkisi gözlemlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda farklı konsantrasyonda bakır varlığındaki üreme eğrileri çizilmiştir. Artan metal konsantrasyonlarının hücre çoğalması üzerinde inhibe edici etkisinin olduğu anlaşılmıştır.

Alg hücresinin ağır metal toplama kapasitesini belirlemek için hücrelere 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda bakır uygulandığında, artan konsantrasyonlarda biyokonsantrasyon faktörünün azaldığı ve biriktirilen bakır miktarının arttığı gözlenmiştir.

Ağır metal stresine karşı hücresel detoksifikasyon metallothiyonin ve ısı şoku proteini HSP70'in ekspresyonu incelenerek araştırılmıştır. Isı şoku şaperon proteini HSP70B'nin *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ısı şoku stresinin yanı sıra ağır metal stresile de indüklenip indüklenmediği RNA düzeyinde araştırılmıştır. Uygulanan metal konsantrasyonlarında herhangi bir indüksiyon görülmemiştir.

Farklı konsantrasyonlarda bakır varlığında yetiştirilen *Chlamydomonas reinhardtii* suşlarından, belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak, indüklenmesi beklenen metallothiyonin (MT-1b) geninin RNA ve protein düzeyinde ekspresyonu incelenmiştir. Belirli bir konsantrasyondan (>100 µM) sonra, artan konsantrasyonların metallothiyonin düzeyinde artışa yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca hem metal hem de ısı şoku stresi uygulanan örneklerden elde edilen RNA'lar MT-1b probuyla hibridize edildiğinde, bakır ve kurşunun metallothiyonini güçlü bir şekilde indüklediği, kadmium varlığındaki indüksiyonun ise daha zayıf olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Chlamydomonas reinhardtii*, metallothiyonin, ısı şoku proteini, ağır metal stresi, gen ekspresyonu

ABSTRACT

In this study, different strains of unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii*, which have been used as a model organism for many plant studies and have the potential usage in the bioremediation of heavy metals, had been used. Firstly, determination of the effect of copper chloride concentrations on the growth and heavy metal accumulation capacity of the strains was aimed. In the existence of copper, cadmium and lead metals, investigation of heat shock protein HSP70 and metallothionein expression was also aimed in this study.

The effect of different metal concentrations on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cells had been searched and inhibition of cell growth was observed with increasing concentrations of metals.

To determine heavy metal accumulation capacity of *Chlamydomonas reinhardtii*, different copper chloride concentrations were applied to the cells in the exponential growth phase. In raising concentrations, a reduction in the BCF values had been observed in contrast to accumulated copper amount.

Expression of metallothionein (MT) and heat shock proteins (HSP70), which are induced in many organisms in response to various stresses including heavy metal stress, were investigated to identify the cellular detoxification mechanisms of *Chlamydomonas reinhardtii*. The effect of heavy metal application on HSP70 induction was examined but no induction was found.

Metallothionein expression pattern of *Chlamydomonas reinhardtii* cells, grown in TAP medium containing different copper chloride concentrations, had been studied in RNA and protein level. Increased metal concentrations ($>100 \mu\text{M}$) in the medium caused an increment in the level of MT protein. Furthermore, RNA samples extracted from heavy metal and heat shock treated cells were hybridized with probe prepared from MT-1b cDNA. Although a strong induction was observed in the copper and lead treated cells, cadmium did not induced MT expression as much as other metals did.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, metallothionein, heat shock protein, heavy metal stress, gene expression

1. GİRİŞ

Günümüzde hızla ilerlemekte olan endüstriyel gelişmelerle birlikte yaşamlarımız bir yandan daha konforlu hale gelirken, bir yandan da içinde bulunduğumuz çevre çeşitli kontaminantlar tarafından her geçen gün artarak kirletilmektedir. Bu kirleticilerden birisi olan ağır metallerin ortamdaki giderilmesinde kullanılan klasik tekniklerin, etkili olmakla birlikte, pahalı olmaları ve yüksek düzeyde atık meydana getirmeleri nedeniyle bunların yerine hem daha etkili hem de düşük maliyetli olan biyolojik sistemlerin kullanılması öngörülmektedir.

Sudaki ağır metal kirliliği ile yapılan birçok çalışma, metal kirliliğinin alg çeşitliliği ve üremesini indirdiğini ve birçok alg türünün yapısını değiştirdiğini, ancak buna rağmen birçok alg türünün de bu metallere karşı toleranslı ya da dirençli olduğunu bildirmiştir (Pawlik-Skowronska, 2001). Sudaki ağır metallere karşı toleranslı olduğu bilinen ve bu metallerin giderilmesinde canlı veya cansız olarak kullanılabilen tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*, toprakta ve tatlı sularda bulunan ve yıllardır fotosentetik ökaryotlarla ilgili fotosentez, kloroplast biyogenezi ve flagella fonksiyonu gibi temel biyolojik proseslerin araştırılmasında kullanılan ideal bir model organizmadır. Bu organizmada ağır metallere karşı toleransın hücresel olarak, metal iyonlarının hücre duvarı komponentlerine tutunması (biyosorbsiyon), metal iyonlarının organik bileşiklerle ekstrasellüler kompleksler meydana getirmesi ve metal iyonlarını tutan hücre içi kelatörlerin (Fitokelatinler) sentezlenmesi ile sağlandığı bildirilmektedir (Kaplan vd., 1995; Yan ve Pan, 2002). *Chlamydomonas reinhardtii*, ortamdaki artan metal konsantrasyonlarına gösterdiği tolerans, hızlı çoğalma, genetik olarak değiştirilebilme yeteneği gibi özellikleri sayesinde ağır metallerle kirlenmiş sulardan metallerin giderilmesinde kullanıma potansiyeli olan bir organizmadır (Cai vd., 1995; Harris, 2001).

Bu bilgilerin ışığı altında tez çalışmamızda öncelikle ağır metallerin farklı konsantrasyonlarının *Chlamydomonas reinhardtii* suşlarının üremesi üzerindeki etkisini belirlemek ve daha sonra üremenin eksponensiyel fazındaki hücrelere farklı konsantrasyonda bakır uygulayarak, alg hücresi tarafından biriktirilen bakır miktarını saptamak ve böylece bu algin ağır metal gideriminde kullanıma potansiyelini gözlemlemek amaçlanmıştır. Daha sonra farklı organizmalarda başta sıcaklık artışı olmak üzere değişik stresler, özellikle de ağır metal stresi, varlığında indüklenerek hücrenin hayatta kalmasını sağladığı bilinen ısı şoku proteini HSP70'in *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ısı şoku stresinin yanı sıra ağır metal stresıyla de indüklenip indüklenmediğini araştırmak amaçlanmıştır. Ayrıca *Chlamydomonas reinhardtii* suşlarına farklı metaller uygulanarak, ağır metale karşı pek çok organizmada

hücresel düzeyde detoksifikasyonu sağladığı bilinen metallotiyonin ekspresyonunun indüklenip indüklenmediğini RNA ve protein düzeyinde incelemek amaçlanmıştır.



2. LİTERATÜR BİLGİSİ

2.1 Ağır Metal Kirliliği

Endüstriyel gelişmelerin başlamasıyla birlikte çevrenin pestisitler, ağır metaller ve diğer toksik maddelerle kirlenmesi giderek artan bir problem haline gelmiştir. Tüm dünyada çevre ağır metallerle kirlenmekte, böylece toprak, hava ve sudaki toksik ağır metaller, insan sağlığını tehdit eden en ciddi çevre sorunlarından biri haline gelmektedir (Fernandes ve Henriques, 1991; Dönmez ve Aksu 1999; [1]).

Ağır metal, $5,0 \text{ g/cm}^3$ 'den yüksek yoğunluktaki metalleri tanımlamak için kullanılan bir terimdir ([2]; Sanità di Toppi ve Gabbrielli, 1999). Her ne kadar Fe, Mn, Mo, Cu, Co gibi bazı ağır metaller mikro elementler olarak biyolojik öneme sahip olsalar da, Cd, Pb, Cr, As, Hg, Al, Ag, Sn gibi ağır metaller oldukça ciddi kirleticiler durumundadır (Memon vd., 1983). Bu metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile karasal ve sucul organizmaları olumsuz bir şekilde etkilemektedirler (Danilov ve Ekelund, 2001, Sanità di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Düşük konsantrasyonlarda toprakta, kayalarda ve suda bulunan ağır metaller, endüstriyel işlemler ve yaygın biçimde kullanımın sonucu olarak doğal düzeylerine göre artış göstermekte ve çevrede birikmektedirler. Metaller kolaylıkla degrade edilemezler, besin zincirinde toplanabilir ve sedimentlerde kalarak yavaşça su yataklarına katılabilirler (Rubinelli, 2002; Travieso vd., 1999; Gallagher vd., 1996). Ayrıca stabiliteyi yüzünden özel sorunlara neden olurlar. Tüm bu sayılan nedenlerle kirl ettikleri ortamdan giderilmeleri gerekmektedir.

Toprak ve suyun ağır metallerle kirlenmesi genellikle, jeolojik kaynakların erozyonu, maden cevherleri ve metallerin endüstriyel olarak işlenmesi, fosil yakıtların yanması, metal ve metal bileşiklerinin endüstrideki kullanımı ve çöp yığınlarından süzülme yollarıyla gerçekleşmektedir (Gallagher vd., 1996). Ayrıca kentsel atıklar, gübreler, lağım, doğal gaz, kağıt ve klor-alkali endüstrileri atıklarının da içinde bulunduğu yüzlerce ağır metal kirliliği kaynağı mevcuttur (Memon, 2001; Cai vd., 1995; [1]).

Ağır metal toksinlerinin sağlık üzerinde çeşitli olumsuz etkileri bulunmaktadır. İnsan sağlığını etkileyen 20'den fazla farklı ağır metal toksini bulunur ve her bir toksin metale maruz kalan kimsede farklı fizyolojik değişimlere yol açar [1]. Ağır metallere sürekli maruz kalma halinde toksisitenin görüldüğü alt limit değerleri Cd 0,0004 ppm, Cr 0,05 ppm, Cu 0,006 ppm, Pb 0,03 ppm, Hg 0,00005 ppm, Zn 0,03 ppm'dir [2].

Toksik metaller vücut dokularında bulundukları zaman serbest radikallerin yıkıcı aktiviteleri sürekli olarak devam etmektedir. Bu aktiviteler sonucunda hızlı yaşlanma ve dejenerasyon meydana gelmektedir. Metallerin toksisiteleri, enzimler, proteinler ve DNA gibi temel biyolojik moleküllerin fonksiyonlarını bozabilme yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca hücre için gerekli olan bazı metallerin benzer metallerle yer değiştirmesi de diğer bir toksisite nedenidir. Örneğin; yapı ve fonksiyonları için çinkoya gereksinim duyan bazı proteinlerde, kadmiyum çinkonun yerini alabilir ve proteinde meydana gelen bu değişiklik toksik sonuçlara neden olabilir. Aynı şekilde kurşun da kemikte ve kalsiyumun gerekli olduğu diğer yerlerde kalsiyumun yerini alabilmektedir [3].

Yüksek konsantrasyondaki ağır metaller genellikle serbest oksijen radikalleri meydana getirerek oksidasyona, hücresel hasarlara, proteinlerin sülfidril gruplarına bağlanarak aktivitenin inhibisyonuna ya da yapının bozulmasına, H^+ -ATPaz gibi anahtar membran proteinlerinin inhibisyonuna ve membran lipidlerinin akışkanlıklarında ve kompozisyonlarında değişikliğe yol açarak hücreden iyon sızıntısına neden olurlar (Hall, 2002; Briat ve Lebrun, 1998).

Ağır metaller çevreye serbest bırakıldıklarında sudaki canlılığa anlamlı düzeyde zarar verebilirler ve metal kirliliği su çevresinde birçok biyolojik etki meydana getirebilir. Bu biyolojik etkiler mikroalg türleri zenginliğini ve mikroalg üretimini indirgerler, ayrıca mikroalg topluluğunun yapısını değiştirirler. Mikroalgler denizdeki gıda zincirinin temelini oluşturdukları için metallerin bu organizmalar üzerindeki toksik etkisi anlamlıdır (Travieso vd., 1999; Pérez-Rama vd., 2002). Eser düzeydeki ağır metaller enzimatik reaksiyonların kofaktörü olarak gerekli olmakla birlikte yüksek düzeydeki ağır metaller mikroalgler için oldukça toksiktir ve metabolik reaksiyonları inhibe edebilmektedir. Toksik metaller, mikroalgal fotosentez, çoğalma ve enzim aktivitesini etkileyebilmektedir.

Ağır metallerden özellikle kirlilikleri birbirleriyle ilişki halinde bulunan ve giderek artış gösteren kadmiyum, bakır ve kurşun elementleri dikkatleri üzerine çekmektedir.

Bakır

Bakır doğada metal ve mineral olarak bulunan kırmızımsı bir element olup insanlar tarafından kullanılan ilk metal olma özelliğine sahiptir, 5000 yıldan daha uzun süredir bilinmekte ve kullanılmaktadır. Fotoğrafçılıkta elektrokaplamada, yağların rafine edilmesinde, şekerler için yapılan analitik testlerde (Fehling solüsyonu), ısıtma sistemlerinde, kimyasal ve farmasötik

sistemlerde, korozyona dirençli boru yapımında, bozuk para yapımında, çimento, kağıt ürünleri, pigment ve boyaların, gıda koruyucularının yapımında kullanılmaktadır.

Her ne kadar sudaki bakır birçok organizma için bir tehlike olsa da, bitki ve hayvan enzimleri için bir enzim aktivatörü olması nedeniyle diyetle çok küçük miktarda bulunması gereklidir (Hill vd., 1996). Bazı bitki ve hayvanların diyeti için temel bir element olan bakır, suda yüksek konsantrasyonda bulunduğu zaman birçok balık ve özellikle alg türleri gibi diğer sucul türler için toksik olabilmektedir. Bakırın sudaki toksisitesi genellikle organizmaların iç iyon dengesinin bozulması yüzünden olmaktadır [6].

Bakır bileşikler doğada geniş bir biçimde yayılmış olup sıklıkla yüzey sularında ve bazı yer altı sularında bulunmaktadır. Bakırın sudaki güvenilir konsantrasyonları 25-50 µg/l iken, LC₅₀, yani populasyonun yarısının ölümüne yol açan konsantrasyonlar ise genellikle 0,3-1 mg/l'dir [2].

Bakır özellikle deniz kabuklularında, sakatatlarda, fındıkta, kuru fasulyede, bazı meyvelerde, karabiber, nane gibi bazı baharatlarda ve kakao gibi bazı gıdalarda oldukça zengin biçimde bulunmaktadır. Bu gıdaların bakır içerikleri 20 µg/kg ile 400 µg/kg arasında değişmektedir.

Bakır, proteinlerin üzerindeki oksijen, azot ve kükürt atomlarını taşıyan ligand yerlere sıkıca bağlanmaktadır. Bakır hemoglobin oluşumu, karbonhidrat metabolizması, katekolamin biyosentezi, kollagen, elastin ve saç keratinlerinin karşı bağlanması esastır.

Kadmiyum

8,6 g/cm³ yoğunluktaki kadmiyum elementi, gümüş beyaz renkte yumuşak ve çinko ile yakın ilişkili bir metaldir. Antropojenik aktiviteler sonucunda atmosfere, doğal kaynaklardan gelen Cd'dan 3-10 kat daha fazla Cd katılmaktadır (Pérez-Rama vd., 2002; [5]).

Cd'un korozyona karşı gösterdiği kayda değer direnç, düşük erime noktası ve elektrik iletkenliği özellikleri sayesinde özellikle 20.yüzyılın ilk yarısından itibaren endüstriyel uygulamaları geliştirilmiş ve çevrenin Cd ile kirliliğinde artış görülmüştür (Rubinelli vd., 2002). Bu artış Cd giderimi için geliştirilen teknolojiler sayesinde sabit bir biçimde indirgenmektedir. (Sanità di Toppi ve Gabrielli, 1999; [4]).

Cd yaygın biçimde özel alaşımlarda, kaplamalarda, stabilize edicilerde ve yeniden şarj edilebilen Ni-Cd pillerin üretiminde, televizyon fosforlarında, plastik yapımında, dişçilikte amalgamda kullanılmaktadır (Sanità di Toppi ve Gabrielli, 1999).

Cd'un, mikroorganizmalar, yosunlar, likenler, algler, yumuşakçalar, kabuklular, ilkel hayvanlar, kuşlar, memeliler ve yüksek bitkilerde birikme ve konsantrasyon olma potansiyelinin olduğu bildirilmiştir (Pérez-Rama vd., 2002). İnsan sağlığını gıdalar yoluyla etkileyen ve kemiğin akut dejenerasyonu (Itai-Itai) ile böbrek fonksiyon bozukluğuna (Fanconi sendromu) ve gelişim aksaklıklarına yol açan eser elementlerden birisidir (Cai vd., 1995; Rubinelli vd., 2002). Yüksek Cd konsantrasyonlarının bir çok hayvan türü üzerinde karsinojenik ve mutajenik etkisi olduğu gösterilmiştir. Cd birikiminin kas, karaciğer, böbrekler gibi birçok dokuda uzun bir yarılanma ömrüne sahip olduğu ve özellikle böbreklerin Cd birikimi için tercih edilen organlar olduğu bilinmektedir. Yüksek bitkilerde Cd, su dengesiyle etkileşir ve fotosentetik aparata zarar verir. Cd mitokondriyel oksidatif fosforilasyonu, mitokondriyel iç membranın protona karşı pasif geçirgenliğini artırarak inhibe etmektedir. Cd ayrıca stoma açılışını da inhibe etmektedir. Plazma membran aktivitesini indirir, ayrıca çeşitli enzimlerin aktivitesini genellikle inhibe eder. Cd'un oksidatif stres ürettiği de bulunmuştur ancak Cu gibi diğer ağır metallerin aksine reaktif oksijen türlerinin üretiminde doğrudan etkisinin olmadığı görülmüştür. (Sanità di Toppi ve Gabrielli, 1999).

Kurşun

Kurşun mavimsi gri renkte, yer kabuğunda az miktarda bulunan ve doğal olarak meydana gelen bir metaldir. Cephanelik malzeme yapımı, boru yapımı, petrol rafine edilmesi, X-ışını ve atomik radyasyondan korunmada, alaşımlarda, bina inşaatında, seramik, plastik ve elektronik aletlerde, galvanizlemede, kaplamada kullanılmaktadır.

Kurşunun bilinen temel bir biyolojik fonksiyonu yoktur, tüm kurşun bileşikleri zararlı veya toksiktir ve canlı organizmaların büyüme-gelişmeleri, öğrenmeleri, davranışları ve metabolizmaları üzerinde zararlı etkileri vardır. Suda gittikçe artan kurşun konsantrasyonu birçok alg türü için toksiktir. Omurgalılarda kurşun zehirlenmesi; nörolojik problemler, böbrek fonksiyon bozuklukları, enzim inhibisyonu ve anemi sorunlarına yol açmaktadır [7].

Toprak, su ve havanın kurşunla kirletilmiş olduğu yerlerde bitki ve hayvanlardaki kurşun düzeyinde artış meydana gelebilir. İnsanlar genellikle gıdaları aracılığıyla kurşuna maruz kalırlar. Kurşun oto egsozlarından ya da endüstriyel emisyonlardan, kurşun bazlı boyalardan kaynaklanabilmekte ve su borusundaki kurşunun çözünerek içme suyuna karışmasıyla diyetle dahil olmaktadır. Otomobil ve endüstriyel emisyonlardan gelen kurşun vücutta ciğerlerde birikebilmektedir. Ayrıca kurşun kemiklerde kümülatif bir zehir olarak birikme eğilimindedir. Kurşun zehirlenmesi özellikle çocuklar için tehlikeli olup kalıcı beyin hasarlarına yol açmaktadır. Memelilerde, kuşlarda, balıklarda, likenlerde, alglerde, yumuşakçalarda,

kabuklularda, ilkel hayvanlarda ve yüksek bitkilerde kurşunun birikme ya da konsantre olma eğilimi vardır. Hayvan kılından, memeli böbrekleri ve kemiklerinden, kuş kemiklerinden, midyelerden, likenlerden, alglerden ve yüksek bitkilerden kurşunu izleme imkanı bulunmaktadır.

2.2 Ağır Metal Kirliliğinin Giderilmesi

Ağır metal kirliliğinin giderilmesinde değişik kimyasal ve fiziksel yöntemler yaygın biçimde uygulanmaktadır. Ancak bu tekniklerin bazı dezavantajlarının bulunması nedeniyle son zamanlarda biyolojik sistemlerin kullanıldığı yöntemler geliştirilmiştir.

2.2.1 Ağır Metal Gideriminde Kullanılan Klasik Yöntemler

Sulardan ağır metallerin giderilmesinde genellikle kimyasal olarak metal iyonunun çökebilen bir bileşiği şekline dönüştürülmesi ilkesine dayalı yöntemler kullanılır. Bunlar, yüksek değerlikli metalin çökebilen şekline indirgenip nötralize edildiği indirgeme-çökeltme yöntemi, indirgenmiş metalin kararlı, yükseltgenmiş ve çözünmeyen forma dönüştürüldüğü yükseltgeme-çökeltme yöntemi, ortama kireç, soda veya sodyum hidroksit katılarak ağır metalin nötralize edildiği nötralizasyon-çökeltme yöntemi ve ağır metal iyonlarının elektrostatik kuvvet ile fonksiyonel grup halinde katı yüzeye tutturulup ortamdaki farklı türdeki iyonlarla yer değiştirdiği iyon değişimi yöntemleridir ([1]; Mehta ve Gaur, 2001; Yan ve Pan, 2002). Ağır metal kirliliğinin kontrol edilmesinde kirlenmiş toprağın kazılıp çıkarılması gibi kirlenmiş alanların temizlenmesi işlemi de uygulanmaktadır (Lustigman ve Lee, 1997).

Bu klasik yöntemler pahalı olmalarının yanı sıra metal gideriminin tamamlanmaması, pH değişimine sınırlı tolerans gösterme, farklı metallerin karışımı içerisinde hedeflenmiş spesifik bir metalin gideriminin güçlüğüyle gerçekleştirilmesi, vasat ya da daha az metal seçiciliği, çok yüksek veya düşük metal çalışma düzeyi ve toksik çamur ya da atık olma eğilimi gösteren diğer atık ürünlerin üretilmesi gibi dezavantajlara sahiptir (Mehta ve Gaur, 2001).

2.2.2 Alglerin Ağır Metal Gideriminde Kullanılması

Kirletici maddelerin gideriminde alışılagelmiş metotların kullanılması birçok soruna yol açtığı için, ağır metal kirliliğinin ortadan kaldırılmasında mikroorganizmaların ve bitkilerin kullanımı giderek önem kazanmakta ve daha popüler hale gelmektedir. Son yıllarda mikroorganizmalar kullanılarak ağır metallerin biyolojik temizlenmesi, yalnızca bilimde

kaydedilen bir ilerleme olarak değil, aynı zamanda endüstrideki uygulamalarıyla da dikkatleri üzerine çekmiştir. Biyoremediasyon stratejileri düşük maliyetli oluşları ve yüksek etkinlikleri ile çekici bir alternatif durumundadırlar.

Mikroorganizmalar metalleri aktif ya da pasif alım mekanizmaları ile gidermeleri, basit ve ucuz koşullar altında yetiştirilebilmeleri, hızlı bir şekilde çoğalmaları ve tek hücreli oldukları için kompleks organ sistemlerine sahip çok hücreli organizmaların aksine ağır metal stresine oldukça hızlı yanıt vermeleri nedeniyle potansiyel biyoremediatörlerdir (Dönmez ve Aksu, 1999; Dönmez vd., 1999).

Sucul mikroorganizmalar, özellikle mikroalgler, sudaki ağır metalleri biyosorbsiyon ve metabolizmaya bağlı biyoakümülyasyon mekanizmaları sayesinde gidermektedirler (Terry ve Stone, 2002). Sıvı solüsyonlardaki ağır metallerin mikroalgler tarafından emilimi, ağır metal konsantrasyonunu büyük oranda indirgeyebildiği için atık su temizlenmesinde dikkatleri üzerine toplamıştır (Yan ve Pan, 2002). Mikroalglerin çok yüklü iyonlara karşı belli bir çekimlerinin olması, ağır metallerin çevreden uzaklaştırılmasını sağlamakta ve bu durum çevrenin korunması açısından oldukça önem taşımaktadır (Travieso vd., 1999).

Mikroalgler metal gideriminde hem canlı hem de cansız formlarda biyosorbentler olarak kullanılmaktadır.

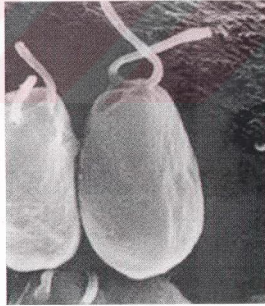
Kontamine edilmiş atık sulardan ağır metal gideriminde liyofilize edilmiş alglerin kullanılması başarıyla uygulanmakta ve özellikle alglerin hücre duvarı fraksiyonları tarafından ağır metallerin non-spesifik bağlanması atık sulardan ağır metal kontaminasyonunun gideriminde kullanılmaktadır. Kobalt, kurşun ve kadmiyum *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Chlorella spp.* gibi alglerin hücre duvarları tarafından tutulabilir (Cai vd., 1995). *Chlamydomonas reinhardtii*'nin metalle kontamine edilmiş sucul çevrede biyosensör ya da biyolojik temizleyici olarak kullanılabileceğini gösterir biçimde ortamdaki Cd'un %30'unu biriktirdiği ve *Chlorella vulgaris* ve *Chlorella pyrenoidosa* alglerinden daha etkili bir biyoakümülyasyon sağladığı bildirilmektedir (Mosulén vd., 2003).

Mikroalgler aracılığıyla ağır metallerin giderilmesinde kullanılan bir diğer strateji ise, alg hücresinin ağır metal stresine karşı dayanıklılığını sağlayan genlerin ekspresyonlarının artırılması yoluyla ağır metal bağlama kapasitelerinin artırılması ve bu alglerin giderimde kullanılmasıdır. *Chlamydomonas reinhardtii* alginin ağır metal bağlama kapasitesini artırmak amacıyla değişik stratejiler uygulanmış. İlk olarak, normal bir hücre herhangi bir strese maruz bırakıldığında üretilen ve ağır metal düzeyi artarken hücreyi daha fazla strese uğramaktan

koruyan bir aminoasit olan prolin üretimi artırılmış ve hücre içerisinde % 80 daha fazla prolin üretimi sağlanmasıyla değiştirilmiş algin normal alg hücresine kıyasla 4 kat daha fazla ağır metal bağlayabildiği görülmüştür. Diğer bir strateji ile metal bağlayıcı polipeptidlerde bol miktarda bulunan sistein amino asiti üretimi artırılmış ve sistein artışının meydana getirdiği alg hücrelerinde normal hücrelerden % 50 daha fazla metal bağlandığı görülmüştür. Son olarak ağır metalleri bağlayan bir protein olan metallothionein varlığında *Chlamydomonas* hücresinin ağır metalleri bağlayabilme kapasitesinin artıp artmadığını anlayabilmek amacıyla metallothionein proteini hücre dışına iliştirilmiş ve 5 kat daha fazla metal bağlandığı görülmüştür ([9], [10]).

2.2.2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* Yeşil Algi

Chlamydomonas denizlerde, tatlı sularda ve toprakta ve bulunan ve 600'den fazla tür bulunduran bir cinstir. *Chlamydomonas* türleri taksonomik olarak Protista aleminin Chlorophyta bölümünün Chlorophyceae sınıfının Volvocales takımının Volvocaceae familyasında bulunmaktadır. Bazı botanikçiler *Chlamydomonas*'ın Chlamydomonaceae familyası içerisinde yer aldığını iddia etmektedir [11]. *Chlamydomonas* cinsinin çok sayıda türü bulunmasına rağmen araştırmalarda bugüne kadar en sık kullanılanı *Chlamydomonas reinhardtii*'dir.



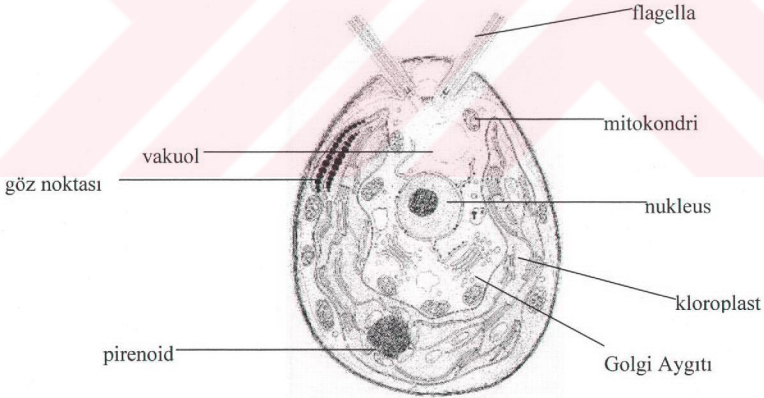
Şekil 2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alginin elektron mikrofrafı [12]

Chlamydomonas reinhardtii, durgun sularda ve ıslak topraklarda yaşayan ilkel, tek hücreli, hareketli, haploid ve ökaryotik bir yeşil alg olup, yaklaşık 10 µm uzunluğundadır. Birbirine eşit uzunlukta iki adet flagella taşır. Hücre duvarı glikoprotein yapıdadır. Nukleus, fotosentetik ürünlerden nişastanın meydana getirildiği tek bir pirenoid bulunduran fincean

şekilli büyük bir kloroplast tarafından çevrenmekte ve salgılama fonksiyonuna sahip iki küçük kontraktıl vakuol flagella yakınında yer almaktadır. Hücrenin ışığa doğru yüzmesini sağlayan ışığa hassas kırmızı bir pigment noktası bulunmaktadır.

Besiyeri açısından yetiştirilmesi kolay ve ucuzdur. Fotosentetik, heterotrofik ya da mikсотrofik olarak senkronize ya da asenkronize şekilde yetiştirilebilir (Harris, 2001). İnorganik tuzlardan oluşan besiyerinde kolaylıkla yetiştirilebilmektedir. Enerjiyi karşılamak için fotosentez yapar ancak tamamen karanlık ortamda da alternatif karbon kaynağı olarak asetatı kullanarak yaşayabilmektedir. Ökaryotiktir fakat tek hücreli olduğu için standart mikrobiyal tekniklerle çalışılabilir [13].

Chlamydomonas reinhardtii 50 yılı aşkın süredir genetik, biyokimyasal, sitolojik ve moleküler analizlerde kullanılmaktadır. Fotosentetik ökaryotlardaki fotosentez, kloroplast ve membran biyogenezi, hücre hareketi, fototaksis, sekresyon ve gametogenez gibi biyolojik işlemlerle ilgili çalışmalar için oldukça ideal bir model organizmadır (Rochaix, 1995). Sıvı azotta uzun süreli saklanması mümkündür. Patojenik değildir, diğer kültürleri kontamine etmez ([15], Weiss-Magasic vd., 1997; Harris, 2001)



Şekil 2.2 *Chlamydomonas reinhardtii* [16]

Chlamydomonas reinhardtii ortamda artış gösteren ağır metal konsantrasyonuna gösterdiği tolerans, bir sünger gibi davranarak metalleri kendisine bağlaması, üretilmesi için çok fazla enerjinin gerekmemesi, hızlı çoğalması, toksik olmaması ve genetik manipulasyonlarla

değiştirilebilme potansiyeli gibi özellikleri sayesinde ağır metallerle kirlenmiş suların temizlenmesinde kullanılabilmektedir (Cai vd., 1995; Harris, 2001; Quarmby, 2000). Ağır metaller kültürdeki tüm hücreleri eşit şekilde etkiledikleri için senkronize yanıtlar elde edilir ve bu nedenle bu organizma ağır metal stresine karşı yanıt genlerinin incelenmesi için ideal bir organizmadır (Rubinelli vd., 2002).

2.3 Alglerde Ağır Metal Stresine Karşı Dayanıklılık Mekanizmaları

Mikroalglerin ağır metallerle kirlenmiş çevre ile mücadele etmelerini ve bu koşullar altında yaşamalarını sağlayan mekanizmalarla ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. Farklı sucul organizmalar ağır metallere karşı değişik yanıtlar verirler. Bu yüzden incelenen her bir tür bakımından metal konsantrasyonlarının etkisini karakterize etmek gerekmektedir (Terry ve Stone, 2002).

Bitkilerde ve alglerde ağır metallere karşı tolerans ve metal detoksifikasyonundan sorumlu birçok mekanizma ortaya atılmıştır. Bütün bu mekanizmaları üç geniş kategori altında incelemek mümkündür ve her üç kategoride yer alan mekanizmalar da mikroalglerde kendiliğinden çalışabilmektedir.

1. Metallerin plazma membranından geçmesini engelleyen mekanizmalar
2. Metallerin plazma membranından dışarı verilmesini sağlayan mekanizmalar
3. Hücre içinde metal iyonlarının detoksifikasyonunu sağlayan mekanizmalar

2.3.1 Metallerin Plazma Membranından Geçişini Engelleyen Mekanizmalar

Metallerin plazma membranından geçişi ilk olarak metal iyonlarının metabolizmadan bağımsız bir şekilde pasif olarak hücre duvarına bağlandığı biyosorbsiyon mekanizması sayesinde engellenmektedir. Hücre duvarına bağlanma, metal iyonlarının hücre duvarındaki tek yüklü ve iki yüklü iyonlarla yer değiştirdiği iyon değişimi ve metal iyonlarıyla hücre duvarındaki fonksiyonel gruplar arasında kompleks oluşumu ile gerçekleşmektedir (Vílchez vd., 1997)

Bitki ve alglerin hücre duvarları metal iyonlarını negatif yüklü yerlerde bağlama kapasitesindedir. Tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*' nin hücre duvarı selüloz bakımından eksik, bitkilere benzer biçimde glikoprotein tabakaları bakımından zengindir. Bu durum diğer tatlı su algleri için de tipiktir. Pektinlerin anyonik karboksilat grupları ve glikoproteinler metal iyonları için güçlü bağlama afinitesine sahiptirler. Bu bağlar elektrostatik, iyonik ya da kovalent olabilirler. Kovalent bağlanma muhtemelen amino ve

karboksil grupları içerirken, protein ve polisakkaridler metal biyosorpsiyonunda önemli roller oynamaktadırlar. Canlı ve cansız mikroalglerin hücre duvarı bir metal iyon değiştiricisi gibi davranarak doğrudan metal biyosorpsiyonu için kullanılabilir. Hücre duvarına bağlı metallerin miktarındaki varyasyonlar, hatta belki de hücre duvarı kompozisyonlarındaki farklılıklar sayesinde aynı türün genotipleri arasındaki tolerans farklılıkları gözlemlendiği bildirilmiştir (Macfie ve Welbourn, 2000).

Biyosorpsiyon geri dönüşümlüdür ve 5-10 dakika gibi kısa bir süre içinde gerçekleşir. Biyokütle birimi başına biriktirilen metal miktarı solüsyondaki metal iyonu konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Ayrıca biyosorpsiyon, pH' dan ve ağır metalleri çözünmeyen tuzlar olarak çöktüren diğer iyonların ortamdaki varlığından etkilenebilmektedir.

2.3.2 Metallerin Plazma Membranından Dışarı Verilmesini Sağlayan Mekanizmalar

Plazma membranı ağır metal toksisitesi için ilk canlı yapı olarak kabul edilebilir. Metal homeostasisinde hücre zarı, ağır metallerin hücre içine girişini engelleme, indirgeme ya da dışarı verme mekanizmaları aracılığıyla önemli rol oynamaktadır. Metal katyonlarının çoğu esas element oldukları için, tamamen dışlama yerine membran geçirgenliğinin indirgenmesiyle seçici dışlama gerçekleşmektedir. Plazma membranlarında hücre içi metal düzeyini kontrol etmeye yarayan alternatif bir strateji ise, metal iyonlarının aktif olarak dışarı verilmeleridir. Bakterilerde toksik iyonlara karşı direnç sistemlerinin çoğunun, enerjiye bağımlı bir mekanizmayla toksik iyonların dışarıya verilmesi temeline dayanmakta olduğu bildirilmiştir (Hall, 2002). Bakterilerde ve hayvanlarda dışarı pompalama yapan bu taşıyıcıların metal homeostasisinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan son çalışmalar bitki ve alglerde de metal alımı ve homeostasisiyle ilgili değişik metal transporter sınıflarının bulunduğunu ve toleransta anahtar rolü olduğunu göstermiştir (Hall, 2002).

2.3.3 Hücre İçinde Metal İyonlarının Detoksifikasyonunu Sağlayan Mekanizmalar

Hücre içinde metal iyonlarının detoksifikasyonunu sağlayan mekanizmalar, alg hücresinin çoğalması için metal iyonlarının tüketimini ve/veya hücre içi akümüleyasyonunu gerektiren, enerjiye bağımlı ve pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve ışık gibi değişik parametrelere duyarlı mekanizmalardır. Bu aktif alım mekanizmaları düşük sıcaklık, enerji kaynağı yokluğu ve metabolik inhibitörler tarafından inhibe edilebilmektedir (Vilchez vd., 1997)

Metal iyonları hızlı ve pasif bir şekilde hücre duvarına tutunduktan sonra daha yavaş ve metabolizmaya bağımlı bir yolla hücre içerisine alınmaktadır. Hücre içerisine alınan metal iyonları sitoplazmada bulunmakta ve nukleus ve kloroplasttan dışlanan metal iyonları

özellikle vakuolde konsantre edilmektedir (Weiss-Magasic vd., 1997). Artan metal konsantrasyonu hücre içinde metallothiyoninler ve fitokelatınlar gibi metal bağlayıcı proteinlerin ve ısı şoku proteinlerinin sentezlenmesine yol açmaktadır. Ağır metal stresine maruz kalındığında hücre içinde detoksifikasyonu ilk olarak metallothiyonin ve fitokelatin proteinlerinin sentezi ile vakuolar kompartmantalizasyonu sağlarken, ikincil olarak stres proteinleri sentezinin sağladığı belirlenmiştir (Sanità di Toppi ve Gabbriellini, 1999).

Chlamydomonas reinhardtii'de ağır metale karşı hücre içi toleransın metallothiyonin ve fitokelatin polipeptidleri tarafından sağlandığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Cai vd, 1995; Devriese vd., 2001). Lemaire vd., (1999) ağır metallerin *Chlamydomonas reinhardtii*'de ayrıca tiyoredoksın olarak adlandırılan 12 kDa ağırlığında küçük ve bakteriden insanlara pek çok organizmada bulunan proteinlerin sentezine yol açtığını ve bu proteinin ağır metallere karşı bir savunma mekanizması olabileceğini bildirmiştir.

Tez çalışmamızda metallothiyonin ve ısı şoku proteinleri ekspresyonu incelendiği için bu detoksifikasyon mekanizmalarının özellikleri üzerinde durulmuştur.

2.3.3.1 Metallothiyoninler

Margoshes ve Vallee isimli araştırmacıların 1957 yılında at böbrek korteksinde oldukça yüksek düzeyde Cd'u gözlemlemeleri sonucunda enzimatik olarak inaktif Cd-bağlayıcı proteinlerin izolasyonu çalışmalarına başlanmıştır. Daha sonraları yapılan biyokimyasal analizler sonucunda bu proteinlerin oldukça yüksek sülfür içeriğine (bu sülfürün % 95'i sistein amino asitinin sülfidril grubu olarak bulunmaktadır) sahip olduğu ayrıca aromatik amino asitler bulundurmadığı ve 6-7 kDa gibi oldukça düşük bir molekül ağırlığına sahip olduğu gösterilmiştir. Yüksek düzeyde metal ve sülfür içeriği sayesinde bu proteinler metallothiyonin olarak adlandırılmışlardır (Kägi ve Schäffer, 1988; Foster, 1999).

mRNA translasyonunun ürünleri olan metallothiyonin proteinleri düşük molekül ağırlıklı ve sistence zengin metal-tutucu proteinlerden oluşan bir protein ailesidir. Çift yüklü ya da tek yüklü katyonların tutulması türler arasında genellikle oldukça korunmuş olan sistein amino asitleri sayesinde gerçekleştirilmektedir [17]. Metallothiyoninler hayvanlarda, yüksek bitkilerde, ökaryotik mikroorganizmalarda ve bazı prokaryotlarda bulunurlar (Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Marc vd., 2001; Mejáre ve Bülow, 2001). Metallothiyoninler hücrede sitoplazma, lizozomlar ve nukleusta bulunmaktadır (Del Razo vd., 2001).

Metallothiyonin biyosentezi transkripsiyonel düzeyde regüle edilir ve hormonlar, sitokinler, sekonder haberciler, büyüme faktörleri, Cd, Zn, Hg, Cu, Au, Ag, Co, Ni, Bi gibi değişik

faktörlerle indüklenir. MT gen ekspresyonunun metaller tarafından regülasyonu, metale duyarlı elementler (MREs) gibi kısa DNA motiflerini tanıyan nuklear transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gerçekleştirilir (Del Razo vd., 2001).

Metallotiyoninlerin hücredeki fizyolojik fonksiyonları halen tartışma konusudur. Yine de bunların çinko ve bakır gibi metal iyonlarının homeostatik regülasyonunu ve ağır metal detoksifikasyonunda, şaperon etkisi olarak bilinen rol ile ağır metallerin diğer hücresel komponentlerle etkileşiminin engellenmesinde, reaktif oksijen türlerine ve iyonize radyasyona karşı koruma sağlamada rol oynayan proteinler olduğunu gösteren çalışmalar vardır ([17], [18]; Otsuka, 2001). Farklı metallere karşı farklı fonksiyonları vardır. Cd için MT'nin fonksiyonu uzun süreli toksisiteye karşı korumaktır. Bakır birçok enzimin aktivitesinde temel rol oynadığı için MT hücre içerisinde bakır enzimlerinin aktivasyonunu sağlayacak düzeyde ve toksik olamayan düşük bakır konsantrasyonlarını devam ettirebilme olasılığına sahiptir. Çinko için MT bir depo proteini olarak iş görebilir ve bu metalin metabolizmasında homeostatik rol oynayabilir (Foster, 1999; Hall, 2002; Lemaire, 1999).

Metallotiyoninlerin Sınıflandırılması

Yapısal ilişkiler ve sistein aminoasitlerinin dizilimine göre metallotiyoninler 3 sınıf altında toplanırlar. Sınıf I MT'ler oldukça korunmuş, 20 tane sistein içeren ve memeliler ile sürüngenlerde yaygın olarak bulunan proteinlerdir. Sınıf II MT'ler memeli formlarından oldukça farklı, bitkilerde, mavi-yeşil alglerde ve sürüngen olmayan hayvanlarda ve mayalar ile bazı prokaryotlarda bulunan polipeptidlerdir. Sınıf III MT'ler ise fitokelatinler olarak da adlandırılan γ -glutamilsisteinil üniteleri içeren atipik polipeptidlerdir (Mej  re ve Bülow, 2001).

Bugüne kadar karakterize edilen tüm Sınıf I MT'ler tek zincirli proteinlerdir (K  gi ve Sch  ff  r, 1988). Özellikle sistein aminoasitlerinin pozisyonları korunmuş durumdadır. Tipik olarak, memeli metallotiyonini 20 sistein bulunduran ve hiç aromatik amino asit içermeyen 61 amino asit uzunluğunda, 6-7 kDa molekül ağırlığında bir polipeptiddir. Tüm sistein aminoasitlerinin pozisyonları değişmez MT'nin memelilerde nötral pH'da tek bir negatif yük bakımından fark gösteren iki izoformu bulunmaktadır, MT-I ve MT-II (Foster, 1999; Mej  re ve Bülow, 2001).

Sınıf II MT'ler ile memeli MT'leri arasında belirgin bir dizi ilişkisi bulunmamaktadır. Cys-X-Cys kümeleri farklı pozisyonlarda bulunup, daha d    k moleküler a  ırlı  tadır. Her ne kadar her iki proteinde yüksek düzeyde visinal (Cys-Cys) ve visinale yakın (Cys-X-Cys) diziliminde bulunsalar da belirgin bir eşleşme görülmemiştir.

Fitokelatinlerin keşfedilmesinden kısa bir süre sonra bitkilerin Cd'a karşı toleransını sağlayan bir metallothiyonin proteini buğdayda tanımlanmıştır. Buğday Ec proteini bir metallothiyonin olarak adlandırılan ilk bitki proteinidir. Sistein amino asitlerinin Cys-X-Cys motifleri halinde var olması proteinin metalleri bağlama kapasitesinde olduğunu gösterir. Saflaştırılan Ec proteininin Zn^{+2} ile ilişkide olduğu bulunmuş ve bu proteinin Sınıf II grubuna dahil edilebileceği düşünülmüştür.

Sınıf III MT 'ler ise non-translasyonel olarak sentezlenen değişebilir uzunluktaki iki ya da daha fazla glutatyon benzer metal – thiolat polipeptid zincirinden oluşan oligomerik yapılar olup, tekrarlanan diziler içerirler; $(\gamma\text{GluCys})_n$ Gly, $n=2-11$. Sınıf III MT'ler aynı zamanda fitokelatinler olarak bilinirler ve diğer MT'lerden daha küçük moleküler ağırlıktadırlar (1-2 kD). Fitokelatinler bitkilerde ve alglerde bulunurlar (Cai vd., 1995; Hu vd., 2001).

Metallothiyoninlerin Yapısı

Metallothiyonin proteininin yapısı çeşitli biyofizik ve biyokimya teknikleri kullanılarak belirlenmiştir. NMR spektroskopisi ağır metallerin MT ile yalnızca sisteinlerle oluşturdukları tiyolat bağları sayesinde ilişkili olduklarını göstermiştir. EXAFS ölçümleri ve UV spektroskopisi her bir tiyolat kompleksinde bir çift yüklü metal iyonunun tetrahedral simetride dizilmiş dört tiyolat ligandına bağlı olduğunu göstermiştir.

MT proteininde bulunan tüm sisteinler Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys, Cys-X-Cys-Cys motifleri halinde bulunurlar bu yüzden bir metallothiyonin molekülünde disülfid köprüleri bulunmamaktadır. Uç kısımlarda bulunan (terminal) sisteinler tek bir çift yüklü metal iyonunun bağlanması ile ilgili iken, diğer yan yana bağlanan (bridging) sisteinler iki çift yüklü iyonun koordinasyonu ve molekülün bütünlüğünün sağlanmasıyla ilgilidirler.

Metallothiyonin tersiyer yapısına metal iyonlarının bağlanmasıyla ulaşır. NMR spektroskopisi ve EXAFS ölçümleri memeli MT'lerinde metal tutulmasının iki bölge sayesinde gerçekleştiğini göstermiştir. N ucundaki β bölgesi 3 adet çift yüklü metal iyonunu bağlarken, C ucundaki α bölgesi ise 4 tane çift yüklü metal iyonu bağlar. Alternatif olarak, her bir bölgeye 6 adet tek yüklü iyon bağlanabilir ([18]; Cobbett ve Goldsbrough, 2002; Marc vd., 2001).

Metallothiyoninlerin α bölgesi Cd^{+2} ve Hg^{+2} iyonlarına karşı daha fazla afinite gösterirken, β bölgesi Zn^{+2} iyonunu ve tek yüklü iyonları daha kolay bağlayabilmektedir. Bazı çalışmalar her bir domainin birbirinden bağımsız olarak iş görebileceğini göstermiştir. MT'ler bu

özellikleri sayesinde ağır metal detoksifikasyonunda önemli roller oynamaktadır. (Chen vd., 1999, Marc vd., 2001)

2.3.3.2 Isı Şoku Proteinleri

Organizmalar yüksek sıcaklık, ağır metal ve diğer kimyasallara, toksinlere, oksidanlara, bakteriyel ve viral infeksiyonlara, tuz ve kuraklık streslerine maruz kaldıktan sonra gen ekspresyonu paterninde köklü değişimler meydana gelir ve genellikle stres proteinleri olarak anılan ısı şoku proteinlerinin sentezini başlatırlar. Isı şoku proteinleri genellikle moleküler şaperonlar olarak adlandırılırlar, yeni sentezlenen proteinlerin taşınması, katlanmaları, bir araya gelmelerinde önemli rollere sahiptirler ve proteinlerin anormal konformasyonunu engellerler. Ayrıca stres koşulları altında proteinlerin korunması ve tamirinde iş görebilirler (Köhler vd., 1999; Köhler vd., 1999; Morimoto, 1993; Kadyrzhanova vd., 1998; Bierkens vd., 1998; Deegenaaars ve Watson, 1997). Isı şoku proteini sentezinin bugüne kadar araştırılan tüm organizmalarda filumdan bağımsız olarak yüksek düzeyde homoloji gösterdiği ve ısı şoku yanıtı bakterilerden algilere, mayalara ve yüksek bitki ve hayvanlara kadar gözlenmiştir (Tedengren, 1999; Deegenaaars ve Watson, 1997).

Hücrelerin çevresel uyarılara karşı yanıt vermeleri ilk kez Ritossa tarafından 1962'de *Drosophila*'nın tükürük bezi politen kromozomlarında, artan sıcaklık uygulamasından sonra bir dizi kromozomal pufun indüklenmesiyle gözlenmiştir. Lewis 1975 yılında ısı şoku pufurlarıyla, ısı ile indüklenen polipeptidler arasında bir korelasyon olduğunu bildirmiştir (Joshi ve Tiwari, 2000).

Isı Şoku Proteinlerinin Sınıflandırılması

Isı şoku proteinleri moleküler ağırlıklarına göre, 17-30 kDa (küçük molekül ağırlıklı stres proteinleri), 60 kDa (şaperonlar), 70 kDa, 83 kDa ve >100 kDa'dan ağır stres proteinleri olmak üzere 5 grup altında toplanabilirler (Kropat vd., 1995; Bierkens, 1998). En yaygın stres proteinleri HSP60, HSP70 ve HSP90 aileleridir. Stres proteinleri türler arasında oldukça fazla homoloji gösterirler. Bugüne kadar araştırılmış ve evrimsel açıdan oldukça fazla korunum gösteren proteinler arasında en yaygın biçimde çalışılan stres proteini HSP70'tir (Tedengren, 1999).

Isı Şoku Proteinlerinin Fonksiyonları

HSP70, sitoplazma, mitokondri ve Endoplazmik retikulum lümeninde bulunan oldukça geniş bir multigen ailesidir. HSP70'ler ekstrem sıcaklıklar, hücresel enerji kaybı ve aminoasit analogları gibi stres faktörleri tarafından indüklenirler ve indüksiyonun, hücrede yanlış

katlanmış ya da katlanmamış proteinlerin konsantrasyonuyla orantılı olarak gerçekleştiği bulunmuştur (Köhler vd., 1996).

HSP70'lerin tüm şaperonlar gibi temel özellikleri, katlanmamış polipeptidlere bağlanmak ve ATP bağımlı bir reaksiyonla onları serbest bırakmaktır. HSP70 hatalı katlanmış proteinlere karşı güçlü bir afinite gösterir ve onların ATP'e bağımlı bir reaksiyonla düzgün membran kompleksleri içine yeniden girmelerini sağlayarak doğal konformasyonlarını bulmalarına yardım eder. HSP70'ler protein biyogenezinin hemen hemen her aşamasında bulunurlar. Diğer aktivitelerin yanı sıra yeni sentezlenmiş polipeptid zincirlerinin ribozomdan çıkarken doğru biçimde katlanmasına yardım ederler, transmembran protein transportuna katılırlar ve denatüre edilmiş proteinlerin agregasyonunu engellerler. HSP70 protein ailesi ayrıca gametogenez ve embriyogenezde de anahtar rol oynamaktadır (Del Razo, 2001; Schroda, 1999). Farklı izoformlar peptid bağlamada çok az seçiciliğe sahiptirler ve bu yüzden fonksiyonel spesifitelerinin çoğunlukla farklı hücre içi yerleşimlerden ve diğer proteinlerle spesifik etkileşimlerinden dolayı artış gösterdiği görülmektedir. Bu yardımcı şaperonların en iyi bilineni bakteriyel DnaJ ve GrpE proteinleri ile bunların ökaryotik homologlarıdır.

HSP70 izoformları yüksek bitki kloroplastlarında ya kloroplastın dış zarfında ya da stromada bulunurlar. Stroma HSP70'leri öbakteriyel ve mitokondriyal proteinlerle daha yakın ilişki halindeyken, zarf HSP70'leri ökaryotik stres 70 proteinlerine daha fazla benzerlik göstermektedir.

Tek hücreli yeşil alg *Chlamydomonas*'ta üç adet HSP70 geni tanımlanmıştır. Analiz edilen genlerden HSP70A sitosolik HSP70'i kodlarken, HSP70B kloroplastın stromasına yerleşmiş bulunan gen ürününü kodlamaktadır. Her iki gen de belli bir süre karanlıkta inkübe edildikten sonra hem ısı şoku hem de ışık tarafından indüklenmektedir. HSP70B geni aynı zamanda sirkadien ritim tarafından da regüle edilmektedir (Schroda vd., 1999).

HSP70 gen ekspresyonu ayrıca hücre siklusuna da bağlıdır. Heat shock cognate (HSC) olarak bilinen diğer HSP70'ler sürekli eksprese edilirler. Isı şoku stresiyle ilgili esas transkripsiyon indüksiyon mekanizması, trimerik ısı şoku faktörünün (HSF'ler), HSP70'in 5' ucundaki TATA kutusunun üst bölgelerine lokalize olmuş ısı şoku elementlerine bağlanması ile gerçekleşir. HSP70'lerin ısı, metal ya da a.a analog transkripsiyon indüksiyonunun tümü HSF-HSE bağlanmasıyla gerçekleşir (Müller vd., 1992; Morimoto, 1993)

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan organizmalar

Çalışmamızda *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alginin farklı suşları kullanılmıştır. Yabani tip CC-1690 ve hücre duvarı lizisle kaldırılarak protoplast haline getirilmiş duvarsız mutant CC-400 ("wall-less") hücreleri Duke Üniversitesi koleksiyonundan temin edilmiştir. pCB 740 (yabani tip) ve pCB 873* ("heat-deleted") hücreleri ise Prof. Dr. Christoph F. Beck (Albert-Ludwigs Üniversitesi, Almanya) tarafından gönderilmiştir.

Hazırlanacak olan probun çoğaltılmasında kullanılacak olan *Escherichia coli* DH5a suşu ise Stratagene firmasından satın alınmıştır.

3.1.2 Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan *Chlamydomonas reinhardtii* hücreleri, katı ve sıvı Tris Asetat Fosfat besiyerinde (TAP Besiyeri), *Escherichia coli* DH5a suşu ise "Luria Bertani" katı ve sıvı besiyerlerinde yetiştirildi.

3.1.2.1 TAP Besiyeri ve Besiyerinin Hazırlanmasında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

TAP besiyeri hazırlamak için, 2.42 g Tris Baz (Trizma Base) 950 ml damıtık su içinde çözüldü ve 1 ml Glacial Asetik asit, 1 ml 1M Fosfat tamponu (pH 7.0), 1 ml Eser metal solüsyonu ve 50 ml B solüsyonu çözeltiye sırasıyla eklendi. Katı besiyeri için 20 g Bacto-Agar (Difco), slant ortamı için ise 20 g Bacto-Agar ve 4 g maya özütü eklendi. 23 dakika, 1.5 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi [19]. Besiyerinin hazırlanmasında kullanılan tampon ve çözeltiler aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı.

1M Fosfat Tamponu: 1 litre distile su içinde 106 g K_2HPO_4 (Merck), 53 g KH_2PO_4 (Merck) çözülerek hazırlandı ve 1 N HCl ile pH 7.0'a ayarlandı. 23 dakika, 1.5 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi

Eser (Trace) Metal Solüsyonu (1 l) : 22.0 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Sigma), 11.4 g H_3BO_3 (Carlo Erba Reagenti), 5.1 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (Fluka), 5.0 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (J.T. Baker), 1.6 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Sigma), 1.6 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Riedel-de Haën) ve 1.1 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (Sigma)

* pCB 873 "heat-deleted mutant" suşu Hsp70 promotorundaki ısı elementlerinin delesyona uğratılmasıyla oluşturulmuş mutant bir suştur.

metalleri sırasıyla 550 ml deiyonize su içinde çözüldüler. 50 g EDTA pH'sı KOH ile 7'ye ayarlanarak, 250 ml deiyonize su içinde çözüldü. Metal karışımı 70°C'ye kadar ısıtıldı ve üzerine EDTA çözeltisi eklendi. pH % 20'lik KOH ile 6.5-6.8'e ayarlandı. Karışım 1 l'ye tamamlandı ve rengi mor oluncaya kadar +4°C'de birkaç hafta bekletildi. Mor renk oluşumu gözlemlendikten sonra çözelti kaba filtre kağıdı kullanılarak filtre edildi. Besiyeri içerisine eklendikten sonra sterilize edildi (Hutner vd., 1950).

Bejerinck Solüsyonu (B Solüsyonu): 1 litre distile su içinde 8 g NH_4Cl (Fluka), 1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck) çözülerek hazırlandı. 23 dakika, 1.5 atm basınç altında otoklavlanarak sterilize edildi

3.1.2.2 “Luria Bertani” Besiyeri

LB Besiyeri, 10 g Trypton (Bactotryptone, Mikrobiologie), 5 g maya özütü (yeast extract, Mikrobiologie) ve 10 g NaCl 'ün 1 l distile su içerisinde çözülüp, otoklavlanarak steril edilmesiyle hazırlandı. Katı ortam için 15 g agar ortama ilave edilip, sterilize edildi.

3.1.3 Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

RNA, DNA ve protein çalışmalarında kullanılan kimyasal madde ve çözeltiler ayrı gruplar halinde ve kullanım sırasına göre belirtilmiştir.

3.1.3.1 RNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Dietilpirokarbonatlı su: % 0.1 (v/v)'lik dietilpirokarbonatın (Sigma) dH_2O içerisine konup, karıştırıldıktan sonra bir gece bekletilmesiyle hazırlandı, otoklavlanarak steril hale getirildikten sonra RNA çalışmalarında kullanılan tüm solüsyonların hazırlanması ve kapların temizlenmesinde kullanıldı.

2 x Ekstraksiyon Tamponu: 2.5 ml 1M Tris.Cl (pH 8.5), 3 ml 4M NaCl ve 5 ml 0.2M EDTA (pH 7.0) içeren çözeltinin hacmi damıtık su ile 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildikten sonra üzerine 10 ml % 20'lik (w/v) SDS çözeltisi ilave edildi.

NaCl: 4 M'lık stok çözelti; 116.88 g NaCl 'ün (Riedel-de Haën) 500 ml damıtık su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

N-Lauril Sarkosin: % 20'lik (w/v) N-lauril sarkosin (Sigma) damıtık su içerisinde çözülerek hazırlandı.

Proteinaz K: Proteinaz K (Promega) son konsantrasyonu 10 µg/ µl olacak şekilde steril damıtık su içerisinde çözülerek hazırlandı ve -20 ° C' de muhafaza edildi.

Yıkama Tamponu (Wash Buffer) : 1 ml 1M Tris.Cl (pH 7.5), 2 mg sikloheksimit (Sigma) ve 20 mg kloramfenikol (Sigma) 99 ml DEPC'li su içinde çözöldü ve hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

20x RNA Jel Tamponu: 8.24 g MOPS (Sigma), 50 ml 200 mM'lık DEPC'li su ile hazırlanmış 50 ml sodyum asetat (Merck) içerisinde çözöldü ve pH'sı 2 N NaOH (Merck) ile 7.2'ye ayarlandı. Çözeltinin üzerine 20 ml 50 mM EDTA (DEPC'li) eklendi ve hacim DEPC'li su ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0.22 µm'lik membran filtreden (Millex-GS) geçirilerek sterilize edildi.

Sodyum asetat (NaAc): 3 M'lık stok çözelti 24.6 g sodyum asetatın (Merck) 100 ml steril distile su içinde çözölməsi ve pH'nın 5.2'e ayarlanmasıyla hazırlandı.

RNA Denatüre Edici Kokteyl: Her bir RNA örneği için 1 µl 20 x RNA jel tamponu, 1,5 µl % 37'lik formaldehit (Carlo-Erba Reagenti), 10 µl formamidin (Merck) bir araya getirilmesiyle hazırlandı.

RNA Elektroforez Tamponu (% 2 Formaldehit içeren): 27 ml % 37'lik formaldehit (Carlo Erba Reagenti) ve 25 ml 20 x RNA jel tamponu içeren elektroforez tamponunun son hacmi DEPC'li su ile 500 ml'ye tamamlandı.

RNA Örnek Tamponu: 50 mM EDTA, % 0.1 (w/v)'lik bromofenol blue (Roth), % 0.1 (w/v)'lik ksilen siyanol (Sigma) ve % 15 (w/v)'lik fikor (Sigma) içeren tampon RNA örneklerinin elektroforezlenmesinde kullanıldı.

20 x SSPE: 175.3 g NaCl, 27.6 g NaH₂PO₄ (Merck) ve 7.4 g EDTA (Carlo-Erba Reagenti) 800 ml dH₂O içerisinde çözöldü. 10 N'lik NaOH (Merck) ile pH'sı 7.4'e ayarlandı ve hacim 1 l'ye tamamlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi.

Na₂HPO₄: 1 M'lık stok çözelti; 88.99 g Na₂HPO₄'ün (Merck) 500 ml dH₂O içerisinde çözölüp, pH'sının 7.2'ye ayarlanmasıyla hazırlandı.

5 x LS: 250 µl 1 M İmidazol-HCl (Fluka) , pH 6.6, 125 µl 0.1 M MgCl₂ (Fluka) , 2 µl β-merkaptöetanol (Sigma), 0.5 µl dATP (Promega, 100 mM'lık stok), 0.5 µl dGTP(Promega, 100 mM'lık stok) ve 0.5 µl dTTP (Promega, 100 mM'lık stok) içeren 5x LS'nin son hacmi sterilize edilmiş damıtık su ile 500 µl'ye tamamlandı.

İmidazol-HCl: 1 M'lık imidazol-HCl çözeltisi için; 0.680 g İmidazol (Fluka), 10 ml dH_2O içerisinde çözülüp pH'sı 6.6'ya getirildi.

MgCl₂: 0.1 M'lık stok çözelti; 0.203 g MgCl₂'ün (Fluka) 10 ml dH_2O içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

STE: 0.292 g NaCl'ün (Riedel-de Haën) 50 ml 1x TE tamponu içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

Hibridizasyon Tamponu: 2.5 g toz BSA (Sigma) 0.93 g EDTA (Carlo-Erba Reagenti) ve 17.5 g SDS , hafifçe ısıtılarak steril damıtık su içerisinde çözüldü ve üzerine 125 ml 1.5 M Na_2HPO_4 (pH 7.2) eklendi. Hacim 250 ml'ye tamamlanıp, oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Hibridizasyon Sonrası Yıkama Tamponu: 2 x SSPE ve % 0,5 SDS (w/v) içeren solüsyonun hacmi steril distile su ile ayarlandı. Taze olarak hazırlandı.

Geliştirme Çözeltisi: 29.6 g Na_2CO_3 (Riedel-de Haën) distile su içerisinde çözülür, üzerine 0.5 ml % 37'lik formaldehit (Carlo-Erba Reagenti) eklenerek çözeltinin hacmi damıtık su ile 1 l'ye tamamlanır.

3.1.3.2 DNA Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

% 1 Agaroze Jel: Hazırlanacak jel hacminin % 1'i kadar agaroz (Sigma) üzerine 1 x TBE tamponu eklenip, agarozun mikrodalga fırında eritilmesiyle hazırlandı. Biraz soğuduktan sonra, jelde yürümekte olan DNA'ları görünür hale getirmek için jel içerisine 2 μl EtBr (5 mg/ml) eklendi.

5 x TBE Tamponu: 54 g Tris-HCl (Sigma) , 27,5 g Borik asit (Sigma) ve 20 ml 0,5M EDTA, pH 8.0'nın 1 l distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı ve otoklavlanarak sterilize edildi.

STET: % 8 sukroz (Sigma), 50 mM EDTA, pH 8.0 ve 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 içeren çözeltinin hacmi distile su ile 99,5 ml'e tamamlandı. Otoklavlanarak sterilize edildikten sonra % 0,5 Triton X-100 (Sigma) eklenerek son hacmin 100 ml olması sağlandı.

Amonyum Asetat: 4 M'lık stok çözelti 77,08 g amonyum asetatın (Fluka) 250 ml distile su içerisinde çözüldükten sonra otoklavlanarak steril edilmesiyle hazırlandı.

Tris.HCl: 1 M'lık çözelti için; 121.14 g Tris.baz (Sigma) 800 ml damıtık su içerisinde çözüldü. pH'sı derişik HCl ile istenilen değere ayarlandı ve çözeltinin hacmi damıtık su ile 1 l'ye tamamlandı.

1x TE: 10 mM Tris.HCl ve 1 mM EDTA, pH 8.0'ın istenilen hacimdeki distile su içerisinde eklenmesiyle hazırlandı.

EDTA: 0.5 M EDTA çözeltisi; 93.5 g EDTA (Carlo-Erba Reagenti)'nin son hacim 500 ml olacak şekilde dH₂O içerisinde çözülmesi ve 10 N'lik NaOH ile pH'nın 8.0'e ayarlanması ile hazırlandı.

3.1.3.3 Protein Çalışmalarında Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Ekstraksiyon Tamponu: 0,05 M sukroz ve 0,01 M Tris-HCl, pH 8.0 içerir.

Benzamidin: 100 mM'lık stok çözelti; 0.01566 g benzamidinin (Sigma) 1 ml dH₂O içinde çözülmesi ile hazırlandı ve stok çözelti +4°C'de saklandı.

Ditiyotritol: 1 M'lık çözelti 15,45 g DTT'nin 100 ml su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi.

PMSF: 0.87 g PMSF'in (Fluka) 50 ml izopropanol ile çözülmesiyle 100 mM'lık stok çözelti hazırlandı ve çözelti 1 ml'lik alikotlara ayrılıp -20° C'de muhafaza edildi.

BSA: 10 mg/ml'lik BSA çözeltileri Promega'dan hazır olarak satın alındı ve -20°C'de muhafaza edildi.

% 30 Akrilamid Karışımı: 29,17 g akrilamid (J.T.Baker) ve 0,83 g bisakrilamidin (Sigma) yaklaşık 80 ml distile suda çözülüp, son hacim 100 ml'e tamamlandıktan sonra gün boyu karıştırılmasıyla hazırlandı ve steril filtreden geçirilerek sterilize edildi.

Amonyum Persülfat: % 10'luk (w/v) amonyum persülfat (Sigma) 0.1 g APS'nin 1ml dH₂O içinde çözülmesiyle hazırlandı ve taze olarak kullanıldı.

1 x Protein Örnek Tamponu: % 30 (w/v) sukroz (Sigma), % 5 (w/v) SDS, % 0.1 Bromofenol mavisi (Roth)'nin distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

1 x Protein Örnek Tamponu (Doğal jel elektroforezi için): 0,0625 M Tris.Cl (Sigma), pH 6.8, % 10 (v/v) gliserol (Sigma), % 5 (v/v) 2-merkaptotanol (Sigma), % 0,02 bromofenol mavisi (Roth) içerir.

5 x Protein Elektroforez Tamponu: 15.1 g Tris.HCl (Sigma), 72 g Glisin (Merck), 5 g SDS (Sigma) 1 l distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Elektroforez öncesi, 5 kez sulandırılarak pH'ı 8.3'e ayarlandı.

5 x Protein Elektrophorez Tamponu (Doğal jel elektrophorezi için): 15.1 g Tris.HCl (Sigma), 72 g Glisin (Merck)'in 1 l distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı. Elektrophorez öncesi, 5 kez sulandırılarak pH'ı 8.3'e ayarlandı.

Coomassie Blue Protein Jeli Boyama Solüsyonu: % 0.25 (w/v) Coomassie Blue R250 (Roth), % 50 (v/v) metanol (Merck) ve % 10 (v/v) asetik asitin (Riedel-de Haën) distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

Poliakrilamid Jel Boya Çıkarma Solüsyonu: % 10 (v/v) metanol ve % 5 (v/v) asetik asitin distile su içerisinde çözülmesiyle hazırlandı.

Dietilditiyo-Karbamik Asit: % 0.2'lik (w/v) dietilditiyo-karbamik asitin (Sigma) dH₂O içerisinde çözülmesiyle hazırlandı ve bakır boyama çalışmasında taze olarak kullanıldı.

3.2 Metod

3.2.1 *Chlamydomonas reinhardtii* Yeşil Alg Kültürü

Chlamydomonas reinhardtii yeşil algi katı (slant ve petri) ve sıvı TAP ortamlarında yetiştirilebilmektedir. Katı ortamlar besin içeriği bakımından daha zengin olup, hücrelerin uzun süre saklanmasını sağlamaktadır.

Steril koşullar altında yetiştirilen slant ortamındaki algler ayda bir, petri ortamındakiler 2 haftada bir, sıvı besiyerindekiler ise haftada bir yeni ortama aktarıldı. Çalışmalarımızda kullanılan hücreler, Sanyo Gallenkamp optik çalkalayıcıda, 23 °C sıcaklık ve 10000 lux ışık şiddeti altında, 16 saat aydınlık: 8 saat karanlık koşulları uygulanarak ve 100 rpm hızda sürekli çalkalanarak yetiştirildi.

3.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarının Farklı Bakır Konsantrasyonlarında Üreme Eğrilerinin Çıkarılması

Ağır metallerin farklı konsantrasyonlarının hücrenin üremesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla 0, 50 ve 100 μM CuCl_2 (Riedel-de Haën) içeren sıvı TAP ortamlarına, katı besi ortamında bulunan CC-1690, CC-400 ve pCB 740 suşlarından ekim yapılarak sıvı kültür başlatıldı. Belirli zaman aralıklarında kültürden 500 μl örnek alındı. Hareket halindeki alg hücrelerinin sayılabilmesi için örnek içerisine bir damla iyot içeren fiksasyon çözeltisi (0,25 g iyotun 100 ml etanolde çözülmesiyle hazırlanan) eklenerek hücreler fiks edildi. Hücreler Thoma lamı kullanılarak mikroskop altında sayıldı ve elde edilen sayının zamana göre üreme eğrisi çizildi. Deneyler 3 kez tekrarlandı ve ölçümlerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları belirlendi. Microcal Origin programında Tek Yönlü ANOVA analizi uygulanarak (0,05 güven aralığında) metal varlığındaki hücre miktarları, herhangi bir metalin uygulanmadığı kontrol hücre miktarlarıyla karşılaştırıldı.

3.2.3 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Toplama Kapasitesinin Belirlenmesi

Chlamydomonas reinhardtii CC-1690 ve CC-400 suşlarında biriken bakır miktarını ve bakırın hücrelerdeki biyokonsantrasyon faktörünü belirlemek amacıyla,

- Üremenin logaritmik fazında bulunan hücre kültürlerine 0, 50, 100 μM CuCl_2 metali 24 saat boyunca uygulandı ve belirli zaman aralıklarında (0, 0.5, 1, 4, 8, 16, 24. saat) 20'şer ml örnek alındı

- 4000 rpm' de 10 dakika çöktürüldü ve üst sıvı (besiyeri) daha sonra AAS ölçümü yapılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.
- Hücre çökeltileri ağırlıkları sabit bir düzeye erişinceye kadar (1 gece boyunca) 72°C'de kurutuldu ve ertesi gün kuru ağırlığı belirlendi.
- Alev Atomik Absorpsiyon Spektrometresinde analiz edilecek olan örneğin sıvı olması gerektiği için hücre çökeltileri yaş yakma yöntemiyle (Memon vd., 1979) AAS ölçümüne hazır duruma getirildi. Bunun için, pelletlere ilk önce 2 ml HNO₃ (Carlo Erba Reagenti) eklendi
- 80°C'de kahverengimsi bir duman çıkana dek (yaklaşık 1 saat) ısıtıcı tabla üzerinde kaynatıldı.
- Kahverengi duman çıkışı tamamlandığında 1 ml HClO₄ (Carlo Erba Reagenti) eklenip, ısıtıcı tablanın sıcaklığı 250 °C'ye çıkarıldı ve beyaz duman çıkışı gerçekleşikten (yaklaşık 15 dakika) sonra örnekler soğumaya bırakıldı.
- Soğuma gerçekleştiğinde ddH₂O ile örnekler 10 kez sulandırıldı.
- Bakır birikiminin tayininde kullanılacak olan bakır standartları ddH₂O ile 1 ppm, 2 ppm ve 4 ppm konsantrasyonlarında hazırlandı.
- Standartların ve tüm örneklerin elemental analizleri Alev AAS ile hava ve asetilen karışımı kullanılarak yapıldı.
- Ölçümler yapıldıktan sonra hücre tarafından biriktirilen CuCl₂ miktarı ve CuCl₂'nin hücrelerdeki biyokonsantrasyon faktörleri sırasıyla (3.1) ve (3.2) eşitliklerinin yardımıyla belirlendi (Yan ve Pan, 2002).

$$\text{Biyokümümlasyon Miktarı (mgCu /g kuru ağırlık)} = \frac{\text{Aletsel ölçüm değeri (mg/l)} \times \text{Örnek hacmi (0.02 l)}}{\text{g kuru ağırlık}} \quad (3.1)$$

$$\text{Biyokonsantrasyon faktörü (BCF)} = \frac{\text{Biyokümümlasyon miktarı (mgCu/g kuru ağırlık)}}{\text{Ortamdaki Cu konsantrasyonu}} \quad (3.2)$$

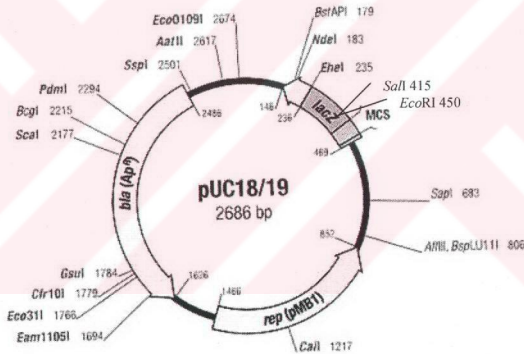
3.2.4 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Varlığında HSP70 ve Metallothiyonin Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi

Chlamydomonas reinhardtii suşlarına ağır metal stresi uygulandığında, ısı şoku proteini (HSP70) ve metallothiyonin ekspresyonunun indüklenip indüklenmediğini RNA düzeyinde incelemek amaçlandı.

3.2.4.1 Radyoaktif İşaretli Probların Hazırlanması

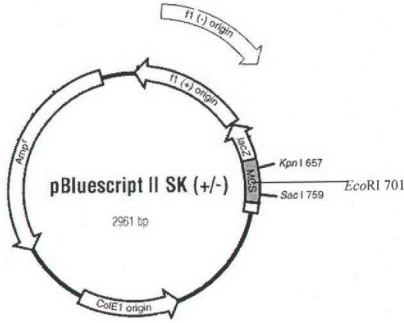
C. reinhardtii hücrelerinde ağır metal stresine karşı HSP70 ve metallothiyonin ekspresyonunu RNA düzeyinde incelemek amacıyla, α -³²P-dCTP işaretli proplar kullanıldı.

HSP70 probunu hazırlamak için kalıp olarak kullanılan *C. reinhardtii* pCB 413 suşuna ait HSP70B geni, Prof. Dr. Christoph F. Beck tarafından pUC 18 vektörü (2686 bp) içerisinde gönderilmiştir. HSP70B fragmenti pUC 18 vektörünün *EcoRI* - *SalI* kesim bölgesinde ve 200 bp büyüklüğündedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 HSP70B DNA'sını taşıyan pUC18 vektörü (MBI Fermentas Ürün Kataloğu)

Metallothiyonin probunun hazırlanmasında kalıp olarak *Vicia faba* MT-1b DNA'sı kullanıldı. *Vicia faba* metallothiyonin proteinini kodlayan MT-1b cDNA'sını taşıyan pBSK rekombinant plazmidi, Kaliforniya Üniversitesi'nde görev yapmakta olan Rhonda Foley'den işaretlemelerde prob olarak kullanılmak üzere temin edildi. MT-1b cDNA klonu yaklaşık 3 kb büyüklüğünde ve ampisiline dirençli pBSK vektörü içinde, multiklonlama bölgesindeki 701. baz çiftinde bulunan *EcoRI* kesim bölgesine yerleşik durumda ve 467 bp uzunluğundadır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 MT-1b DNA'sının içinde bulunduğu pBSK klonlama vektörü

HSP70B ve MT-1b problemleri aşağıdaki yöntemlerin belirtilen sırada uygulanmasıyla hazırlandı.

Problemlerin Çoğaltılması

Prob hazırlanmasında kalıp olarak kullanılacak olan *HSP70B* fragmentini çoğaltmak amacıyla ampisiline dirençli rekombinant pUC18 plazmidi ve MT-1b fragmentini çoğaltmak amacıyla da pBSK rekombinant plazmidi *Escherichia coli* DH5 α kompetant hücrelerinde klonlandı.

- Transformasyonu gerçekleştirmek amacıyla öncelikle -80°C'de saklanmakta olan kompetant hücrelerin buz üzerinde çözünmeleri sağlandı.
- 25 μ l hücreye 1 μ l plazmid DNA'sı ilave edilerek, 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Ardından hücrelere 45 saniye 42°C'de ısı şoku verildi, 15 dakika buzda bekletildi.
- Hücreler ampisilin içeren seçici katı LB ortamına ekildi. Gece boyunca 37°C'de inkübe edildi.

Plazmid DNA İzolasyonu

Transformasyonla bakteri hücresine aktarılan plazmid DNA'sının izolasyonunu sağlamak amacıyla, seçici LB ortamında oluşan kolonilerden bir tanesi 100 μ g/ml ampisilin içeren 30 ml sıvı LB besiyerine ekildi. Gece boyu 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün hücrelerin 600 nm dalga boyundaki absorpsiyonları 0,6'a ulaştığında plazmid DNA'sı izole edildi.

HSP70B fragmentini taşıyan rekombinant pUC 18 plazmidinin izolasyonunda Clontech NucleoBond Plasmid Midi Kit (Cat. No. K3002-X) kullanıldı.

MT-1b fragmentini taşıyan pBSK plazmidini ise Kaynama Metodu (Hot Boiling Method) ile aşağıda belirtildiği gibi izole edildi (Holmes ve Quigley, 1981).

- Tek bir koloniden elde edilen 1,5 ml kültür, 11500 rpm'de 3 dakika çöktürüldü.
- LB ortamının 50 µl'si tüpte bırakılacak şekilde üst sıvı döküldü ve pellet vorteksenerek süspanse edildi.
- Süspansiyona 350 µl STET ve 20 µl lizozim eklendi (Stok lizozim, 20 mg/ml olacak şekilde 250 mM Tris-HCl, pH 7.4 içinde hazırlandı) ve yavaşça vortekslenildikten sonra 5 dakika buz üzerinde bekletildi.
- Ardından hücreler 1 dakika boyunca kaynar suda tutulduktan sonra 5 dakika buzda soğutulup 30 dakika 11500 rpm'de çöktürüldü.
- Pellet bir kürdan yardımıyla alındı ve süpernatanta 200 µl 4M amonyum asetat ile tüpü dolduracak kadar soğuk izopropanol eklenip hafifçe karıştırıldı.
- -80°C'de yarım saat bekletildikten sonra 30 dakika 11500 rpm'de santrifuj edilerek plazmid DNA'sı çöktürüldü.
- Üst sıvı atıldıktan sonra 500 µl % 70 etanol eklenip, 5 dakika 11500 rpm'de çöktürüldü.
- Süpernatant atıldı ve pellet kurutulduktan sonra 50 µl TE'de çözülerek -20°C'ye kaldırıldı.
- İzole edilen plazmid DNA'sı %1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Plazmid Kesimi

Plazmid izolasyonundan sonra, pUC18 plazmidinden *HSP70B* fragmentini çıkarmak amacıyla plazmid DNA'sı ilk önce 60 ünite *EcoRI* enzimiyle 37°C'de 4 saat inkübe edilerek kesildi. Ardından kesim ürünü etanolle çöktürüldü ve 70 ünite *SalI* enzimiyle 37°C'de 4 saat inkübe edilerek kesildi. Kesim reaksiyonları Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi kuruldu. Kesim ürünü % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi ve *HSP70B* fragmenti gözlemlendi.

pBSK plazmidinden MT-1b fragmentini çıkarmak amacıyla da plazmid DNA'sının 40 µl'si 40 ünite *EcoRI* enzimiyle, 5 µl O⁺ tamponu varlığında 37°C'de gece boyu kesildi. Ertesi gün 5 µl RNaz ile 37°C'de yarım saat inkübe edildi ve kesim % 1'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Çizelge 3.1 pCB413 *HSP70B* fragmentini taşıyan pUC18 plazmidinin restriksiyon enzimleriyle kesim reaksiyonu

Enzim*	Reaksiyon tamponu (10x)	DNA miktarı (15 µg)	dH ₂ O
<i>Eco</i> RI (6 µl)	O ⁺ (20 µl)**	60 µl	114 µl
<i>Sal</i> I (7 µl)	O ⁺ (20 µl)	70 µl	104 µl

***HSP70B* ve MT-1b Genlerinin Düşük Erime Noktalı Agaroza Jelden Geri Kazanılması**

Kesilen plazmid DNA'larından *HSP70B* ve MT-1b genlerini ayırıp izole etmek için kesim ürünü % 1'lik düşük erime noktalı agaroz jele yüklendi, elektroforez işlemi 2,5 saat boyunca 60V akımda gerçekleştirildi. Elektroforez sonucunda jel transillüminatörde 312 nm UV ışık altında gözlemlendi ve genin bulunduğu kısım bisturi ile kesilerek ependorf tüpüne alındı.

HSP70B fragmenti kitte bulunan "Nucleospin Extraction Spin" kolonu aracılığıyla jelden geri kazanıldı.

MT-1b cDNA'sı ise aşağıda belirtilen yöntemle jelden geri kazanıldı.

- Üzerine 200 µl TE eklendi ve 65°C'de 5 dakika bekletildi.
- Üzerine 200 µl fenol eklenerek, 2 dakika karıştırıldı, 65°C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra tekrar 2 dakika vorteksle karıştırıldı.
- 25°C'de 13000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi.
- Üst sıvı ayrı bir tüpe aktarıldıktan sonra ilk tüpteki pellete 100 µl TE eklendi, vorteksle karıştırıldı.
- 65°C'de 3 dakika ısıtılıp tekrar vorteksle karıştırıldı.
- 25°C'de 13000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı diğer tüpteki sıvının üzerine eklendi.
- Pelletin 100 µl TE ile yıkanması işlemi yukarıda belirtildiği gibi 2 kez daha tekrarlandı

* Enzimlerin 1µl'si 10 ünitidir.

** O⁺ tamponu, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA içermektedir.

- Üst sıvı iki tüpe bölünüp, üzerlerine 400 µl kloroform: isoamil alkol (24:1) eklenerek 2 dakika vorteksle karıştırıldı.
- 25°C'de 13000 rpm'de, 5 dakika santrifuj edildi.
- Üst sıvı yeni tüpe aktarılıp üzerine 1/10 hacim 3M NaAc, pH 5.2 ve 1/25 hacim soğuk etanol eklendi.
- -80°C'de yarım saat bekletildikten sonra 13000 rpm'de yarım saat santrifuj yapıldı ve MT-1b DNA'sı çöktürüldü.
- Pellet üzerine 500 µl % 70 etanol eklendi, 13000 rpm'de 5 dakika santrifuj edilerek pelletler yıkandı ve kurutulduktan sonra 5 µl TE'de çözüldü ve daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.
- DNA'nın konsantrasyonu 0,2156 µg/ml olarak belirlendi.

Proben Radyoaktif İşaretlenmesi ve Saflaştırılması (Feinberg ve Vogelstein, 1983)

Ekspresyonun incelenmesinde kullanılacak olan probu elde etmek amacıyla, plazmidlerden ayrılan HSP70B ve MT-1b fragmentleri *in vitro* DNA sentezinde kalıp olarak kullanıldı ve "Random primed" işaretleme yöntemi ile tamamlayıcı DNA zinciri sentezlenirken yapıya rastgele biçimde α -³²P-dCTP'lerin girmesiyle problemler işaretlendi. Bu amaçla,

- 5 µl 5 x LS , 2.5 µl BSA (2 mg/ml stoktan), 5 µl α -³²P-dCTP (25µCi), 1 µl Random primer (Promega) ve 1 µl Klenow enzimi (Promega) bu sırayla bir tüp içerisine konularak bir kokteyl hazırlandı.
- Kalıp DNA'nın 1 µl'si alınarak steril distile su ile hacim 10.5 µl'ye tamamlandı.
- Hazırlanan DNA karışımı 100°C'de 3 dakika denatüre edildikten sonra buz üzerinde 0 °C'ye soğutuldu.
- Üzerine daha önceden hazırlanan kokteyl eklendi ve gece boyu oda sıcaklığında inkübasyon gerçekleştirildi.
- Ertesi gün 2.5 µl 0.5 M EDTA, pH 8.0 eklenerek primerin radyoizotopla işaretlenmesi reaksiyonu durduruldu.
- 25 µl olan örnek hacmi STE tamponu ile 60 µl'ye tamamlandı.
- Hazırlanan probun saflaştırılması amacıyla sefadeks G-50 kolon kullanıldı.

- Kolonu hazırlamak için, 5 g Sefadeks G-50 (Sigma), 50 ml 1 x TE tamponunda çözüldü.
- Temiz bir örnek tüpüne (15 ml'lik) yerleştirilmiş 2 ml'lik şırınganın ağzına daha önceden otoklavlanarak sterilize edilmiş cam pamuğu (Supelco) kapatıldı.
- Üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde Sefadeks G-50 karışımı eklendi ve 1500 rpm'de 1 dakika çöktürülerek TE tamponunun çıkarılması sağlandı.
- Kolon materyali seviyesi 2 ml'ye ulaşınca kadar kolon materyali eklemeye devam edildi. Hazırlanan kolon 2 kez 100 µl STE tamponuyla yıkandı.
- Hazırlanan prob sefadeks G-50 kolona konup, 5000 rpm'de 1 dakika santrifujlenerek saflaştırıldı. Saflaştırılan prob -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4.2 RNA Deneylerinde Kullanılacak Malzemelerin Hazırlanması

RNA ile yapılacak çalışmalarda kullanılacak cam ve plastik malzemeler % 0,1'lik (v/v) DEPC çözeltisi ile doldurulup, 2 saat 37°C'de bekletildi ve steril distile su ile durulandıktan sonra 15 dakika 121°C'de 1,5 atm basınçta otoklavlanarak kullanıma hazır hale getirildi.

Elektroforez işleminde kullanılacak tank, kaset ve taraklar ise deterjanlı su ile iyice yıkanıp distile su ile durulandı ve etanolla muamele edildi. Ardından tank içerisine % 3'lük (v/v) H₂O₂ (J.T. Baker) çözeltisi doldurulup, 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra % 0,1'lik DEPC'li su ile durulandı (Sambrook vd., 1989).

3.2.4.3 *Chlamydomonas reinhardtii* Hücrelerinden RNA İzolasyonu (von Gromoff vd., 1989)

HSP 70 ekspresyonunu incelemek amacıyla üremenin logaritmik fazında bulunan pCB 740 ve pCB 873 suşlarına 0, 5, 50, 100 µM CuCl₂, 0, 5, 20, 100 µM CdCl₂ ve 0, 0,5, 1, 2, 5 µM Pb(NO₃)₂ metalleri 3 saat boyunca uygulandı. Daha sonra hücrelere, 40°C sıcaklıkta yarım saat bekletilerek, ısı şoku stresi verildi.

MT ekspresyonunu incelemek amacıyla da üremenin logaritmik fazındaki CC-1690 ve CC-400 hücrelerine 50 µM ve 100 µM CuCl₂ uygulandı ve belirli zaman aralıklarında (0, 4, 8, 16, 24. saatlerde) kültürden örnek alındı.

RNA izolasyonu aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

- Stres uygulanan hücrelerin 15 ml'si 4000 rpm'de, +4°C sıcaklıkta, 10 dakika

çöktürüldü.

- Üst sıvı atıldıktan sonra, elde edilen hücre pelleti 300 µl yıkama tamponunda (Wash Buffer) çözülerek mikrosantrifuj tüpüne aktarıldı ve üzerine 300 µl 2 x ekstraksiyon tamponu, 30 µl % 20 (w/v) N-Lauril sarkosin ve 15 µl Proteinaz K (10 µg/µl) eklenerek pipetle köpürtülmeksizin karıştırıldı.
- Örnekler çalkalayıcıda 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 300 µl fenol (Sigma) eklendi ve 15 dakika çalkalandı
- 300 µl 24:1 kloroform:izoamil alkol eklendi ve 15 dakika çalkalandı.
- 13000 rpm'de, + 4°C sıcaklıkta, 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz dikkatli bir biçimde alınarak yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 300 µl fenol eklenip, 30 saniye vorteks yapıldı. 300 µl 24:1 kloroform:izoamil alkol eklenip 30 saniye daha vorteksle karıştırıldı.
- 13000 rpm'de, + 4°C sıcaklıkta, 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz ayrı bir tüpe alınıp üzerine 600 µl 24:1 kloroform:izoamil alkol eklendi, 30 saniye vorteks yapıldıktan sonra 13000 rpm'de, + 4°C sıcaklıkta, 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 60 µl 3 M NaAc, pH 5.2 eklenerek bir bulanıklık oluşuncaya kadar yavaşça çalkalandı.
- Üzerine 1,5 ml soğuk % 100'lük etanol eklendi ve birkaç kez yavaşça karıştırıldıktan sonra bir gece boyunca -20°C' de bekletildi.
- 13000 rpm'de, +4 °C sıcaklıkta, 20 dakika çöktürüldü.
- Üst sıvı atıldıktan sonra 200 µl DEPC ile muamele edilmiş su ile hazırlanmış % 70'lik etanol (v/v) eklenerek yavaşça birkaç kez karıştırılarak pelletin yıkanması sağlandı.
- 13000 rpm'de, +4 °C sıcaklıkta, 5 dakika çöktürüldü.
- Üst faz atıldıktan sonra pellet 20 dakika oda sıcaklığında kurutuldu.
- Pelletler 10 µl DEPC ile muamele edilmiş su içinde çözülerek, -80 °C' de saklandı.

3.2.4.4 RNA Miktarı ve Saflığının Belirlenmesi

C. reinhardtii suşlarından izole edilen RNA'ların miktar ve saflıkları spektral yöntem kullanılarak belirlendi. 1 µl RNA örneği 999 µl steril DEPC ile muamele edilmiş su içerisine eklendi ve kuartz küvete konup, pipetle iyice karıştırıldıktan sonra spektrofotometrede (Bio-Rad Smart Spec™ 3000) 260 nm'de yaptığı absorpsiyon ölçüldü. Aşağıdaki formüle göre RNA konsantrasyonu belirlendi. Ölçümde kör (blank) olarak 1ml DEPC ile muamele edilmiş su kullanıldı. RNA örneklerinin saflığı ise 260 nm'deki absorpsiyon değerinin 280 nm'deki absorbans değerine oranlanmasıyla belirlendi (Sambrook vd., 1999).

$$\text{RNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/ml}) = 260 \text{ nm'deki OD} \times \text{sulandırım oranı} \times \text{katsayı} (40)^* \quad (3.4)$$

3.2.4.5 Denatüre Edici Agaroze Jel Elektroforezi (von Gromoff vd., 1989)

Elde edilen RNA'ların elektroforetik analizini yapmak amacıyla % 0.8 (w/v) agaroz ve % 2 (v/v) konsantrasyonunda formaldehit içeren denatüre edici agaroz jel kullanıldı.

150 ml agaroz jel, 1.2 g agaroz ve 7.5 ml 20 x RNA jel tamponunun 114 ml sterilize edilmiş DEPC'li su içerisinde kaynatılmasının ardından kuvvetli bir biçimde çalkalanıp, 27.7 ml % 37'lik (v/v) formaldehitin damla damla eklenmesiyle hazırlandı. Hazırlanan jel yatay elektroforez kasetine döküldü, uygun boyutta taraklar yerleştirildi ve yaklaşık 45 dakika polimerize olması beklenildi. Jel polimerize olduktan sonra kaset RNA elektroforez tamponuyla doldurulmuş tank içine uygun doğrultuda yerleştirildi ve jele RNA örnekleri yüklenmeden önce 50 V'ta 30 dakika ön koşum yaptırıldı.

Belli miktarda (µg cinsinden) RNA örneği alınıp son hacmi 7.5 µl olacak şekilde DEPC'li su ile dilüe edildi. Dilüe edilen RNA örneği, 12.5 µl RNA denatüre edici kokteyl ile 55 °C'de 15 dakika inkübe edilerek denatüre edildi ve buz üzerinde 5 dakika soğutuldu. Denatürasyon sonrasında örnekler 2 µl RNA örnek tamponu eklendi ve santrifüjde biraz çevrildikten sonra daha önceden ön koşum yapılmış olan jele yüklendi. Elektroforez işlemi 1.5 saat 80 V akımda gerçekleştirildi.

3.2.4.6 Northern Blotting

Ağır metal stresi varlığında *C. reinhardtii* suşlarında HSP70 ve MT ekspresyonunu belirlemek için "Northern Blotting" yöntemi ile incelemeler yapıldı.

* Tek zincirli RNA molekülü için 260 nm'deki 1 OD 40 µg/ml'dir.

RNA'ların Jelden Membrana Aktarılması (von Gromoff vd., 1989)

Denatüre edici jel elektroforezi ile ayrılan RNA örnekleri jelden membrana (Bio-Rad Zeta-Probe GT Genomic Tested Blotting Membrane, Cat # 162-0196) transfer etmek amacıyla,

- Elektroforez tamamlandıktan sonra jelle aynı boyutta bir adet membran ve dört adet 3MM filtre kağıdı (Whatman) kesilerek 10 x SSPE tamponu içerisinde 15 dakika ıslatıldı.
- Bir sünger kalıbı geniş bir plastik kaba yerleştirildi ve 700 ml 10 x SSPE tamponuyla hava kabarcığı kalmaksızın doyuruldu.
- Daha önceden tamponla doyurulmuş olan 2 kat 3MM filtre kağıdı bir penset aracılığıyla hava kabarcığı kalmayacak şekilde sünger üzerine yerleştirildi.
- Filtre kağıtları üzerine jel, üzerine membran ve tekrar iki kat 3MM filtre kağıdı birbirleriyle ve süngerle aralarında hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi.
- Sünger üzerinde açıkta kalan kısımlar parafilmle kapatıldı ve filtre kağıtlarının üzerine yaklaşık 15cm. yükseklik oluşturacak şekilde kağıt havlular konuldu.
- Üzerine cam plaka yerleştirilip iki kat saran wrap ile paketleni ve paketin merkez kısmına dengeyi bozmayacak şekilde hafif bir ağırlık (~500 g) yerleştirilerek bir gece boyunca transferin gerçekleştirilmesi sağlandı.
- Ertesi gün membran çıkartıldı ve kurumasına izin verilmeksizin jel ile temas eden yüzeyi UV ışına maruz bırakıldı (Bio-Rad GS Gene Linker) ve RNA'ların membran üzerine sabitlenmesi sağlandı.
- RNA örneklerinin membrana transferinin gerçekleştiğinden emin olmak için membran 50 mM NaAc (pH 5.0) içeren % 0.04'lük (v/v) metilen mavisinde (Fluka) 2 – 3 dakika boyandı, ardından distile su ile yıkandı. Jelden membrana transfer olan RNA bantları mavi renkte gözlemlendi.
- Membran kurumaması için saran wrap ile hava kabarcığı kalmaksızın sarıldı ve hibridizasyon yapılına dek + 4 °C'de saklandı.

Ön Hibridizasyon (von Gromoff vd., 1989)

Membrana transfer edilen RNA'ların proba melezlenmesi sırasında probun özgün olmayan bölgelere bağlanarak yanıltıcı sonuçlar vermesini engellemek amacıyla ön hibridizasyon işlemi yapıldı.

Bu amaçla, ısıya dayanıklı hibridizasyon tüpüne yerleştirilen membranın üzerine 10 ml hibridizasyon tamponu eklendi ve 55°C'de 1 saat inkübe edilerek, ön hibridizasyon yapıldı.

Hibridizasyon (von Gromoff vd., 1989)

Prob olarak kullanılan DNA parçasının RNA dizileri üzerinde tamamlayıcısı olduğu bölgelere bağlanmasını sağlamak amacıyla hibridizasyon yapıldı.

- Ön hibridizasyon bitimine kısa bir süre kala radyoaktif işaretli prob 100°C'de 1 dakika denatüre edilip, renatüre olmaması için buz üzerinde soğutuldu.
- Denatüre edilen prob hibridizasyon tamponuna eklendi ve bir gece boyunca 55°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası membran 50 ml hibridizasyon sonrası yıkama tamponu ile 1 dakika yıkandı ve Geiger sayacı ile membrandaki radyoaktivite ölçüldü.
- Membrandaki radyoaktivite düzeyi 80-100 cpm civarında olduğu zaman yıkama işlemi sonlandırıldı.

3.2.4.7 Otoradyografi (von Gromoff vd., 1989)

Hibridizasyon ve yıkama işlemleri tamamlandıktan sonra radyoaktif işaretli örneklerin belirlenmesi için otoradyografi yapıldı. Membran streç film ile sarıldı. Kaset içine uygun biçimde yerleştirilip, karanlık odada membran üzerine X-ray Omat film (Kodak) yatırıldı. -80°C'de birkaç gece bekletildikten sonra film 3.5 dakika geliştirici ve 15 dakika sabitleyici çözeltiler içerisinde banyo edildi ve son olarak yapışkanlığı gidene dek çeşme suyunda yıkandı.

3.2.5 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun Protein Düzeyinde İncelenmesi

Ağır metal stresinin farklı *Chlamydomonas reinhardtii* suşlarında metalloitiyonin ekspresyonunu indükleyip indüklenmediğini protein düzeyinde incelemek amaçlandı. Metalloitiyonin indüksiyonunun belirlenmesinde doğal jel elektroforezi ve bakır boyama yöntemleri kullanıldı.

3.2.5.1 *Chlamydomonas reinhardtii* Yeşil Alg Kültüründen Protein Ekstraksiyonu

Chlamydomonas reinhardtii yeşil alginde metalloitiyonin ekspresyonunu protein düzeyinde incelemek amacıyla öncelikle hücreden protein izolasyonu yapıldı. Protein ekstraksiyonu için

uygun yöntemi belirlemek amacıyla, eşit miktarda hücre kullanılarak değişik metodlar uygulandı.

İlk denenen yöntemde Memon vd.'nin (1993a) geliştirdikleri yöntemde değişiklikler yapılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. 40 ml ($3 \cdot 10^6$ hücre/ml) alg kültürü 4000 rpm'de +4 °C'de 10 dakika çöktürüldükten sonra üst faz atıldı ve çöktürülen hücrelere sıvı azot eklenmesinin ardından buz üzerinde çözünmesi sağlandı. Bu işlem 3-4 kez tekrarlandı. Hücreler 1 mM benzamidin, 1 mM 1,10-fenantrolin, 0,5 mM PMSF içeren 0,05 M Tris-HCl, pH 7.8 tamponunda süspansiyon edildi. Süspansiyon 2000 rpm'de 15 dakika çöktürüldü. Üst faz alınıp 13000 rpm'de 15 dakika çöktürüldü ve pellet 200 µl 0,05 M Tris-HCl, pH 7.8 tamponunda süspansiyon edildi.

İkinci denenen yöntemde, Memon vd.'nin (1993b) geliştirdikleri yöntemde değişiklikler yapılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Aynı miktarda çöktürülmüş hücre 1 ml soğuk parçalama tamponunda (1 µl 1 M DTT, 12 µl 100 mM benzamidin, 6,8 µl 100 mM PMSF içeren 0,05 M sukroz, 0,01 M Tris-HCl, pH 8.0) süspansiyon edildi. Süspansiyona sıvı azot eklenerek donduruldu ve buz üzerinde çözünerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Daha sonra süspansiyon 1,5 ml 'lik örnek tüpüne aktarıldı ve 2000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika çöktürüldü. Süpernatant 13000 rpm'de +4 °C'de 15 dakika çöktürüldü, pellet 200 µl parçalama tamponunda süspansiyon edildi.

Üçüncü yöntemde yine Memon vd., (1993b)'de değişiklik yapılarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Çöktürülen hücreler 1 ml soğuk ekstraksiyon tamponunda (12 µl benzamidin (100mM stok), 6,8 µl PMSF (100 mM stok) ve 1 µl DTT (1M stok) proteinaz inhibitörlerini içeren) süspansiyon edildi. Ancak diğer yöntemlerden farklı olarak, süspansiyon daha önceden soğutulmuş havan içine aktarıldı ve üzerine sıvı azot eklenerek ezme yoluyla hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücrelerin tamamen parçalanıp parçalanmadıklarına mikroskopta bakıldı ve parçalama tamamlanana dek sıvı azotla ezme işlemine devam edildi. Parçalanmış hücreler temiz bir tüpe aktarılıp, 2000 rpm'de 15 dakika çöktürüldü. Üst sıvı başka bir tüpe aktarıldı ve 13000 rpm'de 15 dakika çöktürüldü. Süpernatant ayrı bir tüpe aktarılıp doğrudan -20°C'ye kaldırılırken, pellet proteinaz inhibitörleri içeren 200 µl ekstraksiyon tamponunda çözüldü ve -20°C'ye kaldırıldı.

Tüm yöntemlerle izole edilen protein örnekleri % 12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldı. Sıvı azotla ezme yöntemi kullanıldığında, eşit miktarda hücreden diğer yöntemlere kıyasla daha fazla protein elde edildiği için, çalışmamızda sıvı azotla ezme yöntemi kullanıldı.

3.2.5.2 Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Çalışmamızda protein konsantrasyonunu belirlemek amacıyla Bicinchoninic Asit (BCA) yöntemi kullanılmıştır.

BCA microassay prosedürüne göre, 50 Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma): 1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ olacak şekilde standart çalışma solüsyonu hazırlandı. 2 mg/ml konsantrasyondaki stok BSA solüsyonu sulandırılarak 50, 100, 150, 200, 250, 350 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ konsantrasyonlarında protein standartları hazırlandı. 10'ar μl 50-350 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ protein içeren BSA standartları, miktarı belirlenecek örnek protein ekstresi ve protein içermeyen kör (blank) örnek (standart çalışma solüsyonu) mikrotitrasyon kabı kuyularına eklendi. Her bir kuyuya 200 μl standart çalışma solüsyonu ilave edildi. Örnekler mikrotitrasyon kabı çalkalayıcısında 30 saniye karıştırıldı ve mikrotitrasyon kabı streç filmle kaplanarak örnekler 37 °C'de yarım saat inkübasyona bırakıldı. Kör örnek spektrofotometrenin sıfırlanması için kullanılarak, mikrotitrasyon kabı okuyucusunda 595 nm'deki absorbans ölçüldü. Bu dalga boyundaki net absorbans ordinata (y eksenine), değişik konsantrasyonlarda hazırlanan standart protein solüsyonlarının konsantrasyon değerleri ise absise (x eksenine) yerleştirildi ve Microcal Origin programı kullanılarak doğrusal bir grafik (kalibrasyon eğrisi) elde edildi. Eğrinin denklemi ve bu denklemin doğruluğu (R^2) grafik üzerinde belirtildi ve konsantrasyonu bilinmeyen örneğin absorbansı denkleme yerleştirilerek konsantrasyon bulundu.

3.2.5.3 Protein Elektroforezi

Çalışmamızda protein örneklerinin analiz edilmesinde Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve Denatüre Edici Olmayan (Doğal) Poliakrilamid Jel Elektroforezi yöntemleri kullanılmıştır.

SDS-PAGE (Denatüre Jel Elektroforezi)

Chlamydomonas reinhardtii alginden protein ekstraksiyonu yöntemini optimize etmek amacıyla özütlenen proteinler SDS-PAGE yöntemiyle bantlarına ayrıştırılmışlardır. SDS-PAGE'de Laemmli (1970) tarafından önerilen yöntem kullanıldı.

SDS-Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

30 ml % 12'lik ayırma jeli (alt) için, 9,9 ml dH_2O içine 12 ml % 30'luk akrilamid karışımı, 7,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 300 μl % 10'luk (w/v) SDS, % 10'luk (w/v) APS ve 12 μl TEMED eklenip yavaşça karıştırıldı ve jel sistemine döküldü. Jelin üzerine 150 μl bütanol eklenerek hava kabarcıklarının yok edilmesi sağlandı. Yaklaşık 45 – 50 dakika polimerizasyonun gerçekleşmesi beklendi. Polimerizasyon gerçekleştikten sonra bütanol

dökülerek, jel dH₂O ile yıkandı. Bu arada yükleme jeli (üst) hazırlandı. 10 ml % 5'lik üst jel için, 6.8 ml dH₂O içine 1.7 ml % 30'luk akrilamid karışımı, 1.25 ml 1M Tris (pH 6.8), 100 µl % 10'luk (w/v) SDS, 100 µl % 10'luk (w/v) APS ve 10 µl TEMED eklendi. Yavaşça karıştırılarak alt jelin üzerine döküldü ve kuyuları oluşturmak için istenilen kalınlıktaki tarak sisteme yerleştirildi (Sambrook, 1989).

Denatüre Edici Olmayan (Doğal) PAGE

Chlamydomonas reinhardtii kültürleri 50 ve 100 µM CuCl₂ ile indükledikten sonra metalotiyonin ekspresyonunu protein düzeyinde incelemek amacıyla, aradığımız proteinin metalotiyonun antikoru ile Western Blotting yöntemi kullanılarak belirlenmesi gerekmektedir. Ancak elimizde belirtilen antikor bulunmadığı için proteinin belirlemek için elektroforez denatüre edici olmayan, doğal koşullar altında denatüre olmayan % 12'lik poliakrilamid jel kullanılarak yapıldı.

Denatüre edici olmayan PAGE proteinlerin doğal formlarında ve stabil kaldıkları bir pH'daki tampon (pH 8.3) içinde yürütülmeleriyle gerçekleştirildi.

Denatüre Edici Olmayan (Doğal) Poliakrilamid Jelin Hazırlanması

Doğal jelin içeriğinde denatüre edici ajanlar bulunmamaktadır. 30 ml % 12'lik ayırma jeli (alt) için, 9.9 ml dH₂O içine 12 ml % 30'luk akrilamid karışımı, 7.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8), % 10'luk (w/v) APS ve 12 µl TEMED eklenip yavaşça karıştırılır ve jel sistemine döküldü. Jelin üzerine 150 µl bütanol eklenerek hava kabarcıklarının yok edilmesi sağlandı. Yaklaşık 45 – 50 dakika polimerizasyonun gerçekleşmesi beklendi. Polimerizasyon gerçekleşikten sonra bütanol dökülerek, jel dH₂O ile yıkandı. Bu arada üst jel hazırlandı. 10 ml % 5'lik yükleme jeli (üst) jel için, 6.8 ml dH₂O içine 1.7 ml % 30'luk akrilamid karışımı, 1.25 ml 1M Tris (pH 6.8), 100 µl % 10'luk (w/v) APS ve 10 µl TEMED eklendi. Yavaşça karıştırılarak alt jelin üzerine döküldü ve kuyuları oluşturmak için istenilen kalınlıktaki tarak sisteme yerleştirildi (Sambrook, 1989).

3.2.5.4 Protein Örneklerinin Jele Yüklmesi

SDS-Poliakrilamid jelde; üst jelin polimerizasyonu devam ederken jele yüklenmek istenen miktardaki protein örneklerine uygun hacimde 1 x Protein örnek tamponu ve 1 µl DTT (1 M) eklendi. Örnekler yükleme yapılmadan önce 95 °C'de 5 dakika kaynatılarak denatüre edildiler. Bu sırada polimerizasyonu tamamlanan jelden tarak çıkarıldı ve jel tank içerisine yerleştirilip, 1 x protein elektroforez tamponu ilave edildi. Kuyular bir şırınga aracılığıyla yıkandılar ve yükleme hazır hale getirildiler. Denatüre edilen örnekler kuyulara yüklendi ve

jelin boyutuna bağılı olarak , küçük jeller için 70 V'ta, büyük jeller içinse 150 V'ta elektroforez edildiler.

Denatüre edici olmayan poliakrilamid jele yüklenecek örneklerin hazırlanmasında kullanılan örnek tamponunda denatüre edici ajanlar bulunmamaktadır ayrıca protein örneklerinin üzerine DTT eklenmez ve 95°C'de denatürasyon yapılmaksızın doğrudan jele yükleme yapıldı.

3.2.5.5 Protein Jellerinin Boyanması

Protein bantları SDS-PAGE ile ayrıştırıldıktan sonra jeller % 50 (v/v) metanol, % 10 (v/v) asetik asit ve % 0.25 (w/v) Coomassie Blue R250 içeren çözelti içerisinde gece boyunca, hafifçe çalkalanarak boyandı. Boyama ile jeldeki bantlar görünür hale geldiler. Proteine bağlanmayan boya jelin % 10 (v/v) metanol ve % 5 (v/v) asetik asit içeren solüsyona aktarılıp jelin arka planı renksiz hale geçinceye kadar birkaç kez solüsyonla muamele edilmesiyle uzaklaştırıldı (Sambrook, 1989).

3.2.5.6 Bakır Boyama

Metallotiyonin ekspresyonunun belirlenmesinde, metallotiyonin proteininin bakır bağlama özelliğinden hareket edildi. Proteinler doğal poliakrilamid jelde ayrıştırıldıktan sonra jel % 0.2'lik (w/v) dietilditiyo-karbamik asit (Sigma) çözeltisi içerisinde bir saat inkübe edildi ve metallotiyonine bağlı bakırla etkileşimin olduğu bölgelerde kahverengi renk oluşumu gözlemlendi (Sayers vd., 1999).

4. BULGULAR

4.1 *Chlamydomonas reinhardtii* Yeşil Alg Kültürü

Katı ortamda bulunan hücrelerden bir öze dolusu alınarak sıvı ortama ekim yapıldı 3.2.1'de belirtilen şekilde hücreler yetiştirildi. Sıvı TAP besiyerinde yetiştirilen bir haftalık *C. reinhardtii* kültürleri Şekil 4.1'de belirtildiği gibidir.

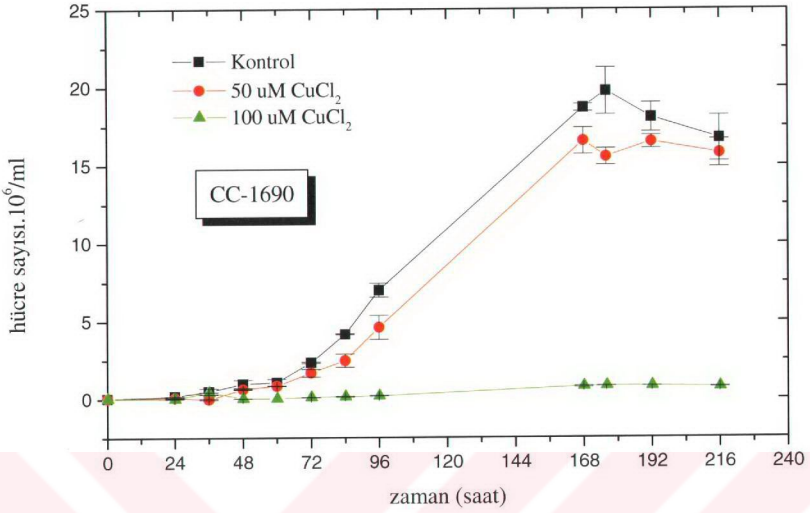


Şekil 4.1 Katı ve sıvı TAP besiyerinde yetiştirilmiş bir haftalık *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alg kültürleri

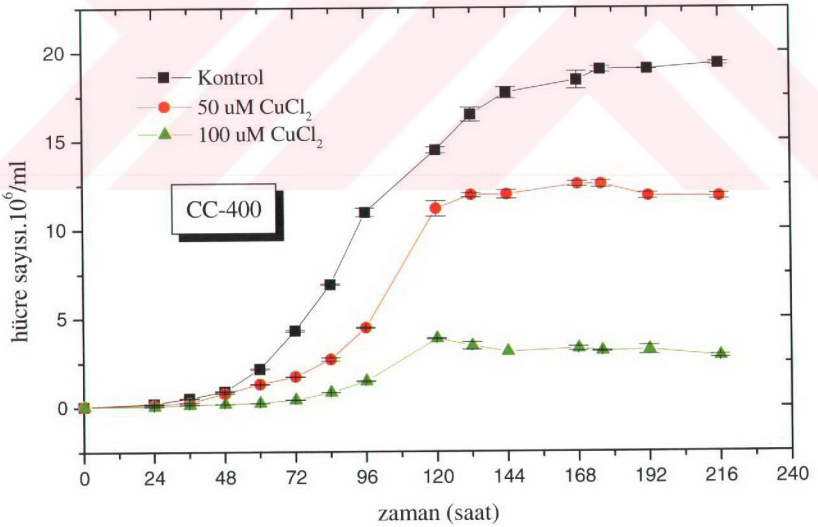
4.2 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarının Farklı Bakır Konsantrasyonlarında Üreme Eğrileri

Ağır metallerin farklı konsantrasyonlarının hücrenin üremesi üzerindeki etkisini gözlemlemek amacıyla CC-1690, CC-400 ve pCB 740 kültürlerine 0, 50 ve 100 μM CuCl_2 uygulandı ve 3.2.2'de belirtilen şekilde suşların bakır varlığında üreme eğrileri elde edildi.

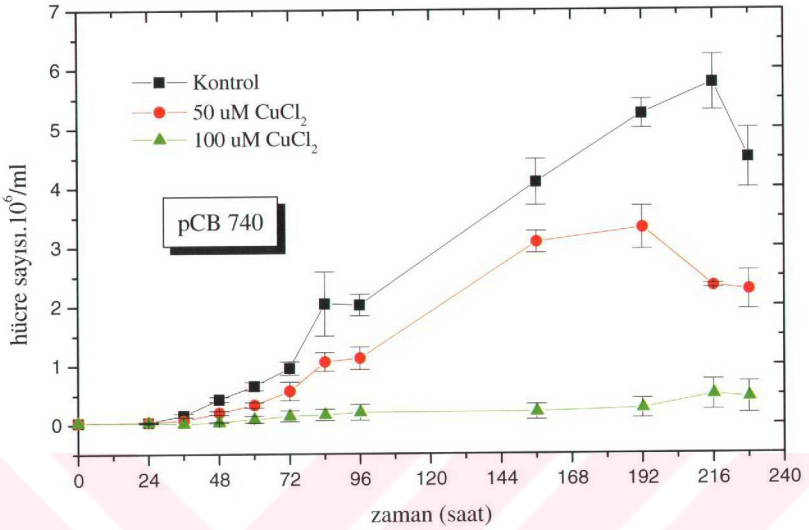
Tek yönlü ANOVA analizi sonucunda 0.05 güven aralığında her bir konsantrasyondaki hücre yoğunluklarının, kontrol hücrelerinden ve birbirlerinden anlamlı düzeyde farklı oldukları ve tüm *C. reinhardtii* suşlarında CuCl_2 konsantrasyonu arttıkça hücre üremesinin azaldığı görüldü (Şekil 4.2 Şekil 4.3 Şekil 4.4).



Şekil 4.2 0,50, 100 μM CuCl_2 varlığında yetiştirilen CC-1690 hücrelerine ait üreme eğrisi



Şekil 4.3 0, 50, 100 μM CuCl_2 varlığında yetiştirilen CC-400 hücrelerine ait üreme eğrisi



Şekil 4.4 0, 50, 100 µM CuCl₂ varlığında yetiştirilen pCB 740 hücrelerine ait üreme eğrisi

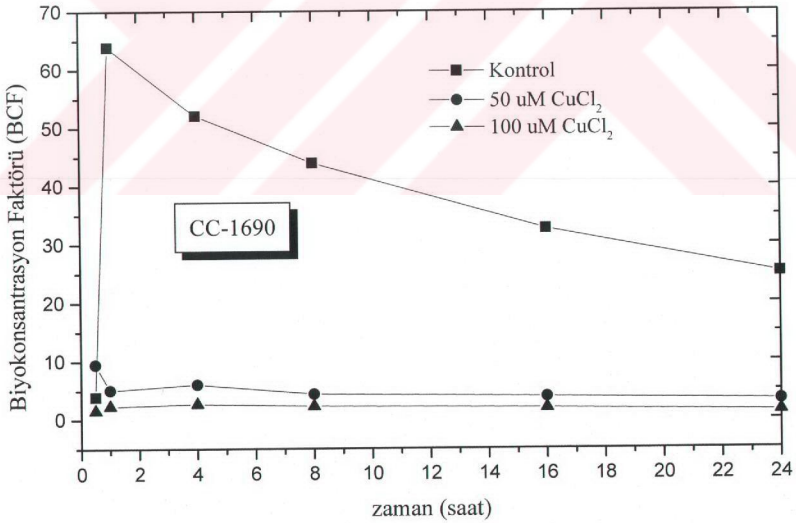
4.3 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Toplama Kapasitesinin Belirlenmesi

C. reinhardtii CC-1690 ve CC-400 suşlarının ağır metal toplama kapasitesi 3.2.3'te belirtildiği gibi bakırın hücredeki biyoakümülyasyon miktarı ve biyokonsantrasyon faktörü hesaplanarak belirlendi (Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Her iki suşta da konsantrasyon arttıkça hücre tarafından biriktirilen bakır miktarında artış görülürken, biyokonsantrasyon faktöründe (BCF) azalma gözlemlendi.

Çizelge 4.1 CC-1690 hücreleri tarafından biriktirilen CuCl_2 miktarı ve CuCl_2 'nin hücrelerdeki Biyokonsantrasyon Faktörü

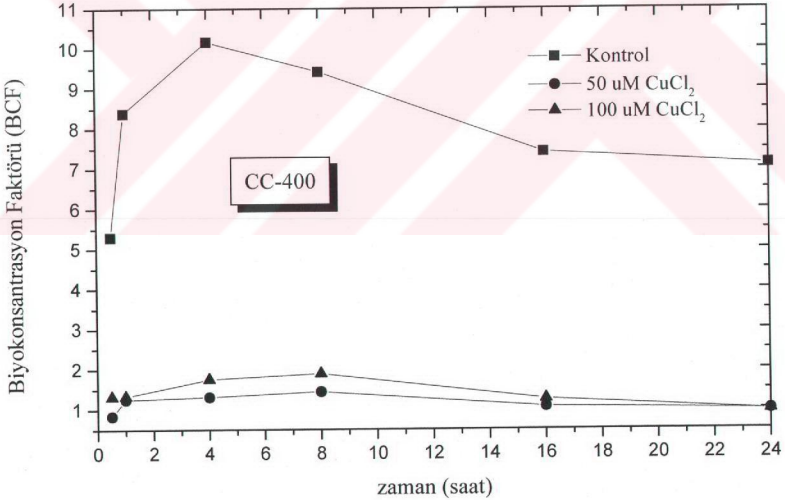
CC-1690	Biyoakümülayasyon miktarı ($\mu\text{gCu}/\text{mg}$ kuru ağırlık)	Biyokonsantrasyon faktörü (BCF)
Ctrl (30.dakika)	1.76	3.9
Ctrl (1.saat)	26.96	63.88
Ctrl (4.saat)	21.10	52.10
Ctrl (8.saat)	17.31	43.93
Ctrl (16.saat)	11.87	32.61
Ctrl (24.saat)	9.86	25.10
50 μM CuCl_2 (30.dakika)	30.66	9.45
50 μM CuCl_2 (1.saat)	19.50	5.05
50 μM CuCl_2 (4.saat)	20.45	6.02
50 μM CuCl_2 (8.saat)	17.15	4.35
50 μM CuCl_2 (16.saat)	14.83	3.86
50 μM CuCl_2 (24.saat)	13.58	3.29
100 μM CuCl_2 (30.dakika)	11.41	1.53
100 μM CuCl_2 (1.saat)	13.84	2.30
100 μM CuCl_2 (4.saat)	18.35	2.67
100 μM CuCl_2 (8.saat)	17.73	2.26
100 μM CuCl_2 (16.saat)	12.97	1.94
100 μM CuCl_2 (24.saat)	12.58	1.41



Şekil 4.5 CC-1690 hücrelerinde CuCl_2 biyokonsantrasyon faktöründeki değişim

Çizelge 4.2 CC-400 hücreleri tarafından biriktirilen bakır miktarı ve biyokonsantrasyon faktörü

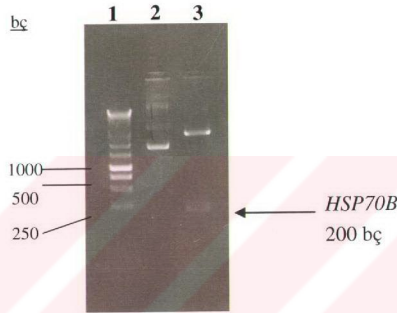
CC-400	Biyoakümülayasyon miktarı ($\mu\text{g Cu}/\text{mg}$ kuru ağırlık)	Biyokonsantrasyon faktörü (BCF)
Ctrl (30.dakika)	2.96	5.30
Ctrl (1.saat)	5.00	8.39
Ctrl (4.saat)	5.88	10.17
Ctrl (8.saat)	5.82	9.42
Ctrl (16.saat)	4.67	7.41
Ctrl (24.saat)	4.26	7.10
50 μM CuCl ₂ (30.dakika)	4.84	0.84
50 μM CuCl ₂ (1.saat)	5.49	1.25
50 μM CuCl ₂ (4.saat)	7.77	1.31
50 μM CuCl ₂ (8.saat)	7.58	1.44
50 μM CuCl ₂ (16.saat)	4.82	1.06
50 μM CuCl ₂ (24.saat)	5.07	0.98
100 μM CuCl ₂ (30.dakika)	14.49	1.32
100 μM CuCl ₂ (1.saat)	15.79	1.33
100 μM CuCl ₂ (4.saat)	18.43	1.75
100 μM CuCl ₂ (8.saat)	20.84	1.89
100 μM CuCl ₂ (16.saat)	13.13	1.25
100 μM CuCl ₂ (24.saat)	11.30	0.97



Şekil 4.6 CC-400 hücrelerinde CuCl₂ biyokonsantrasyon faktöründeki değişim

4.4 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Varlığında *HSP70* Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi

HSP70B geninin metal varlığında eksprese olup olmadığının anlaşılmasında kullanılacak olan probun sentezlenmesinde kalıp olarak kullanılan *HSP70B* fragmenti, pUC18 plazmidinin 3.2.4.1'de belirtilen şekilde izole edilmesi ve kesilmesiyle elde edildi. Kesim sonucu jel elektroforezi ile analiz edildi. *HSP70B* fragmentinin boyutunun 200 bp olduğu gösterildi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 pCB 413 suşuna ait *HSP70B* fragmenti; 1) DNA standartları (1 kb DNA ladder); 2) pUC18 plazmidinin kesilmemiş formu; 3) pUC18 plazmidinin *EcoRI* ve *SalI* enzimleri ile kesim sonuçları (*HSP70B* fragmenti)

HSP70 ekspresyonunu RNA düzeyinde incelemek için pCB 740 ve pCB 873 suşlarına sırasıyla CdCl_2 (0, 5, 20, 100 μM), CuCl_2 (0, 5, 50, 100 μM) ve $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (0, 0.5, 1, 2, 5 μM) metalleri ve ısı şoku uygulandı.

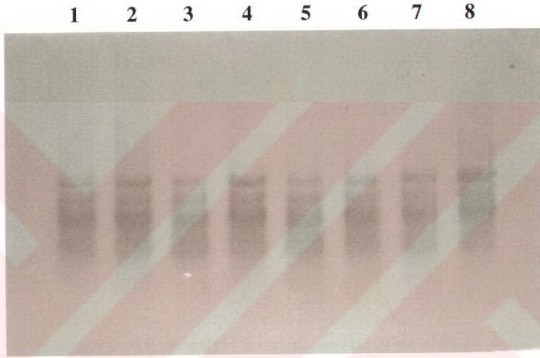
CuCl_2 ve ısı şoku uygulanan pCB 740 suşundan elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı belirlendi (Çizelge 4.3). RNA örnekleri membrana transfer edildi (Şekil 4.8). CuCl_2 ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş RNA örneklerine ait otoradyogramda, hem metal hem de ısı şoku stresi uygulanmış örneklerin *HSP70B* probu ile etkileştikleri yerlerde karartılar görülürken, sadece metal uygulanmış örneklerde ve herhangi bir metal stresinin verilmediği kontrol örneklerinde *HSP70B* geniyle etkileşimi belirten bir karartı görülmedi (Şekil 4.9).

Buradan *HSP70B* geni ekspresyonunun yalnızca ısı şokuyla indüklendiği ve uyguladığımız bakır konsantrasyonlarında metalle indüklenmediği sonucuna varıldı.

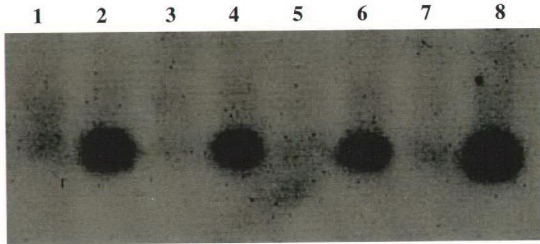
CdCl_2 ve $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ile indüklenmiş RNA'lara ait otoradyogramlarda ise herhangi bir sonuç gözlenmedi.

Çizelge 4.3 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A_{260}	A_{260}/A_{280}	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Jele yüklenen miktar (μl) (15 μg)
Kontrol	0.318	1,99	12.7010	1.181
HS	0.355	2,02	14.2194	1.054
5 μM CuCl_2	0.390	1,99	15.5854	0.962
5 μM CuCl_2 + HS	0.478	1,96	19.1019	0.785
50 μM CuCl_2	0.413	2,01	16.5002	0.909
50 μM CuCl_2 + HS	0.387	2,03	15.4947	0.968
100 μM CuCl_2	0.431	2,01	17.2487	0.870
100 μM CuCl_2 + HS	0.385	2,03	15.3883	0.975



Şekil 4.8 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerine ait RNA örnekleri; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku

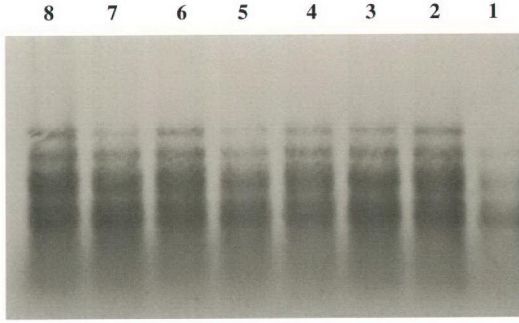


Şekil 4.9 *HSP70B* DNA'sının, pCB 740 *HSP70B* mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku

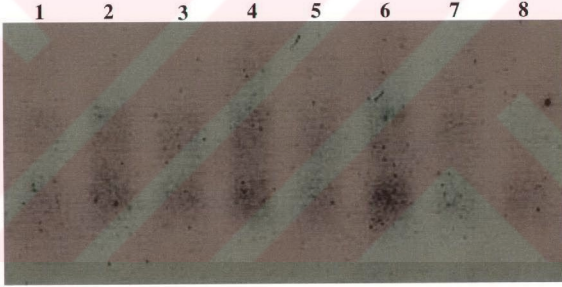
CuCl₂ ve ısı şoku uygulanan pCB 873 suşundan elde edilen RNA'nın miktarı belirlendi (Çizelge 4.4). RNA örnekleri proba hibridize edilmek üzere membrana transfer edildi (Şekil 4.10). Proba hibridizasyon sonucunda, pCB 740 suşundan farklı olarak hem metal hem de ısı şoku stresi uygulanan örneklerde, *HSP70B* probu ile herhangi bir etkileşim gözlenmedi yani *HSP70* ekspresyonunun ısı şoku elementleri bakımından mutant olan suшта ne ısı ne de metal ile indüklenmediği anlaşıldı (Şekil 4.11).

Çizelge 4.4 0, 5, 50, 100 µM CuCl₂ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konsantrasyon (µg/µl)	Jele yüklenen miktar (µl) (15µg)
Kontrol	0.312	2,05	12.4789	1.202
HS	0.146	1,99	5.8360	2.57
5µM CuCl ₂	0.289	2,01	11.5530	1.298
5µM CuCl ₂ + HS	0.266	2,05	10.6532	1.4
50 µM CuCl ₂	0.219	2,04	8.7569	1.712
50µM CuCl ₂ + HS	0.205	2,06	8.2156	1.826
100µM CuCl ₂	0.305	2,26	12.1882	1.23
100µM CuCl ₂ +HS	0.284	2,25	11.3466	1.322



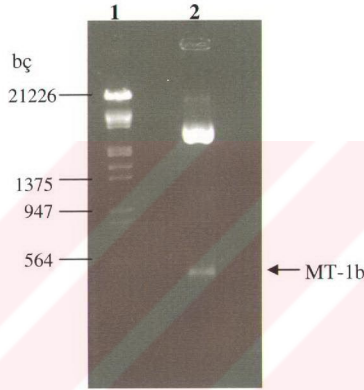
Şekil 4.10 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerine ait RNA örnekleri; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku ; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku ; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku



Şekil 4.11 pCB 873 *HSP70B* mRNA'sının *HSP70B* DNA'sı tarafından belirlenmediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku ; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku ; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku

4.5 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun RNA Düzeyinde İncelenmesi

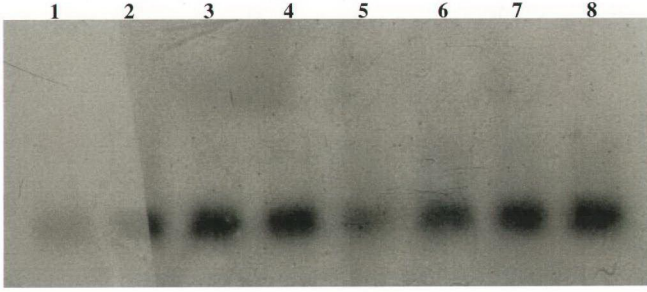
Metalloitiyonin geninin metal varlığında eksprese olup olmadığının anlaşılmasında kullanılacak olan probun sentezlenmesinde kullanılan kalıp MT-1b fragmenti, pBSK plazmidinin 3.2.4.1'de belirtilen şekilde izole edilmesi ve kesilmesiyle elde edildi. Kesim sonucu jel elektroforezi ile analiz edildi. MT-1b fragmentinin boyutunun 467 bp olduğu gösterildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 *Vicia faba* MT-1b fragmenti; 1) DNA standartları (1 kb DNA ladder); 3) pBSK plazmidinin *EcoRI* enzimi ile kesim sonuçları, pBSK plazmidinde bulunan MT-1b cDNA'sı

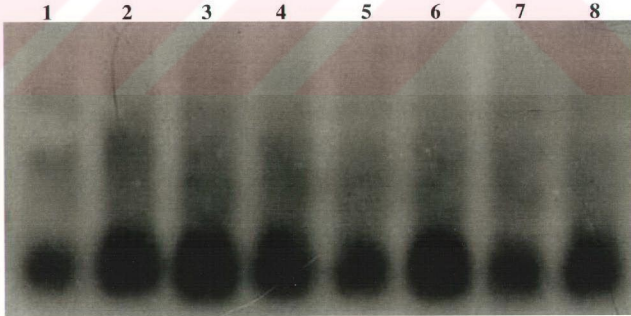
Daha önce *HSP70B* probu ile hibridize edilen bazı membranlar (CuCl_2 , CdCl_2 , $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş pCB 740, pCB 873 RNA'larına ait membranlar) bağlanmış olan probu uzaklaştırmak için yıkandıktan sonra MT-1b probuyla yeniden hibridize edildi.

CuCl_2 ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş pCB 740 RNA örneklerine ait membran (Şekil 4.7) α - ^{32}P -dCTP işaretli MT-1b probu ile hibridize edildi. Otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde karartılar görüldü. Bunun sonucunda bakırın pCB 740 suşunda metalloitiyonin ekspresyonunu indüklediği anlaşıldı (Şekil 4.13).



Şekil 4.13 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku ile indüklenen pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku

CuCl_2 ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş pCB 873 RNA örneklerine ait membran (Şekil 4.10) α - ^{32}P -dCTP işaretli MT-1b probu ile hibridize edildi ve otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde bakırın pCB 873 suşunda metallothiyonin ekspresyonunu indüklediğini belirten karartılar görüldü (Şekil 4.14). Ayrıca ısı şokunun metallothiyonin ekspresyonu düzeyinde pozitif yönde etkisinin olduğu gözlemlendi.

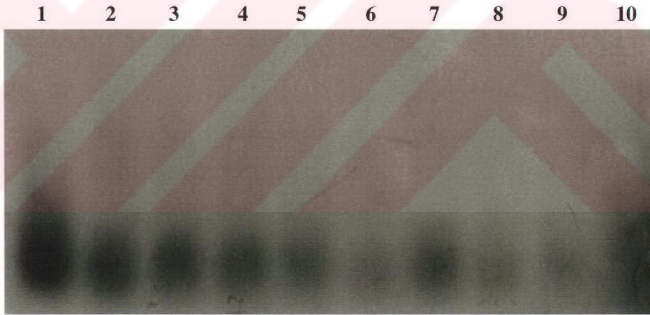


Şekil 4.14 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 5, 50, 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku ile indüklenen pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CuCl_2 ; 4) 5 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 5) 50 μM CuCl_2 ; 6) 50 μM CuCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CuCl_2 ; 8) 100 μM CuCl_2 ve ısı şoku

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku stresi uygulanmış pCB 740 suşundan elde edilen RNA'nın miktar ve saflığı belirlendi (Çizelge 4.5). MT-1b probu ile hibridizasyon yapıldı. Otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde karartılar görüldü. Kurşunun pCB 740 suşunda metallotiyonin ekspresyonunu indüklediği anlaşıldı (Şekil 4.15).

Çizelge 4.5 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Jele yüklenen miktar (μl) (15 μg)
Kontrol	0.515	1,95	20.5935	0.728
HS	0.352	2,23	14.0979	1.064
0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.328	2,2	13.1203	1.143
0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.263	2,14	10.5358	1.424
1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.387	2,17	15.4820	0.969
1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.303	2,17	12.1244	1.237
2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.292	2,19	11.6732	1.285
2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.328	2,15	13.1285	1.143
5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.272	2,11	10.8757	1.379
5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.320	2,12	12.8096	1.171

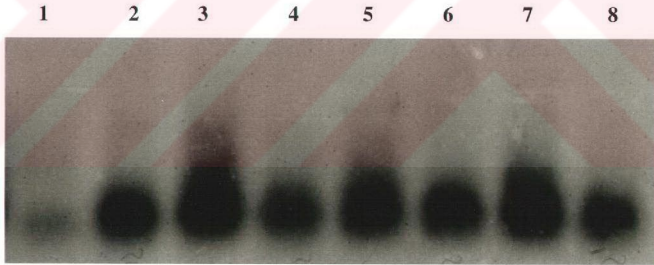


Şekil 4.15 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1)Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2)Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 4) 0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 5) 1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 6) 1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 7) 2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 8) 2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 9) 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 10) 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku stresi uygulanmış pCB 873 suşundan elde edilen RNA'nın miktar ve saflığı belirlendi (Çizelge 4.6). MT-1b probu ile hibridizasyon yapıldı. Otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde kurşunun pCB 873 suşunda metalleriyonin ekspresyonunu indüklediğini belirten karartılar görüldü (Şekil 4.16). Ayrıca ısı şokunun metalleriyonin ekspresyonu indüksiyonunu negatif yönde etkilediği gözlemlendi.

Çizelge 4.6 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Jele yüklenen miktar (μl) (15 μg)
0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.332	1,78	13.2676	1.13
0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.466	2,1	18.6545	0.804
1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.361	1,78	14.4540	1.038
1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.275	1,97	1.9704	1.364
2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.349	1,76	13.9632	1.074
2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.360	1,84	14.3902	1.042
5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	0.415	1,68	16.5874	0.904
5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ + HS	0.219	1,98	8.7646	1.711

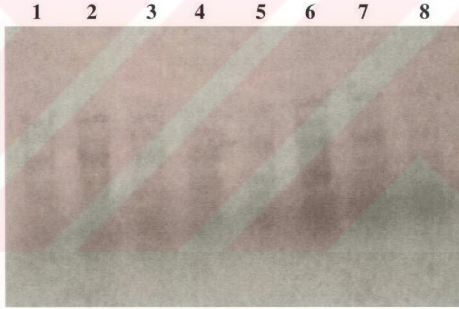


Şekil 4.16 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 0.5, 1, 2, 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) 0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 2) 0.5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 3) 1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 4) 1 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 5) 2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 6) 2 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku ; 7) 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; 8) 5 μM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ve ısı şoku

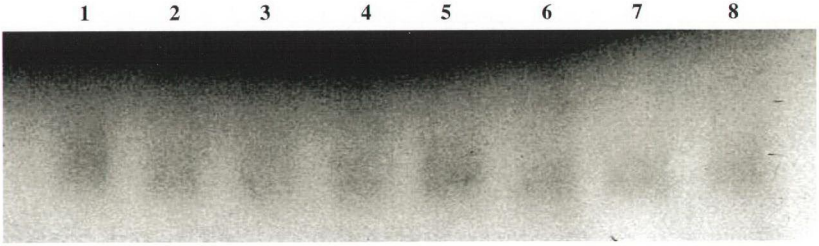
CdCl₂ ve ısı şoku stresi uygulanmış pCB 740 suşundan elde edilen RNA örneklerinin miktarı belirlendi (Çizelge 4.7). RNA örneklerine ait membran (Şekil 4.17) α -³²P-dCTP işaretli MT-1b probu ile hibridize edildi. Otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde kadmiyumun pCB 740 suşunda metallothiyonin ekspresyonunu indüklediğini belirten karartılar görüldü (Şekil 4.18).

Çizelge 4.7 0, 5, 20, 100 μ M CdCl₂ ve ısı şokuna maruz bırakılmış pCB 740 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A ₂₆₀	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	Konsantrasyon (μ g/ μ l)	Jele yüklenen miktar (μ l) (15 μ g)
Kontrol	0.352	1,79	14.0852	1.065
HS	0.336	1,94	13.4535	1.115
5 μ M CdCl ₂	0.319	1,89	12.7415	1.177
5 μ M CdCl ₂ + HS	0.221	1,93	8.8277	1.699
20 μ M CdCl ₂	0.289	1,97	11.5418	1.3
20 μ M CdCl ₂ + HS	0.330	1,72	13.2071	1.136
100 μ M CdCl ₂	0.222	1,89	8.8958	1.686
100 μ M CdCl ₂ + HS	0.213	1,97	8.5314	1.758



Şekil 4.17 0, 5, 20, 100 μ M CdCl₂ ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 740 hücrelerine ait RNA örnekleri; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μ M CdCl₂; 4) 5 μ M CdCl₂ ve ısı şoku; 5) 20 μ M CdCl₂; 6) 20 μ M CdCl₂ ve ısı şoku; 7) 100 μ M CdCl₂; 8) 100 μ M CdCl₂ ve ısı şoku

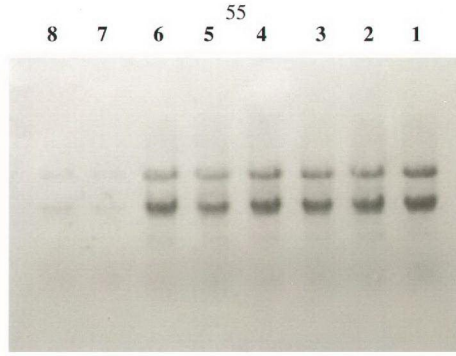


Şekil 4.18 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 740 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CdCl_2 ; 4) 5 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 5) 20 μM CdCl_2 ; 6) 20 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CdCl_2 ; 8) 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku

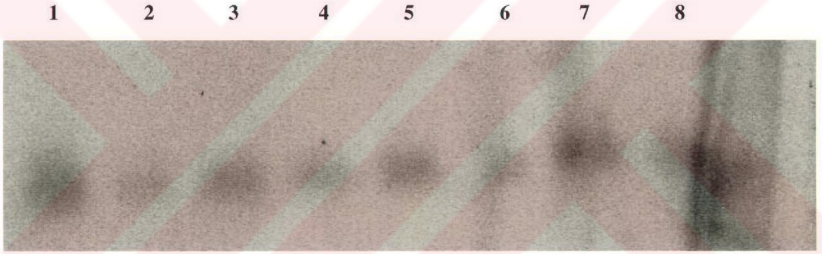
CdCl_2 ve ısı şoku stresi uygulanmış pCB 873 suşundan elde edilen RNA örneklerinin miktarı belirlendi (Çizelge 4.8). RNA örneklerine ait membran (Şekil 4.19) $\alpha\text{-}^{32}\text{P}\text{-dCTP}$ işaretli MT-1b probu ile hibridize edildi ve otoradyogramda tüm örneklerin MT-1b probu ile etkileştikleri yerlerde kadmiyumun pCB 873 suşunda metalloiyonin ekspresyonunu indüklediğini gösteren karartılar görüldü (Şekil 4.20).

Çizelge 4.8 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılmış pCB 873 hücrelerinden elde edilen RNA miktarları

	A_{260}	A_{260}/A_{280}	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Jele yüklenen miktar (μl)(10 μg) (1/10 dilüsyon)
Kontrol	0.249	1,83	9.9484	1(dilüsyonsuz)
HS	0.390	1,88	15.6034	6.4
5 μM CdCl_2	0.504	1,8	20.1740	4.957
5 μM CdCl_2 + HS	0.257	1,7	10.2833	0.972 (dilüsyonsuz)
20 μM CdCl_2	0.441	1,74	17.6455	5.667
20 μM CdCl_2 + HS	0.241	1,65	9.6313	1.04 (dilüsyonsuz)
100 μM CdCl_2	0.302	1,64	13.0746	0.765 (dilüsyonsuz)
100 μM CdCl_2 + HS	0.279	1,57	11.1529	0.897 (dilüsyonsuz)



Şekil 4.19 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şokuna maruz bırakılan pCB 873 hücrelerine ait RNA örnekleri; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CdCl_2 ; 4) 5 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 5) 20 μM CdCl_2 ; 6) 20 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CdCl_2 ; 8) 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku

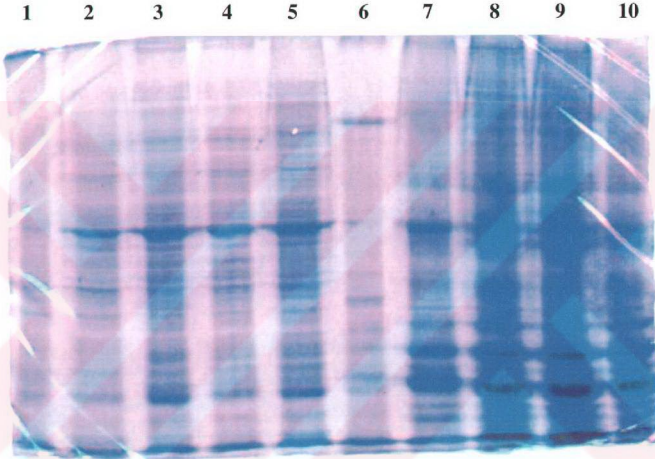


Şekil 4.20 *Vicia faba* MT-1b DNA'sının 0, 5, 20, 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku ile indüklenmiş pCB 873 MT-1b mRNA'sını belirlediğini gösteren otoradyogram; 1) Herhangi bir stres uygulanmamış kontrol örneği; 2) Yalnızca ısı şoku verilmiş örnek; 3) 5 μM CdCl_2 ; 4) 5 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 5) 20 μM CdCl_2 ; 6) 20 μM CdCl_2 ve ısı şoku; 7) 100 μM CdCl_2 ; 8) 100 μM CdCl_2 ve ısı şoku

4.6 *Chlamydomonas reinhardtii* Suşlarında Ağır Metal Varlığında Metalloitiyonin Ekspresyonunun Protein Düzeyinde İncelenmesi

4.6.1 Protein Ekstraksiyon Yönteminin Optimizasyonu

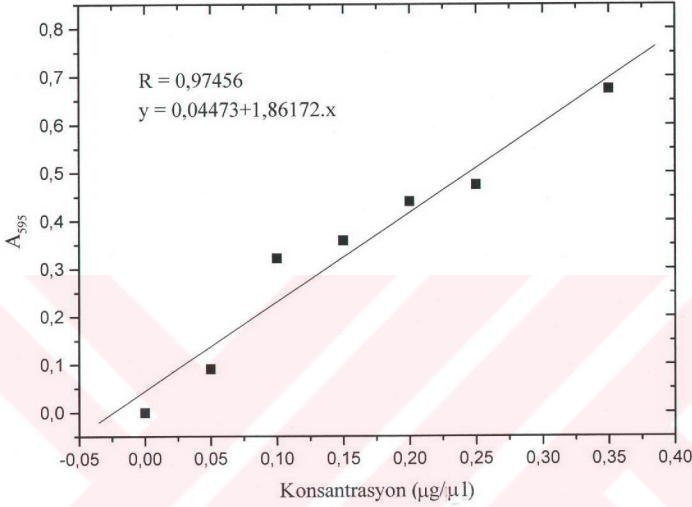
Chlamydomonas reinhardtii alginden protein izolasyonu için uygun ekstraksiyon yöntemini belirlemek amacıyla 3.2.5.1'de belirtilen şekilde elde edilen proteinler % 12'lik SDS-PAGE'de ayrıştırıldı (Şekil 4.21). Aynı miktarda hücreden farklı yöntemlerle izolasyon gerçekleştirildiğinde, Yöntem 3 ile daha fazla protein elde edildiği görüldü.



Şekil 4.21 *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alginden farklı yöntemlerle özütlenen proteinlerin SDS-PAGE analizi; 1) CC-400, Y1, spn; 2) CC-400, Y2, spn; 3) CC-2677, Y3, spn ; 4) CC-1690, Y3, spn; 5) CC-400, Y3, spn; 6) CC-400, Y1, p; 7) CC-400, Y2, p 8) CC-2677, Y3, p; 9) CC-1690, Y3, p; 10) CC-400, Y3, p. (Y1: Yöntem 1, Y2: Yöntem 2, Y3: Yöntem 3, spn: süpernatant, p: pellet)

4.6.2 Protein Miktarının Belirlenmesi

Chlamydomonas reinhardtii hücrelerinden elde edilen total proteinlerin miktarı 3.2.5.2'de açıklanan yöntemle belirlendi.



Şekil 4.22 BSA standartlarına göre çizilen kalibrasyon eğrisi (denklemini ve doğruluğu (R^2) belirtilmiştir)

Çizelge 4.9 Kalibrasyon eğrisinin belirlenmesinde kullanılan standart proteinlerin absorpsiyon ve konsantrasyonları

Standart protein (BSA)	A_{595}	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Standart protein-1	0.091	0.05
Standart protein-2	0.322	0.10
Standart protein-3	0.359	0.15
Standart protein-4	0.44	0.20
Standart protein-5	0.475	0.25
Standart protein-6	0.674	0.35

Çizelge 4.10 CC-400 süpernatant fraksiyonundan elde edilen proteinlerin BCA yöntemine göre belirlenen 595 nm'deki absorbsan değerleri ve konsantrasyonları

CC-400	A ₅₉₅	Konsantrasyon (µg/µl) (1/20 dilüsyon)
Kontrol (4. saat)	0.312	0.144
50 µM CuCl ₂ (4. saat)	0.238	0.104
50 µM CuCl ₂ (8. saat)	0.413	0.198
50 µM CuCl ₂ (16. saat)	0.538	0.267
50 µM CuCl ₂ (24. saat)	0.559	0.276
100 µM CuCl ₂ (4. saat)	0.283	0.128
100 µM CuCl ₂ (8. saat)	0.468	0.226
100 µM CuCl ₂ (16. saat)	0.265	0.120
100 µM CuCl ₂ (24. saat)	0.582	0.286

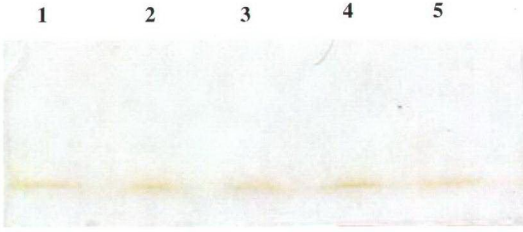
Çizelge 4.11 CC-1690 süpernatant fraksiyonundan elde edilen proteinlerin BCA yöntemine göre belirlenen 595 nm'deki absorbsan değerleri ve konsantrasyonları

CC-1690	A ₅₉₅	Konsantrasyon (µg/µl) (1/20 dilüsyon)
Kontrol (4. saat)	0,517	0.253
50 µM CuCl ₂ (4. saat)	0,492	0.242
50 µM CuCl ₂ (8. saat)	0,652	0.336
50 µM CuCl ₂ (16. saat)	0,593	0.295
50 µM CuCl ₂ (24. saat)	0,595	0.295
100 µM CuCl ₂ (4. saat)	0,611	0.303
100 µM CuCl ₂ (8. saat)	0,291	0.133
100 µM CuCl ₂ (16. saat)	0,599	0.296
100 µM CuCl ₂ (24. saat)	0,605	0.300

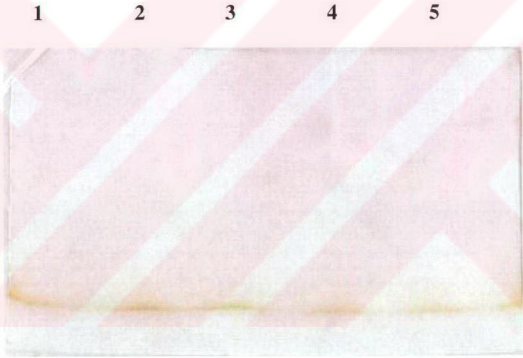
4.6.3 Metallotiyonin Protein Ekspresyonunun Doğal PAGE ile İncelenmesi

50 ve 100 µM CuCl₂ uygulanan CC-1690 suşundan farklı zaman aralıklarında izole edilen protein örnekleri (süpernatant) doğal jel elektroforezi ile ayrıştırıldı ve jel bakır boyama yöntemiyle boyandı (Şekil 4.23, Şekil 4.24). Protein ekspresyonunu belirten bantlar arasında farklı zaman aralıklarında herhangi bir fark görülmedi.

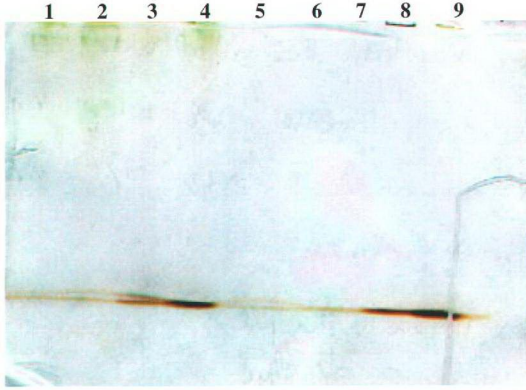
Bu nedenle hücrelere 24 saat boyunca 500 ve 1000 µM CuCl₂ stresi uygulandı ve protein izolasyonundan sonra farklı konsantrasyonlara ait protein örnekleri doğal jelde ayrıştırıldıktan sonra karşılaştırıldı. 100 µM'a kadar metallotiyonin ekspresyonu düzeyinde fark görülmezken, bu konsantrasyondan sonra artan konsantrasyonlarda (500 ve 1000 µM) daha belirgin ve kalınlıkları birbirinden farklı bantlar görüldü ve metallotiyonin ekspresyonu düzeyinin arttığı anlaşıldı (Şekil 4.25).



Şekil 4.23 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-1690 metalotiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor); 1) Kontrol; 2) 4. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 3) 8. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 4) 16. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 5) 24. saat, çöktürme sonrası üst sıvı.

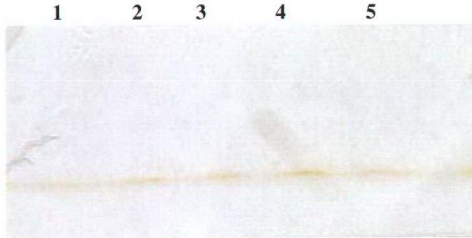


Şekil 4.24 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 100 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-1690 metalotiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor); 1) Kontrol; 2) 4. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 3) 8. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 4) 16. saat, çöktürme sonrası üst sıvı; 5) 24. saat, çöktürme sonrası üst sıvı.

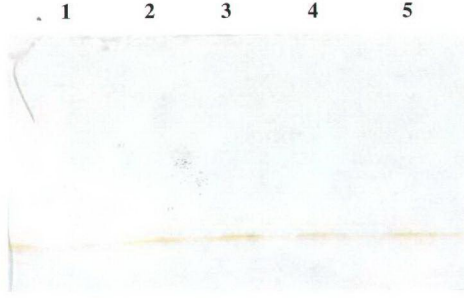


Şekil 4.25 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50, 100, 500, 1000 μM CuCl_2 ile 24 saat indüklenmiş CC-1690 metallotiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor); 1) 50 μM CuCl_2 , p; 2) 100 μM CuCl_2 , p; 3) 500 μM CuCl_2 , p; 4) 1000 μM CuCl_2 pellet); 5) 50 μM CuCl_2 spn; 6) Boş; 7) 100 μM CuCl_2 spn; 8) 500 μM CuCl_2 spn; 9) 1000 μM CuCl_2 spn.; (p: 2000 rpm'de çöktürme sonrası pellet, spn: süpernatant).

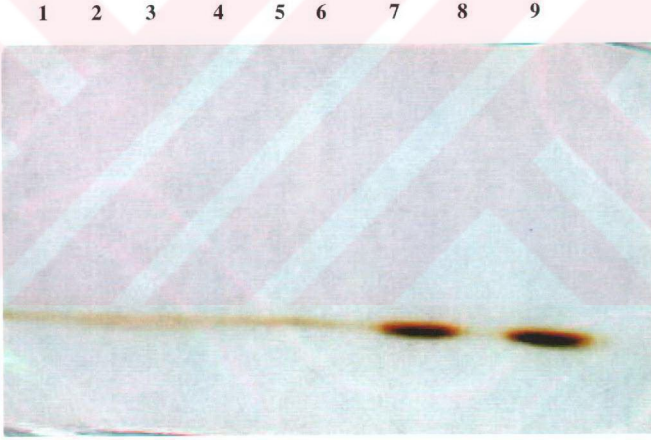
CC-400 suşundan da 50 ve 100 μM CuCl_2 varlığında farklı saatlerde bantlar arasında fark görülemedi (Şekil 4.26, Şekil 4.27). 500 ve 1000 μM CuCl_2 uygulandıktan sonra tüm konsantrasyonlara ait protein örnekleri doğal jelde analiz edildi. 100 μM 'a kadar bantlar arasında herhangi bir kalınlık farkı görülmezken, 500 ve 1000 μM 'da daha belirgin ve kalınlıkları birbirinden farklı bantlar gözlemlendi (Şekil 4.28).



Şekil 4.26 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallotiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor); 1) Kontrol; 2) 4. saat; 3) 8. saat; 4) 16. saat; 5) 24. saat.



Şekil 4.27 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 100 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallothiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor:); 1) Kontrol; 2) 4. saat; 3) 8. saat; 4) 16. saat; 5) 24. saat.



Şekil 4.28 % 0.2'lik (w/v) Dietilditiyo-karbamik asit ile boyanan 50, 100, 500, 1000 μM CuCl_2 ile indüklenmiş CC-400 metallothiyonin proteinleri (Her kuyu 20 μg protein içeriyor:); 1) Kontrol, 24.saat; 2) 50 μM CuCl_2 , 16. saat; 3) 100 μM CuCl_2 , 16. saat; 4) 50 μM CuCl_2 , 24. saat; 5) 100 μM CuCl_2 , 24. saat; 6) Boş; 7) 500 μM CuCl_2 , 24. saat; 8) Boş; 9) 1000 μM CuCl_2 , 24. saat.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

İçinde bulunduğumuz çevrenin ağır metallerle kirliliğinin biyolojik sistemler aracılığıyla temizlenmesi giderek yaygınlaşan bir teknoloji olup, diğer teknolojilere göre sağladığı pek çok avantaj ile tercih edilmektedir. Bu kapsamda mikroalglerin ağır metallerle kirlenmiş çevre mücadelesinde kullanılmaları ve bu koşullar altında yaşamalarını sağlayan mekanizmalarla ilgili birçok çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ağır metalin hücrelerin çoğalması üzerindeki etkisi ve hücrelerin ağır metal biriktirme kapasitesi belirlendi. Ayrıca bir çok organizmada ağır metal stresinin detoksifikasyonunda rol aynadıkları bilinen ısı şoku proteini (HSP70) ve metallothiyonin ekspresyonlarının *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ağır metal varlığında indüklenip indüklenmediği ilk kez incelendi.

Ağır metallerin farklı konsantrasyonlarının hücrenin çoğalması üzerindeki etkisi incelendiğinde 50 μM CuCl_2 'de hücre üremesinin kontrol hücrelerinden daha az olduğu, 100 μM CuCl_2 'de de hücre üremesinin anlamlı düzeyde indirildiği gözlemlendi. Böylece canlılarda gerçekleşen biyokimyasal reaksiyonlarda eser element olarak önemi olan bakırın artan konsantrasyonlarda hücre üremesinde indirgenmeye yol açtığı anlaşıldı. Prasad vd., (1998) tarafından *Chlamydomonas reinhardtii*'nin yabancı tip ve duvarsız mutant suşları ile yapılan çalışmada da artan metal konsantrasyonlarının hücrelerin üreme oranında indirgenmeye yol açtığı görülmektedir. Benzer şekilde *Chlamydomonas reinhardtii*'de üremenin artan civa konsantrasyonları ile kontrol kültüründen anlamlı derecede fark gösterdiği ve giderek azaldığı bildirilmiştir (Weiss-Magasic vd., 1997). Cai vd., (1995), *Chlamydomonas reinhardtii* hücrelerinin üremesinin, birçok yüksek bitkinin üremesini inhibe eden Cd konsantrasyonlarında ($\leq 50 \mu\text{M}$) etkilenmezken, 50 μM Cd varlığında indirgenmeye başladığını ve $\geq 50 \mu\text{M}$ Cd varlığında ise TAP ortamında gözle görünür çökelmeler olduğunu bildirmektedir. Garvey vd., (1991) ise *Chlamydomonas reinhardtii* alginde 64 g/l Cu konsantrasyonuna kadar popülasyonun çoğalması üzerinde herhangi bir etki görülmezken, bu konsantrasyondan sonra hücre üremesinin azalmaya başladığını bildirmiştir. *Chlamydomonas* ile aynı familyada bulunan *Scenedesmus acutus* ve *Chlorella vulgaris* mikroalg kültürlerinde de artan Cd ve Zn konsantrasyonlarında üremenin azaldığı gözlenmiştir (Abd-El Monem vd., 1998).

Mikroalglerde ağır metal alımının öncelikle metabolizmadan bağımsız bir şekilde pasif olarak hücre duvarına tutunma (biyosorbsiyon), daha sonrada metabolizmaya bağlı biyoakümülyasyon

mekanizmaları ile gerçekleştiği bilinmektedir. Bu çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ağır metal detoksifikasyonunun metabolizmaya bağlı bir yolla gerçekleşip gerçekleşmediğini gözlemlemek ve hücrenin ağır metal toplama kapasitesini belirlemek amacıyla, öncelikle hem yabani tip hem de duvarsız mutant suşlarında hücreler tarafından alıkonan (biriktirilen) bakır miktarı saptandı. Düşük konsantrasyonlarda ($<50 \mu\text{M}$) yabani tip hücrelerde ortalama $18 \mu\text{g}$ bakır biriktirilirken, mutant hücrelerde $5 \mu\text{g}$ bakır birikimi gözlemlendi. Ancak artan konsantrasyonlarda ($100 \mu\text{M}$), her iki suşun biriktirdiği miktar arasında çok fazla fark görülmedi. Bu sonuca göre, düşük konsantrasyonlarda hücre duvarının bir bariyer görevi üstlendiği, ancak artan konsantrasyonlarda doymuş hücre duvarının daha fazla metali bağlayamadığı ve hücreyi koruyucu rol üstlenemediği, dolayısıyla yabani tip ve duvarsız mutant hücrelerdeki ağır metal dayanıklılığında fark olmadığı söylenebilir. Benzer sonuçlar yabani tip ve duvarsız mutant suşları ile yapılmış bir başka çalışmada da elde edilmiş ve metale karşı toleransın metabolizmaya bağlı yolla gerçekleştiği bildirilmiştir (Macfie ve Welbourn, 2000).

Daha sonra, hücre tarafından alıkonulan bakır miktarının ortamdaki bakır konsantrasyonu ile karşılaştırılmasını sağlayan bir parametre olan BCF değeri hesaplandı ve her iki suşta da artan bakır konsantrasyonunda BCF değerinin azaldığı gözlemlendi. Bakırın absorplanması ile organik ligandların sentezinin stimule edildiği ve bu nedenle BCF değerinin azaldığı ve ağır metal detoksifikasyonunun metabolizmaya bağımlı bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir. Yan ve Pan, (2002)'de *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus obliquus* ve *Chlorella lunula* mikroalglerinde CuCl_2 uygulayarak yaptıkları bir çalışmada hücre sayısında artışın meydana geldiği eksponensiyel fazda bakır birikiminin dilüe edildiğini ve benzer şekilde artan konsantrasyonlarda BCF'nin azaldığını, ayrıca durağan fazda cansız hücre sayısı arttığı ve bu hücreler aktif desorpsiyon kapasitelerini yitirdikleri için BCF'de tekrar artış kaydedildiğini bildirmişlerdir.

Metal stresıyla karşılaşan organizmalarda bu strese karşı tolerans ve metal detoksifikasyonu ile ilgili değişik mekanizmaların olduğu ve bu mekanizmaların metabolizmaya bağlı oldukları bilinmektedir. Çeşitli streslere karşı ısı şoku proteinlerinin sentezlenmesi de hücre içinde stres detoksifikasyonunu sağlayan bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmamızda *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalginde, metal, ısı ve ozmotik stres gibi abiyotik streslere maruz bırakılan bitkilerde eksprese olduğu bilinen ısı şoku proteini HSP70'nin değişik metaller varlığında ekspresyonu ilk kez incelenmiştir.

Literatürde *Chlamydomonas reinhardtii* alginde ağır metal stresine yanıt olarak HSP70 düzeyindeki değişikliklerle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmazken, *Chlamydomonas reinhardtii*'de HSP70 genlerinin ısı şoku stresi ve ışıqla indüklediği bildirilmektedir (Kropat vd., 1995). Ayrıca sitoplazmik HSP70A proteinini kodlayan genin promotorunda ısı stresiyle indüklenmeyip, ışıqla indüklenen *cis*-elementler bulunduğı ve bu nedenle genin ışıqla aktivasyonunun ısı şokundan bağımsız bir yolla gerçekleştirildiği de bildirilmiştir (Drzymalla vd., 1996).

Çalışmamızda CuCl_2 ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş pCB 740 RNA örneklerine ait otoradyogramda, hem metal hem de ısı şoku stresi uygulanmış örneklerin HSP70B probu ile etkileşimleri görüldürken, herhangi bir metal stresinin verilmediği kontrol örnekleri ile sadece metal uygulanmış örneklerin proba etkileşimleri gözlenmediği için *Chlamydomonas reinhardtii* alginde uyguladığımız konsantrasyonlarda HSP70B geninin metalle indüklenmediği anlaşılmıştır. Alınan sonuca rağmen daha yüksek konsantrasyonlarda metal uygulanması halinde, ekspresyonda değişiklik olup olmadığı daha sonra araştırılmalıdır.

CuCl_2 ve ısı şoku stresi ile indüklenmiş pCB 873 RNA örneklerine ait otoradyogramda ise pCB 740 şuşundan farklı olarak, hem metal hem de ısı şoku stresi uygulanmış örneklerde, HSP70B probu ile herhangi bir etkileşim gözlenmedi. Bu sonuç pCB740 otoradyogramında görülen, HSP70B geninin yalnızca ısı şoku ile indüklediği sonucunu doğrulamaktadır.

Değişik organizmalarda ağır metallerin HSP indüksiyonu üzerindeki etkisinin incelendiği çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. *Enteromorpha intestinalis* alginde bakır uygulamasının HSP70 ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir (Lewis vd., 2001). *Enteromorpha intestinalis* yosunu ile yapılan başka bir çalışmada, bakır tek başına uygulandığında HSP70 düzeyinin arttığı, bakır uygulanmış gruplarla, uygulanmamış kontrol grupları ısı şoku varlığında karşılaştırıldığında ise iki grup arasında fark görülmediği ve bakırın bu organizmanın ısı şokuna yanıtını artırma kabiliyeti üzerinde bir etkisi olmadığını bildirilmiştir (Lewis vd., 1998). *Deroceras reticulatum*'da da Pb, Cd ve Zn metalleri varlığında HSP70 proteini ekspresyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir (Köhler vd., 1996). Yeşil alg *Raphidocelis subcapitata*'da HSP70'in uygulanan doza bağılı şekilde ZnCl_2 ve SeO_2 metalleri tarafından indüklediğini gösterilmiştir (Bierkens vd., 1998).

Saccharomyces cerevisiae'de Cd'un protein denatürasyonuna yol açtığı, denatüre edilmiş proteinlerin ATP ve diğer yardımcı faktörler varlığında ısı şoku proteini için substrat oluşturduğu ve Cd'un bu şekilde 70 kDa'luk stres proteininin sentezini indüklediği bildirilmektedir (Sanità di Toppi ve Gabbrielli, 1999). Bitkilerde de hem ısı stresi hem de ağır

metal stresinde yanıt olarak HSP ekspresyonunda artış olduğuna dair pek çok rapor bildirilmiştir (Hall, 2002). *Lycopersicon peruvianum* hücre kültüründe Cd'a maruz bırakılan hücrelerde anlamlı miktarda HSP70'in plazmalemma, mitokondri membranları ve E.R.'a bağlandığı görülmüş ve bunun HSP70'in membranların Cd hasarına karşı korunmasıyla ilgili olduğu bildirilmiştir (Sanità di Toppi ve Gabbrielli, 1999).

Mikroalglerde ağır metal stresine karşı toleransı ve detoksifikasyonu sağlayan mekanizmalardan bir diğerinin MT ekspresyonu olduğu bilinmektedir. MT genleri hayvan hücrelerinden, mantar, bitki ve alglerden klonlanmıştır. Ayrıca ağır metallerin bu genlerin ekspresyonunun aktivasyonunu transkripsiyon düzeyinde yaptığı bulunmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarla birçok organizmada metallotiyonin proteini ekspresyonu belirlenmiştir. Literatürde ökaryotik ve fotosentez yapabilen tek hücreli bir organizma olan *Chlamydomonas reinhardtii* alginde metallotiyonin proteininin varlığını belirleyen bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte genellikle organizmanın ağır metal bağlama kapasitesini artırmak amacıyla yabancı metallotiyonin genlerinin transferi ve hücredeki ekspresyonuyla ilgili çalışmalar bildirilmiştir. *Chlamydomonas*'ın ağır metal bağlama kapasitesinin MT ekspresyon düzeyinin artırılmasıyla artabileceği düşünülerek, PC'lerden daha fazla metal bağlama kapasitesinde olan kuş MT genleri indüklenabilen promotörlerin kontrolü altında *Chlamydomonas*'a aktarılıp ağır metal bağlama kapasitesinin artırıldığı bildirilmiştir (Cai vd., 1995). Siripornadulsil vd., (2000) tarafından transgenik *Chlamydomonas* hücrelerinin tek yüklü veya çift yüklü iyonlara spesifitesini artırmak için, tavuk MT-II'si ile *Chlamydomonas* plazma membran proteini arasında füzyon gen oluşturulup hücre yüzeyine iştirildiğinde, sentetik genin eksprese olduğu transgenik algin 100 μM Cd'a toleransının ve 50 μM Cd'da yabancı tip hücrelere göre Cd bağlama kapasitesinin 2-5 kat arttığı belirtilmektedir. Diğer bir çalışmada ise *Chlamydomonas reinhardtii*'de yabancı sınıf II MT'lerin (MT-II) ekspresyonunun Cd'un toksik konsantrasyonuna toleransı artırdığı ve PC sentezini indüklemeyen Cd konsantrasyonlarında MT-II geninin eksprese olduğu hücrelerin yabancı tip hücrelere göre 2 kat daha fazla Cd bağlama kapasitesi olduğu gözlenmiştir [21].

Bu çalışmada *Chlamydomonas reinhardtii* hücrelerinde metal varlığında metallotiyonin ekspresyonu RNA ve protein düzeyinde ilk kez incelendi. Metallotiyonini indükleyici stres olarak CuCl_2 , CdCl_2 ve $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ metallerinin farklı konsantrasyonları kullanıldı. pCB 740 hücrelerinde her üç metalin de MT ekspresyonunu indüklediği, ancak uyguladığımız konsantrasyonlarda artan konsantrasyonun ekspresyon düzeyinde farklılığa yol açmadığı gözlemlendi. Ayrıca kadmiyumun metallotiyonin ekspresyonunun indüklenmesinde bakır ve

kurşun kadar etkili olmadığı gözlemlendi. Isı şoku uygulamasının ise metallothionein ekspresyonunda metalin yaptığı etkiden daha fazla bir etkiye sahip olmadığı görüldü. Benzer şekilde Hermes vd., (2001), belirli konsantrasyonda Cd ve ısı şoku ile muamele edilen *Carp*'ta bu streslerin MT-1 ve MT-2 genlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisine bakıldığında, streslere maruz kalan dokunun tipine ve uygulanan konsantrasyona bakılmaksızın Cd'un her iki gende de geçici bir indüksiyona yol açtığını ve ısı şokunun çok fazla etkisinin olmadığını bildirmektedir.

pCB 873 hücrelerinde de uyguladığımız metallerin metallothionein mRNA'sını indüklediği, farklı konsantrasyonların ekspresyon düzeyinde farklılığa yol açmadığı ve diğer suşta olduğu gibi kadmiyumun indüksiyonda çok etkili olmadığı gözlemlendi. pCB 873 ısı şoku elementleri delesiyona uğratılmış bir suş olduğu için ısı şoku uygulaması metallothionein indüksiyonunda değişik etkilere yol açmıştır. Isı şokunun bakır ile metallothionein indüksiyonunda pozitif etkiye sahip olduğu, ancak kurşunla birlikte uygulandığında indüksiyonu azalttığı gözlemlendi. Ayrıca ısı şokunun kadmiyum varlığında da kurşunda olduğu gibi negatif etkisinin olduğu ancak bu etkinin kurşundaki kadar belirgin olmadığı gözlemlendi.

Chlamydomonas reinhardtii yeşil alginde metal varlığında metallothionein ekspresyonunu protein düzeyinde incelemek için indükleyici olarak CuCl_2 kullanıldı. Elde edilen proteinler doğal jelde ayrıştırıldıktan sonra jelin dietil-ditiyo karbamik asit solüsyonuyla muamele edilmesiyle metallothionein proteininin bakır bağlama özelliğinden hareket edilerek bakırın metallothionein ekspresyonunu indüklediği anlaşıldı. 50 ve 100 μM CuCl_2 uygulanan yabancı tip hücrelerinde farklı zaman aralıklarında ekspresyonun indüklediği ancak düzeyinde herhangi bir fark olmadığı gözlemlendi. Hücrelere uygulanan metal konsantrasyonu artırıldığında 100 μM 'a kadar metallothionein ekspresyonu düzeyinde fark görülmezken, bu konsantrasyondan sonra artan konsantrasyonlarda (500 ve 1000 μM) metallothionein ekspresyonu düzeyinin arttığı görüldü. Duvarsız mutant suşunda da aynı konsantrasyonlarda benzer sonuçlar elde edildi.

Farklı organizmalarda ağır metal varlığında MT ekspresyonu ile ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. Hong Kong göl ve nehirlerinde yaygın biçimde bulunan *Tilapia mossambica* ve *Cyprinus carpio* balıkları üzerinde metallothioneinin bakır ve çinko metallerine karşı yanıtının incelendiğinde *Tilapia* bakıra dirençli bir tür iken, *Carp*'ın bakıra duyarlı bir tür olduğu ve ağır metale karşı dayanıklı organizmada MT ekspresyonu gerçekleşirken, duyarlı olanda ekspresyon görülmediği bildirilmiştir (Lam vd., 1998). Değişik konsantrasyonlarda bakır uygulanan istiridyelerde de bakırın Cu metallothioneinlerin indüksiyonuna yol açtığı ve MT

indüksiyonunda ilk dört gün boyunca herhangi bir artış görülmezken, lipid peroksidasyonundaki azalmayla birlikte MT'lerde artış görüldüğü bildirilmiştir (Ringwood vd., 1998).

Sonuç olarak, yüksek düzeyde ağır metali biriktirebilme özelliği sayesinde sulardan ağır metallerin giderilmesinde kullanılma potansiyeline sahip *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil algi ile yapılan bu çalışmada metalin üreme üzerindeki etkisi ve metabolizmaya bağlı bir yolla hücre tarafından toplandığı belirlendi. Ağır metale karşı hücrel detoksifikasyonu sağlayabilmek amacıyla sentezlendiği düşünülen ısı şoku proteini HSP70 ve metalotiyonin ekspresyonlarının ağır metalle indüksiyonu incelendi. Uyguladığımız metal konsantrasyonlarında HSP70 indüksiyonu gözlenmezken; uygulanan tüm konsantrasyonlarda MT ekspresyonunun indüklendiği görüldü. Elde edilen bu bulgular daha sonra yapılacak olan algler aracılığıyla metal giderimi çalışmaları için *Chlamydomonas reinhardtii* yeşil alginde ağır metal stresi detoksifikasyonu mekanizmalarının anlaşılması bakımından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Abd-El Monem, H.M., Corradi, M.G. ve Gorbi, G., (1998), "Toxicity of Copper and Zinc to Two Strains of *Scenedesmus acutus* Having Different Sensitivity to Chromium", *Environmental and Experimental Botany*, 40:59-66.
- Antonoli, A.H., (2002), "An Evaluation of The Ability of Transgenically Modified *Chlamydomonas reinhardtii* to Survive and Sequester Heavy Metals From Berkeley Pit, the Largest Abandoned Open Pit Copper Mine in Montana: Phase 2", The 10th International Conference on The Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*, 11-16 June 2002, Vancouver, Canada.
- Baumann, J.W., Liu, J., Klaassen, C.D., (1993), "Production of Metallothionein and Heat-Shock Proteins in response to Metals", *Fundam. Appl. Toxicol.*, 21:15-22.
- Bierkens, J., Moes, J. ve Plaetse, F.V., (1998), "Dose Dependent Induction of Heat Shock Protein 70 Synthesis in *Raphidocelis subcapitata* Following Exposure to Different Classes of Environmental Pollutants", *Env. Pollution*, 101:91-97.
- Briat, J.F., Lebrun, M., (1998), "Plant responses to metal toxicity", *Plant Biology and Pathology*, 322:43-54.
- Cai, X.H., Traina, S.J., Logan, T.J., Gustafson, T. ve Sayre, R.T., (1995), "Applications of Eukaryotic Algae for The Removal of Heavy Metals from Water", *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 4(4):338-344.
- Chen, Z., Ren, L., Shao, Q., Shi, D. ve Ru, B., (1999), "Expression of Mammalian Metallothionein-I Gene in Cyanobacteria to Enhance Heavy Metal Resistance", *Marine Pollution Bulletin*, 39(1-2):155-158.
- Cobbett, C. ve Goldsbrough, P., (2002), "Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis", *Annu.Rev.Plant Biol.*, 53:159-182.
- Danilov, R.A. ve Ekelund, N.G., (2001), "Effects of Cu^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} and Pentachlorophenol on Photosynthesis and Motility in *Chlamydomonas reinhardtii* in short-term expression experiments", *BMC Ecology*, 1:1-7.
- Deegenars, M.L. ve Watson, K., (1997), "Stress Proteins and Stress Tolerance in an Antarctic, Psychrophilic Yeast, *Candida psychrophila*", *FEMS Microbiology Letters*, 151:191-196.
- Del Razo, L.M., Quintanilla-Vega, B., Brambila-Colombres, E., Calderon-Aranda, E.S., Manno, M. ve Albores, A., (2001), "Stress Proteins Induced by Arsenic", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 177, 132-148
- Devriese, M., Tsakaloudi, V., Garbayo, I., Leon, R., Vilchez, C. ve Vigara, J., (2001), "Effect of Heavy Metals on Nitrate Assimilation in The Eukaryotic Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Physiol. Biochem.*, 39:443-448.
- Dönmez, G. ve Aksu, Z., (1999), "The Effect of Copper (II) Ions on The Growth and Bioaccumulation Properties of Some Yeasts", *Process Biochemistry*, 35:135-142.
- Dönmez, G.Ç., Aksu, Z., Öztürk, A. ve Kutsal, T., (1999), "A Comparative Study on Heavy Metal Biosorption Characteristics of Some Algae", *Process Biochemistry*, 34:885-892.
- Drzymalla, C., Schroda, M., Beck, C.F., (1996), "Light Inducible Gene *HSP70B* Encodes a Chloroplast-Localized Heat Shock Protein in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Molecular Biology*, 31:1185-1194.

- Feinberg, A.P. ve Vogelstein, B., (1983), "A Technique for Radiolabelling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Activity", *Anal. Biochem.*, 132:2-13.
- Fernandes J.C. ve Henriques, F.S., (1991), "Biochemical, Physiological and Structural Effects of Excess Copper in Plants", *Botanical Review*, 57(3): 246-273.
- Foley, R.C., Liang, Z.M. ve Singh, K.B., (1997), "Analysis of Type 1 Metallothionein cDNAs in *Vicia faba*", *Plant Molecular Biology* 33:583-591.
- Foster, R., The Univ. of Calgary. "Molecular analysis of Human MT gene expression", PhD Thesis, Calgary, Alberta, Mayis 1999.
- Gallagher, K.A., Wheeler, A.J. ve Orford, J.D., (1996), "An Assesment of The Heavy Metal Pollution of Two Tidal Marshes on The North-West Coast of Ireland", *Biology and Environment: Proceedings of The Royal Irish Academy*, 96(3), 177-188.
- Hall, J.L., (2002), "Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance", *Journal of Experimental Botany*, 53(366):1-11.
- Harris, E.H., (2001), "Chlamydomonas As A Model Organism", *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52:363-406.
- Hermesz, E., Ábrahám, M. ve Nemscók, J., (2001), "Tissue-Specific Expression of Two Metallothionein Genes in Common Carp During Cadmium Exposure and Temperature Shock", *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 128: 457-465.
- Hill, K.L., Hassett, R., Kosman, D. ve Merchant, S., (1996), "Regulated Copper Uptake in *Chlamydomonas reinhardtii* in Response to Copper Availability", *Plant Physiology*, 112:697-704.
- Holmes, D. ve Quigley, M., (1981), "A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids", *Anal. Biochem.*, 114:193-197.
- Hu, S., Lau, W.K.K., Wu, M., (2001), "Cadmium Sequestration in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Science*, 161:987-996.
- Joshi, A. ve Tiwari, P.K., (2000), "Chromosomal Responses of Blowfly *Lucilia cuprina* to Heat and Heavy Metal Stress", *Genetica*, 109:211-218.
- Kadyrzhanova, D.K., Vlachonassios, K.E., Ververidis, P. ve Dilley, D.R., (1998), "Molecular Cloning of a Novel Heat Induced/Chilling Tolerance Related cDNA in Tomato Fruit by use of mRNA Differential Display", *Plant Molecular Biology*, 36:885-895.
- Kaplan, D., Heimer, Y.D., Abeliovich, A., Goldsbrough, P.B., (1995), "Cadmium Toxicity and Resistance in *Chlorella* sp.", *Plant Science*, 109:129-137.
- Kägi, J.H.R., Schäffer, A., (1988), "Biochemistry of Metallothionein", *Biochemistry*, 27(23):8509-8515.
- Köhler, H.R., Eckwert, H., Triebkorn, R. ve Bengtsson, G., (1999), "Interaction Between Tolerance and 70kDa Stress protein (HSP70) Induction in Collebolan Populations Exposed to Long-Term Metal Pollution", *Applied Soil Ecology*, 1:43-52.
- Köhler, H.R., Rahman, B., Gräff, S., Berkus, M. ve Triebkorn, R., (1996), "Expression of The Stress-70 Protein Family (HSP70) due to Heavy Metal Contamination in The Slug, *Deroceras reticulatum*: An Approach to Monitor Sublethal Stress Conditions", *Chemosphere*, 33(7):1327-1340.
- Kropat, J., Von Gromoff, E.D., Müller, F.W. ve Beck, C.F., (1995), "Heat Shock and Light Activation of a *Chlamydomonas HSP70* Gene are Mediated by Independent Regulatory Pathways", *Mol.Gen.Genet.* 248: 727-734.

- Laemmli, U.K., (1970), "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4", *Nature*, 227: 680-685.
- Lam, K.L., Ko, P.W., Wong, J.K. ve Chan, K.M., (1998), "Metal Toxicity and Metallothionein Gene Expression Studies in Common Carp and Tilapia", *Marine Environmental Research*, 46(1-5):563-566.
- Lemaire, S., Keryer, E., Stein, M., Schepens, I., Issakidis-Bourgue, E., Gerard-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M. ve Jacquot, J.P., (1999), "Heavy-Metal Regulation of Thioredoxin Gene Expression in *Chlamydomonas reinhardtii*", *Plant Physiology*, 120(3):773-778.
- Lewis, S., Donkin, M.E., Depledge, M.H., (2001), "Hsp70 Expression in *Enteromorpha intestinalis* (Chlorophyta) Exposed to Environmental Stressors", *Aquatic Toxicology*, 51: 277-291.
- Lewis, S., May, S., Donkin, M.E. ve Depledge, M.H., (1998), "The Influence of Copper and Heat Shock on The Physiology and Cellular Stress Response of *Enteromorpha intestinalis*", *Marine Environmental Research*, 46(1-5):421-424.
- Lustigman, B. ve Lee, L.H., (1997), "Effect of Mercury on The Growth of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59: 828-833.
- Macfie, S.M. ve Welbourn, P.M., (2000), "The Cell Wall as a Barrier to Uptake of Metal Ions in The Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae)", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 39:413-419.
- Marc V., M., Bofill, R., Gonzales-Duarte, R., Gonzales-Duarte, P., Capdevila, M. ve Atrian, S., (2001), "A New Insight into Metallothionein (MT) Classification and Evolution", *The Journal of Biological Chemistry*, 276(35):32835-32843.
- Mehta, S.K. ve Gaur, J.P., (2001), "Characterization and Optimization of Ni and Cu Sorption from Aqueous Solution by *Chlorella vulgaris*", *Ecological Engineering*, 18:1-13.
- Mej  re, M. ve Bülow, L., (2001), "Metal Binding Proteins and Peptides in Bioremediation and Phytoremediation of Heavy Metals", *Trends in Biotechnology*, 19(2):67-73.
- Memon, A.R., Ito, S. ve Yatazawa, M., (1979), "Absorption and Accumulation of Iron, Manganese and Copper in Plants in the Temperate Forest of Central Japan", *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 25:611-620.
- Memon, A.R., Kuboi, T., Fuyi, K., Ito, S. ve Yatazawa, M., (1983), "Taxonomic character of plant species in absorbing and accumulating alkali and alkaline earth metals in temperate forest of Japan", *Plant and Soil*, 70:367-389.
- Memon, A.R., Herrin, D.L. ve Thompson, G., (1993a), "Intracellular Translocation of a 28 kDa GTP-Binding Protein during Osmotic Shock-Induced Cell Volume Regulation in *Dunaliella salina*", *Biochemical Biophysical Acta*, 1179:11-22.
- Memon, A.R., Clark, G.B. ve Thompson, G.A., (1993b), "Identification of an ARF Type Low Molecular Mass GTP-Binding Protein in Pea", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 193:809-813.
- Memon, A.R., Aktopraklıgil, D.,   zdemir, A. ve Vertii, A., (2001), "Heavy metal accumulation and detoxification mechanisms in plants", *Turkish Journal of Botany*, 25:111-121.
- Morimoto, R.I., (1993), "Cells in Stress: Transcriptional Activation of Heat Shock Genes", *Science*, 259:1409-1410.
- Mosul  n, S., Domínguez, M.J., Vigara, J., Vílchez, C., Guiraum, A. ve Vega, J.M., (2003),

- "Metal Toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Effect on Sulfate and Nitrate Assimilation", *Biomolecular Engineering*, 20:199-203.
- Müller, F.W., Igloi, G.L. ve Beck, C.F., (1992), "Structure of a Gene Encoding Heat-Shock Protein HSP70 from The Unicellular Alga *Chlamydomonas reinhardtii*", 111:165-173.
- Otsuka, F., (2001), "Molecular Mechanism of the Metallothionein Gene Expression Mediated by Metal-Responsive Transcription Factor 1", *Journal of Health Science*, 47(6):513-519.
- Pérez-Rama, M., Alonso, J.A., López, C.H. ve Vaamonde, E.T., (2002), "Cadmium Removal by Living Cells of The Marine Microalga *Tetraselmis suecica*", *Bioresource Technology*, 84:265-270.
- Prasad, M.N.V., Drej, K., Skawinska, A. ve Stratka, K., (1998), "Toxicity of Cadmium and Copper in *Chlamydomonas reinhardtii* Wild-Type (WT 2137) and Cell Wall Deficient Mutant Strain (cw 15)", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60:306-311.
- Quarmby, L., (2000), "Meeting Report: 9th International Conference on the Cell and Molecular Biology of *Chlamydomonas*", *Protist*, 151:193-199.
- Ringwood, A.H., Connors, D.E. ve DiNovo, A., (1998), "The Effects of Copper Exposures on Cellular Responses in Oysters", *Marine Environmental Research*, 46(1-5): 591-595.
- Robinson, N.J., Tommey, A.M., Kuske, C. ve Jackson, P.J., (1993), "Plant Metallothioneins", *Biochemistry*, 295:1-10.
- Rochaix, J.D., (1995), "*Chlamydomonas reinhardtii* as the Photosynthetic Yeast", *Annual Review of Genetics*, 29:209-230.
- Rubinelli, P., Siripornadulsil, S., Gao-Rubinelli, F. ve Sayre, R.T., (2002), "Cadmium and Iron Stress Inducible Gene Expression in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* Evidence for H43 Protein Function in Iron Assimilation", *Planta*, 215: 1-13.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. ve Maniatis, T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanità di Toppi, L. ve Gabbriellini, R., (1999), "Response to Cd in Higher Plants", *Environmental and Experimental Botany*, 41:105-130.
- Sayers, Z., Brullion, P., Suergun, D.I., Zielenkiewicz, P. ve Koch, M.H.J., (1999), "Biochemical and Structural Characterization of Recombinant Copper-Metallothionein from *Saccharomyces cerevisiae*", *Eur.J.Biochem.*, 262:858-865.
- Schroda, M., Blöcker, D. ve Beck, C.F., (2000), "The *HSP70A* Promoter as a Tool for The Improved Expression of Transgenes in *Chlamydomonas*", *The Plant Journal*, 21(2):121-131.
- Schroda, M., Vallon, O., Wollman, F.A. ve Beck, C.F., (1999), "A Chloroplast-Targeted Heat Shock Protein 70 (HSP70) Contributes to The Photoprotection and Repair of Photosystem II during and after Photoinhibition", *The Plant Cell*, 11:1165-1178.
- Siripornadulsil, S., Traina, S. ve Sayre, R., (2002), "Characteristic of *Chlamydomonas* Cells Expressing Gene Encoding Synthetic Heavy Metal Binding Proteins", *The 10th International Conference on The Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas*, 11-16 June 2002, Vancouver, Canada.
- Tedengren, M., Olsson, B., Reimer, O., Brown, D.C. ve Bradley, B.P., (1999), "Heat Pretreatment Increases Cadmium Resistance and HSP 70 Levels in Baltic Sea Mussels", *Aquatic Toxicology*, 48:1-12.

- Terry, P.A. ve Stone, W., (2002), "Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*", *Chemosphere*, 47:249-255.
- Travieso, L., Canizares, R.O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A.R., Dupeyron, R.ve Valiente, V., (1999), "Heavy Metal Removal by Microalgae", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 144-151.
- Vílchez, C., Garbayo, I., Lobato, M.V. ve Vega, J.M., (1997), "Microalgae-Mediated Chemicals Production and Wastes Removal", *Enzyme and Microbial Technology*, 20:562-572.
- Von Gromoff, E.D., Treier, U. ve Beck, C.F., (1989), "Three Light-Inducible Heat-Shock Genes of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Mol. Cell Biol.*, 9:3911-3918.
- Weiss-Magasic, C., Lustigman, B. ve Lee, L.H., (1997), "Effect of Mercury on the Growth of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 828-833.
- Yan, H. ve Pan, G., (2002), "Toxicity and Bioaccumulation of Copper in Three Green Microalgal Species", *Chemosphere*, 49:471-476.

INTERNET KAYNAKLARI

- [1] <http://atlas-conferences.com/cgi-bin/abstract/caji-52>
- [2] www.aquatext.com/tables/heavymel.htm
- [3] www.cpp.org.pk/articles/heavy_metals.html
- [4] <http://www.cadmium.org/introduction.html>
- [5] www.jhu.edu/hsrc/cadmium.pdf
- [6] <http://www.nature.nps.gov/toxic/copper.pdf>
- [7] www.nature.nps.gov/toxic/lead.pdf
- [8] www.geog.oug.bc.ca/conted/onlinecourses/geog_210/210_8_5.html
- [9] <http://www.sg.ohio-state.edu/pdfs/tl-so-01.pdf>
- [10] <http://www.biosci.ohio-state.edu/news/synergy/2000-2001/metal.html>
- [11] <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/chlamy/introduction.html>
- [12] <http://www.remf.dartmouth.edu/images/algaeSEM/index.html>
- [13] <http://www.biology.duke.edu/chlamy/info.html>;
- [14] <http://megasun.bch.umontreal.ca/protists/chlamy/lifehist.html>
- [15] <http://www.user.rhrk.uni-kl.de/~thyssen/chlamy.htm>
- [16] www.uni-koeln.de/math-nat-fak/botanik/bot1/kflecht/pagepic25.html
- [17] <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/kille/Models/RatMT3.html>
- [18] <http://www.cf.ac.uk/biosi/staff/kille/Models/MT3.html>
- [19] <http://biology.ecsu.ctstateu.edu/ChlamyTeach/growthmedia.htm>
- [20] www.biology.duke.edu/chlamy/methods/dna.html
- [21] www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/seminar/99abstracts.html

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi	10.05.1978	
Doğum yeri	İstanbul	
Lise	1991-1994	Samsun Ondokuzmayıs Lisesi
Lisans	1994-1998	İstanbul Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	2000-2003	Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Programı

Çalıştığı kurum

1998-Devam ediyor YTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
Araştırma Görevlisi