

**Termoasidofilik Arkeon *Thermoplasma
volcanium*'un Ekspresyon Mikrodizinleri
Kullanılarak Stres Koşullarında
Transkriptom Analizi**

Program Kodu: 1002

Proje No: 113T085

Proje Yürütücüsü:

Prof. Dr. Semra KOCABIYIK

Bursiyer:

Sema ZABCI

HAZİRAN 2014

ANKARA

ÖN SÖZ

Bu çalışmada, bir arke olan *Thermoplasma volcanium* model olarak kullanılarak ısı şoku, pH ve oksidatif stres tepkisinin global gen ekspresyonuna etkisi tüm genom ekspresyon mikrodizinleri kullanılarak incelenmiştir. Böylece stres altında eşgüdümlü olarak uyarılan ve kontrol edilen gen setleri belirlenmiş ve bir sonraki aşamada *T. volcanium*'da strese ilişkin transkripsiyonel ağların incelenmesi için gerekli veriler elde edilmiştir. Bu sonuçlar literatür için yeni olup stres tepkisi ile ilgili bilinen mekanizmalarda yer alan proteinlerin yanısıra, işlevi henüz tanımlanmamış olan yeni proteinler de bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar bir Uluslararası Bilimsel Kongre'de sunulmak üzere kabul edilmiştir. Projeden sağlanan bursiyer desteği ile yürütülen bir Yüksek Lisans tez çalışması da büyük ölçüde tamamlanmıştır.

Projemize sağladığı maddi destek dolayısı ile TÜBİTAK'a ve bütçe harcamalarında yardımlarından dolayı ODTÜ-TÜBİTAK/BAP çalışanlarına teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tablo Listesi	iii
Şekil Listesi	iv
Özet	v
Abstract	vi
1. Giriş	1
2. Literatür Özeti	1
3. Gereç ve Yöntem	4
3.1 <i>Thermoplasma volcanium</i> Kültürlerine Farklı Stres Uygulamaları	4
3.2 <i>T. volcanium</i> Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu	5
3.3 Mikrodizin Analizleri	5
3.3.1 cDNA Sentezi ve Amplifikasyonu ve Floresan İşaretleme	5
3.3.2 <i>T. volcanium</i> Tüm Genom Ekspresyon Çiplerin Tasarımı	5
3.3.3 Agilent Temsilci Firma Desteği ile Yapılan Çalışmalar	6
3.3.4 Mikrodizin Sonuçların Analizi	6
3.4 Nicel Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)	6
3.4.1 Tümlayıcı DNA (cDNA) Sentezi	6
3.4.2 qRT- PCR	7
4. Bulgular	7
4.1 RNA Kalite Kontrolü	7
4.2 Mikrodizin Görüntüleri	9
4.3 Normalizasyon	11
4.4 Mikrodizin Veri Analiz Sonuçları	15
4.4.1 Isı Şokunun <i>T. volcanium</i> 'da Gen Anlatımına Etkisi	15
4.4.2 pH stresinin <i>T. volcanium</i> 'da Gen Anlatımına Etkisi	18
4.4.3 Oksidatif Stresin <i>T. volcanium</i> 'da Gen Anlatımına Etkisi	19
4.4.4 Stres Koşullarında Transkripsiyonları Etkilenen Ortak Genler	20
4.4.5 Gerçek Zamanlı Nicel PCR Sonuçları	21
5. Tartışma	23
6. Kaynaklar	24
7. TÜBİTAK Proje Özet Bilgi Formu	28
8. EKLER	29

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümleri ve kalite analizi	8
--	---

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mikrodizin analizi için seçilen 16 RNA örneğinin RNA örneğinin jel elektroforez görüntüleri.....	9
Şekil 2 Mikrodizin analizi için seçilen 16 RNA örneğinin Bioanlayzer elektrogram sonuçları.....	10
Şekil 3 Dizin görüntüleri.....	10
Şekil 4. Whisker plot	11
Şekil 5. 3D korelasyon grafiği	12
Şekil 6. Hiyerarşik kümelemeyi gösteren Heat- map	12
Şekil 7. Isı şoku örneklerinin analizi.....	13
Şekil 8. pH stres örneklerinin analizi.....	14
Şekil 9. Oksidatif stres örneklerinin analizi.....	15
Şekil 10. Venn eğrileri.....	21
Şekil 11. TVN0947, TVN0489 ve TVN01145 genlerinin transkripsiyonuna ısı şokunun etkisi	22
Şekil 12. TVN1128 (alfa) ve TVN0507 (beta) termozom genlerinin transkripsiyonuna ısı şokunun etkisi	22
Şekil 13. TVN0947, TVN1128 ve TVN0507 genlerinin transkripsiyonuna oksidatif stresin (0.03 mM H ₂ O ₂) etkisi	23

ÖZET

Bu projede tüm genom mikrodizin teknolojisi kullanılarak, termoasidofilik bir arke olan *Thermoplasma volcanium*'da yüksek sıcaklık (70 °C), yüksek pH (pH 5.0) ve oksidatif stres (0.03 mM H₂O₂) koşullarında transkripsiyon düzeyinde değişim gösteren ve stres tepkisinde yer alması olası proteinleri kodlayan genler belirlenmiştir. Mikrodizin analiz sonuçları, *T.volcanium* hücrelerinin strese maruz kaldıkları 60 dakika boyunca anlatım düzeyleri düşen başlıca genler içinde işlevsel olarak enerji üretimi ve dönüşümü, transkripsiyon, translasyon ve hücre hareketi ile bağlantılı olanlar önemli ölçüde inhibe olmuşlardır. Bu durum, stres sırasında genel olarak birçok organizmada görülen enerji azalmasına karşı bir önlem olarak yüksek enerji gerektiren sentetik süreçleri minimize etmek için geliştirilen bir strateji olarak düşünülebilir. Isı şoku tepkisi, spesifik olarak bazı ısı-şoku bağlantılı genlerin anlatımının artması ile ilişkilendirilmiştir. *T. volcanium*'da bu bağlamda özellikle moleküler şaperon sistemleri olan termozom ve Hsp70'in (GrpE,K gibi) kritik rolleri olduğu anlaşılmaktadır. pH stresinde ise kilit proteinler olarak hücrede iyon dengesini sağlama ve korumada önemli rolleri olan transporter ve antiporterler dikkat çekmektedir. *T. volcanium*'da oksidatif strese özgü kabul edilebilecek tepki ise serbest radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu redoksin sistemlerinin tetiklenmesidir. Ancak bu sistemlerle ilgili genlerin bazılarının anlatımları artarken diğerlerinde azalması, oksidatif stresle baş etmede zamana bağlı olarak etkileri nitel ve nicel olarak değişen birden fazla ve biribiri ile örtüşen yolların rolü olabileceğini akla getirmektedir. *T. volcanium*'un mikrodizin analizi ile pH ve oksidatif stres altında ortaya çıkan global gen ekspresyon profilleri, transkripsiyonu regüle edilen birçok ortak gen bulunması nedeniyle, bu iki stres mekanizması arasında bağlantı olabileceğini, ancak ısı stresine spesifik mekanizmalarının bunlardan bağımsız olabileceğini düşündürmektedir. Mikrodizin analiz sonuçlarına göre strese tepki olarak anlatım düzeyleri önemli ölçüde değişen TVN0947, TVN0507, TVN01128, TVN0489, ve TVN1145 genlerinin anlatımındaki nitel değişim qRT-PCR yöntemi ile de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu genlerin her iki teknikle belirlenen anlatım örüntülerinin tutarlı olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Stres tepkisi, *Thermoplasma volcanium*, mikrodizin teknolojisi, ısı-şoku, transkriptom

ABSTRACT

In this project, under increased temperature (70 °C), high pH (pH 5.0) and oxidative stress (0.03 mM H₂O₂) the genes of thermoacidophilic archaeon, *Thermoplasma volcanium*, transcription levels of which changes and code for the proteins that possibly take role in stress response were determined by using microarray technology. Microarray analysis revealed that among the genes expression of which changed *T.volcanium* cells over the 60 min stress exposure, the major ones were those functionally linked to energy production and conversion, transcription and translation and cell motility. Expression of these genes were significantly inhibited. This could be a strategy developed by the cells to minimize the synthetic processes that require high energy as a response to enegy shortage observed in many organisms when they are under stress. Specific response to heat stress could be linked to elevated expression of genes encoding heat-shock related genes. In *T.volcanium* it appears that in this respect molecular chaperone systems, thermosome and Hsp70 (e.g., GrpE, K) should have critical roles. The key proteins in pH stress are transporters and antiporters with a possible role in maintanance of the ion balance of the cells. In *T. volcanium* oxidative stress was characterized by up-regulation of redoxin systems that are responsible for the detoxification of the free radicals. However, associated with such systems up-regulation of some genes, while others were down regulated simultaneously, may indicate the existance of multiple, overlapping pathways, and thier effects may qualitatively and quantitatively in a time dependent manner. Since there are several genes commonly regulated as response to pH and oxidative stress as revealed by the microarray analysis, this two stress mechanisms may be interrelated in *T. volcanium*, but heat-stress mechanism should be indepenedent from them. According to microarray result the stress responsive genes TVN0947, TVN0507, TVN01128, TVN0489, ve TVN1145 were selected to analyze the quantitative differentiation of their expression as a response to stress by qRT-PCR technique. The results demonstrated a consistent trend in the expression patterns of the selected genes by two techniques.

Keywords: stress response, *Thermoplasma volcanium*, microarray technology, heat-shock, transcriptom

1. GİRİŞ

Transkriptomik, fonksiyonel genomun önemli bir bileşeni olarak günümüzde temel biyolojik süreçlerin aydınlatılmasında en güçlü araçlardan birisidir. Özellikle DNA mikrodizin teknolojisi ile yürütülen transkriptom çalışmaları stres koşullarında anlatım düzeyi değişen genlerin belirlenmesinde ve ilgili yolların ortaya çıkarılmasında çok yararlı olmuştur. Tüm canlılarda görülen stres tepkisi, kendi yaşam koşulları diğer canlılar için "olağandışı" olan ve "stres" olarak nitelendirilebilen, ekstrem organizmalarda da mevcuttur. Ancak ekstrem organizmalarda ve onların en tipik temsilcileri olan Arkelerde görülen stres tepkisi henüz moleküler düzeyde tanımlanmamıştır ve bu sürecin temelindeki mekanizma(lar) hakkında ökaryot ve prokaryotlarla karşılaştırıldığında çok sınırlı bilgi mevcuttur. Bu projede tüm genom mikrodizin teknolojisi kullanılarak termoasidofilik bir arke olan *Thermoplasma volcanium*'da stres koşullarında global olarak anlatımı transkripsiyon düzeyinde değişim gösteren genler ve bunlar içinde stres tepkisinde yer alması olası proteinleri kodlayanlar belirlenmiştir. Ayrıca, ökaryot ve prokaryotlarda en fazla çalışılmış bir stres tepkisi olan ısı stres tepkisi yanısıra, ilk defa arkeler'de pH ve oksidatif strese direnç, tüm genom ekspresyon mikrodizinler kullanılarak, model organizma *T. volcanium*'da çalışılmıştır. Proje verilerine dayanarak, çalışılan üç farklı stres koşulunda (ısı, pH ve oksidatif) eşgüdümlü olarak uyarılan ve kontrol edilen gen setlerinin belirlenmesi mümkün olduğu gibi ve strese direnç sağlayan mekanizmalar hakkında önemli bilgiler elde edildiği gibi, bunlara ilişkin test edilebilecek hipotezler ileri sürmek de mümkün olabilecektir. Mikrodizin analizine göre transkripsiyon düzeyinde kontrole göre önemli ölçüde artma ya da azalma gösteren genler arasından seçilen bir grubunda Gerçek Zamanlı qPCR ile strese karşı transkripsiyonel değişim nicel olarak belirlenmiş ve iki farklı yöntemle elde edilen sonuçların tutarlı olduğu görülmüştür.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Mikrodizinler yüksek ölçekte veri kapasitesine sahip teknolojik araçlar olarak, işlevsel genomik kapsamında son 10 yıldır sıkça kullanılmaktadır. Mikrodizin analizlere genel olarak daha ileriki deneyler için yol gösteren pilot çalışmalar olarak ve ya daha önce başka yöntemlerle yapılmış gen anlatım çalışmalarını doğrulama aracı olarak, ya da yüksek hacimde veri üretmesi nedeniyle sistem biyolojisine entegrasyon amaçlı çalışmalarda başvurulmaktadır.

DNA mikrodizin analizleri, ekstrem yaşam koşullarına adaptasyonları dolayısı ile sıradışı özellik gösteren arkelerin hücre fizyolojisi ve metabolizması başta olmak üzere, arke

moleküler biyolojisi alanında kaydedilen gelişmelerde önemli rol oynamıştır. Buna paralel olarak Arke (meta) genom verileri de son yıllarda hızlı bir artış göstermiştir. Bu veriler arkelerin, bakterilerde olduğu gibi kompakt bir kromozom yapısına sahip olduğunu, ancak genetik bilginin işlenmesi sürecinde ökaryotlara benzerlik gösterdiklerini ortaya koymuştur. Karşılaştırmalı genom analizleri, yatay ve dikey gen transferinin bu organizmalarda yüksek düzeyde görülen genom esnekliğine katkıda bulunduğuna işaret etmektedir [Ettema vd., 2001; Ruepp vd., 2000; Frickey ve Lupas, 2004]. Her ne kadar bu analizler açık okuma kalıplarına potansiyel işlevler yüklemeye yararlı olmuşsa da, halen genlerin fonksiyonel anatosyonunu iyileştirmek konusunda klasik yaklaşımlarla (fizyoloji, biyokimya ve moleküler genetik), genomik tabanlı yüksek ölçekte veri sağlayan güncel tekniklerin (karşılaştırmalı, işlevsel ve yapısal genomik gibi) birlikte kullanılması mutlaka gereklidir.

Arke genomlarının karşılaştırmalı ve işlevsel analizlerinde başlıca hedefler metabolik yollarda eksik olan bağlantıları ve büyük ölçüde de kritik hücrenel süreçlerde rol alan düzenleyici sistemlere ait bilinmeyenleri ortaya çıkarmaktır [Makarova ve Koonin, 2003; Ettema vd., 2005]. Bu karmaşık süreçlerden önemli bir tanesi de stres tepkisi ve ona ilişkin sinyal yollarıdır. Termofilik arkelerin optimum gelişme sıcaklığı 50 °C ile 80 °C arasında değişmektedir. Bunlardan hipertermofilik olanlar ise 80 °C'nin üzerinde, hatta 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda gelişebilmektedirler. Arke için optimum olan bu gelişme koşulları, mezofilik organizmalar için olağandışıdır ve stres yanıtını tetiklemektedir. Stres sonucu yapısı çözülen proteinler işlevsel olmadıkları gibi, hücre için de tehlike oluştururlar. Bunların yüzeyde açığa çıkan hidrofobik bölgeleri birbirleri ile ve diğer hücre bileşenleri ile uygun olmayan ve istenmeyen şekilde etkileşirler. Bu nedenle hücre, denatüre olmuş proteinlerin mümkün olan en kısa sürede tekrar katlanmalarını sağlayacak mekanizmalarını harekete geçirme yoluna gider. Bu süreçte, stres tepkisi ile hücrede sentezi ve miktarı artan ve ısı şoku proteinleri (HSP) kapsamına giren şaperonlar önemli rol oynarlar.

Isı ve diğer stres çeşitlerinin HSP'leri kodlayan genlerin anlatımını regüle ettikleri uzun yıllardır bilinmektedir. HSP'ler membran transportu ve stabilitesi, protein katlanması ve hücre sinyal sistemleri gibi hücrede çok çeşitli süreçlerde önemli roller üstlenmişlerdir [Gething, 1997; Glatz vd., 1999; Ranford vd., 2000; Trent, vd., 2003]. En yaygın bulunan HSP'ler moleküler ağırlıklarına göre HSP104, HSP 90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP20 ve HSP10 ya da ısı ile uyarılabilen Clp ve Lon gibi proteazlardır [Lindquist ve Craig,1988]. Gen mikrodizinlerinin kullanılmasından sonra HSP'ye ek olarak diğer birçok genin de ısı ile uyarıldığı ortaya çıkmıştır [Richmond vd., 1999]. Örneğin, *E. coli* de mikrodizin analizleri 119 genin ısı ile kuvvetli şekilde uyarıldığını göstermiştir [Richmond vd., 1999]. Genel olarak *E. coli*, *C. jejuni* ve *B. subtilis*'te tüm genom mikrodizin analizleri ısı şoku ile mevcut genlerin yaklaşık %20'sinin çeşitli düzeylerde regüle edildiklerini ortaya koymuştur. *S. cerevisiae* 'da

mikrodizin analiz verileri genomun %25'ten çoğunun ekspresyonunun, ısının 25 °C den, 37 °C ye arttırılmasından 10 dak sonra farklılaştığını göstermiştir [Gasch vd., 2000]. *C. elegans* 'ta 1,197 açık okuma çerçevesinden (ORF) 28' i ısı şoku ile tutarlı bir şekilde uyarılmıştır [Guhathakurta vd., 2002].

Ancak Arke'de ısı şoku proteinlerine ilişkin bilgi oldukça sınırlıdır. Genom dizi analizleri bazı Arke'de, Ökaryot ve Bakteri'ye özgü olan ve üniversal olduğu sanılan bazı HSP'lerin bulunmadığını göstermiştir [Macario ve de Macario, 1999]. Örneğin, Hsp70(DnaK), Hsp40(DnaJ), Hsp60(GroEL) *Crenarchaeota*'da yoktur ama bazı *Euryarchaeota* üyelerinde bulunmaktadır. *Crenarchaeota*'da, ökaryotik TCP1 proteinine benzeyen ve bakterilerde çok korunmuş olan Hsp 60'ın oldukça uzak olan farklı bir sınıfı (termozom) bulunmaktadır [Trent vd., 1991; Trent vd., 2003]. Bazı *Crenarchaeota*'da Hsp60 benzeri şaperonlar ısı ile uyarılabilirken [Kagawa vd., 1995; Kagawa vd., 2003], bazılarında, maya TCP1 proteininde olduğu gibi, düşük ısı ile regüle olmaktadır [Kuo vd., 1997; Somer vd., 2002].

Arkeler de gelişmeleri için optimum olan koşullar dışındaki şartlarda stres tepkisi göstermektedirler. Bakteri ve ökaryotlarla yürütülen ısı şoku çalışmaları ile karşılaştırıldığında, Arke'ye ilişkin rapor edilmiş az sayıda mikrodizin analiz sonucu bulunmaktadır [Schut vd., 2001; Baliga vd., 2002; Zaigler vd., 2003; Shockley vd., 2003; Baliga vd., 2004]. Bunlardan birisinde hipetermofilik bir arke olan *Pyrococcus furiosus*'un kısmi-genom dizini kullanılarak ısı-şoku tepkisi incelenmiştir [Shockley vd., 2003]. Normal gelişme ısısı 90 °C den ısı-şoku ısısı olan 105 °C ye çıkartıldığında mikrodizinde kullanılan 201 genden 55' inin farklı şekilde ekspres edildiği görülmüştür. Bu çalışmada dikkati çeken en önemli reaksiyonlar, proteinleri stabilize etmek üzere uyumlu moleküllerin (di-myo-inisitol-1,1'-fosfat-DIP gibi) sentezinin artması [Santos ve da Costa, 2002] ve proteinlerin kararlılığını daha da arttırmak üzere bazı şaperon genlerinin (Hsp60-benzeri termozom, Hsp20- benzeri küçük ısı şoku proteini ve protein çözülmesi ve tekrar katlanmasında etkin olan VAT proteini) ekspresyon düzeylerinin yükselmesidir. Ancak bu organizmada ısı şoku tepkisinin boyutu hakkında kesin bir sonuç elde edilememiştir.

Diğer taraftan tüm genom mikro dizinleri kullanılarak Arke'de ısı şoku tepkisinin incelendiği sadece üç çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birincisi zorunlu bir anaerob olan hipertermofilik arkeon *A. fulgidus* (83 °C, pH 7.0) ile yürütülmüştür [Rohlin vd., 2005]. Bu çalışmada genomun yaklaşık %14'ünü kapsayan çok sayıda genin mRNA düzeyinin farklılaştığı görülmüştür. Bu genlerin enerji üretimi, amino asit metabolizması ve sinyal iletimi gibi çok çeşitli hücresel süreçte yer aldığı belirtilmiştir. Ayrıca iki özgün transkripsiyon faktörünün de ısı şoku kontrolünde etkin olabileceği ileri sürülmüştür.

İkinci çalışmada ise yine bir hipertermofilik arke olan *S. solfataricus*'un tüm genom oligonükleotit dizini kullanılarak zamana bağlı ısı-şoku tepkisi incelenmiştir [Tachdjian ve

Kelly, 2006]. Bu yaklaşımla, 80 °C olan optimum gelişme sıcaklığı 90 °C'ye çıkartıldığında ilk 5 dakikada genomun üçte birinin (yaklaşık 1000 gen) regülasyonunun farklılaştığı görülmüş ve ısı-şokuna transkripsiyonel tepkinin ani olarak ortaya çıktığı sonucuna varılmıştır. Bu araştırma sonuçları *S. solfataricus* 'da, uyumlu moleküllerin ısı şokunda etkin olmadığını göstermiştir. Diğer taraftan DNA Pol II geni anlatımı azalmıştır. RNA Polimerazın farklı altbirim genlerinin anlatımının azalması ise transkripsiyonda global bir azlamaya işaret etmiştir. Ayrıca *S. solfataricus*'un (85 °C, op. pH 2-4.5) birçok transkripsiyon düzenleyicilerinin ısı-şoku ile başetmede rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Üçüncü araştırmada ise, aneorobik bir arke olan *Methanosarcina barkeri* 'nin (op. 37 °C, op. pH 5.0) tüm genom dizini kullanılarak ısı- şoku ve oksidatif-stres tepkisi incelenmiştir [Zhang vd., 2006]. Bu çalışma sonuçları yaşam için mutlak gerekli genlerin bir çoğunun (DNA replikasyonu, tamir, enerji metabolizması ve protein döngüsüne ilişkin) anlatımının çevresel stresle regüle edildiğini göstermiştir. Ayrıca ısı-şokunu ile HSP70 ve HSP60 genlerinin anlatım düzeylerinin yükselmesi bu şaperonların da ısı-şokunda rolüne işaret etmiştir.

Bu projede ilk defa, “orta derecede termofilik” ve aynı zamanda “asidofilik” bir arkeon olan *Thermoplasma volcanium*'da” tüm genom ekspresyon mikrodizinleri” kullanılarak 3 farklı çevresel stres faktörünün (ısı, pH ve oksidatif stres) global gen ekspresyon profilini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Anılan stres koşullarında bu organizmanın geliştirdiği tepki mekanizmaları hakkında transkriptom düzeyinde literatür için yeni bilgiler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre belirlenen bazı hedef genlerin anlatım düzeylerindeki değişim ayrıca qRT-PCR ile incelenmiştir. Diğer taraftan bu çalışma sonunda ortaya çıkan transkripsiyon profilleri ile, daha önce laboratuvarımızda *T. volcanium* model olarak kullanılarak stres koşullarında qRT-PCR ile yürüttüğümüz çalışmalarımızdan elde ettiğimiz verilerin karşılaştırılması da yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 *Thermoplasma volcanium* Kültürlerine Farklı Stres Uygulamaları

Dört farklı *T. volcanium* kültürleri optimum gelişme koşullarında (60 °C ve pH 2.7) orta-log faza kadar geliştirilmiş ve kültürlerle 60 dak süre ile ayrı ayrı, ısı şoku (70 °C'de), pH stresi (pH 5.0'de) ve oksidatif stres (0.03 mM H₂O₂ eklenerek) uygulanmıştır. Bu sürede strese maruz bırakılmayan kontrol kültürün gelişmesi optimum koşullarda devam etmiştir. Proje önerisinde söz konusu üç stres tipi için sınırlar geniş tutulmasına karşın, daha önce laboratuvarımızda yürüttüğümüz araştırmaların sonuçları doğrultusunda, *T. volcanium*' un gelişiminin tamamen engellenmediği ancak yavaşladığı ve bu arada bazı stres genlerinin

indüklendiği yukarıda belirtilen stres koşulları seçilmiştir. Her bir stres koşulu için ve kontrol kültürler en az 4 tekrarlı olarak geliştirilmiştir.

3.2 *T. volcanium* Kültürlerinden Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany) kullanılarak ve Kit protokolü izlenerek yapılmıştır. RNA kalite kontrolü Agilent 2100 Bioanalyzer Sisteminde (P/N G2943C) Agilent RNA 6000 Nano kit (P/N 5067-1511) ve 2100 Expert software “Prokaryote Total RNA Assay” kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca sonuçlar Picodrop (Picopet 01, Picodrop Ltd. Cambridge, UK) ölçümleri ile de karşılaştırılmıştır.

3.3 MikroDizin Analizleri

Mikrodizin analizleri, 3 farklı stres koşulunda (yani 70 °C, pH 5.0 ve 0.03 mM H₂O₂ konsantrasyonlarında) ve kontrol olarak da optimum koşulda yapılmıştır. Deneyler her koşul için 4 biyolojik tekrarlı olarak yürütülmüştür.

3.3.1 cDNA Sentezi ve Amplifikasyonu ve Floresan İşaretlemesi

Agilent’s Low Input Quick Amp Labeling WT (LIQA WT) Kit Random Primer ile ve “Agilent One-Color RNA Spike-In Kit” kullanılarak yapılmıştır. RNA örnekleri total konsantrasyon 50 ng /2.3 µl olacak şekilde “RNaz içermeyen” ddH₂O ile seyreltilmiş ve seyreltme picodrop ile ölçüm yapılarak kontrol edilmiştir. Tek-Renk RNA Spike-Mix (Agilent One-Color Spike Mix) bir dizi seyreltmeden sonra 2µl, random primer (1 µl) ile karıştırılmış ve buna 2.3 µl total 50 ng RNA örnekleri eklenmiştir. Primer bağlanmasından sonra, hazırlanan cDNA Master Mix kullanılarak cDNA sentezi ve amplifikasyonu Kit protokolü izlenerek yapılmıştır. Daha sonra hazırlanan Transkripsiyon Master Mix kullanılarak Cyanin3 ile işaretlenmiş cRNA (antisense) sentezi yapılmıştır. İşaretlenmiş cRNA örneklerinin saflaştırılması “Qiagen RNeasy Mini Spin Column” kullanılarak Kit protokolüne göre “RNase free” su ile yapılmış ve elüsyondan sonra örneklerin konsantrasyonları NanoDrop ND-100 UV-VIS Spektrofotometer (ver 3.2.1) ile belirlenmiştir. cRNA miktarı (µg) ve spesifik aktivitesi (pmol Cy3/ µg cRNA) önerilen formüllere göre hesaplanmış ve beklenen değerlerle karşılaştırılmıştır.

3.3.2 *T. volcanium* Tüm Genom Ekspresyon Çiplerin Tasarımı

Ekspresyon Oligo Mikrodizinler Agilent (temsilci firma SEM) tarafından talebimize özel olarak tasarlanmıştır (SurePrint HD format (8×60K) –2 adet). Bu çipler (1 slide -inch × 3-inch glass slide) üzerinde aynı anda 8 örnek çalışmak için uygundur. Tasarım için gerekli *Thermoplasma volcanium* GSS1 genom dizisi “Ensembl Data Base”den alınmıştır. Bu

genomda “ORF Finder Tool” ile 150 bp üzerinde 7500 ORF belirlenmiş, prob tasarımı “Agilent eArray Tool” kullanılarak yapılmıştır.

Başka bölgelerle eşleşen problemlerin yeniden tasarımı için “base composition” yöntemi ile tasarım denenmiş ve neticede optimum kriterlere uygun 7458 prob tasarlanmıştır. Slide'lara her prob 8 kopya olarak yerleştirilmiş olup, tasarımda ayrıca 1319 “Agilent Standart Array Kontrol Probu” da kullanılmıştır.

3.3.3 Agilent Temsilci Firma Desteği ile Yapılan Çalışmalar: Hibridizasyon, Tarama ve Çip Sinyal Analizleri

Bu çalışmalar Agilent temsilci firma'nın (SEM) sağladığı alt yapı kullanılarak yapılmıştır. Hibridizasyon öncesi örneklerinin hazırlanması / fragmentasyonu “Low Input Quick Amp Labeling WT (LIQA WT)” protokolüne göre yapılmıştır. cDNA'ların, “ekspresyon dizin” lerle Hibridizasyonu ve sonrası yıkamalar, “Agilent Microarray Hybridization Chamber (Agilent Microarray Hybridization Chamber Kit -G2534A)” kullanılarak, ilgili kullanıcı klavuzu doğrultusunda yürütülmüştür. Hibridizasyon 65 °C de 17 saat sürmüştür.

Slayt'ların taraması “Agilent G2565CA Microarray Scanner System” ile yapılmış ve ham mikrodizin görüntüleri elde edilmiştir. Daha sonra bu tarama görüntülerinin analizi ve “prob feature” eldesi (.tif görüntüsü) “Agilent Feature Extraction” yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

3.3.4 Mikrodizin Sonuçların Analizi

Veri görüntüleme ve analizi “Agilent's Genespring GX Ver. 12.6 yazılımı (demo) kullanılarak yapılmıştır.

3.4 Nicel Gerçek Zamanlı PCR (qRT-PCR)

Ekspresyon düzeyleri yükselen ya da düşen bazı hedef genler seçilip qRT-PCR ile stres koşullarında ekspresyon profillerindeki değişim kontrole görelilik olarak çalışılmıştır. Bu çalışmalarda cDNA sentezi için mikro dizin analizleri için hazırlanan total RNA örnekleri kullanılmıştır.

3.4.1 Tümlayıcı DNA (cDNA) Sentezi

Aynı miktarlarda kontrol ve stres RNA örneklerinden cDNA üretimi M-MuLV Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics GmbH) ile enzim protokolünde belirtildiği şekilde ve seçilen genlere özgü tasarlanan geri primerler (RP) kullanılarak yapılmıştır. Gerçek zamanlı PCR deneylerinde, mikrodizilim çalışmaları için kontrol ve farklı stres koşullarında izole edilen RNA örnekleri kullanılmıştır. Primerler, TIB, MOLBIOL, Syntheselabor GmbH tarafından sentezlenmiştir. cDNA reaksiyon karışımı toplam 25 µl hacim içinde :

0.4 µM geri primer, 400 µM dNTP karışımı, 1 µg RNA, 5 µl MMuLV Reverse Transkriptaz tamponu ve 1 µl MMuLV Reverse Transkriptaz içerecek şekilde hazırlanmıştır.

3.4.2 qRT- PCR

Sentezlenen cDNA örnekleri kalıp olarak kullanılarak, LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit'i (Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile ve Kit protokolü izlenerek, LightCycler 1.5 (Roche) cihazında yapılmıştır. Kullanılan ileri (FP) ve geri primerler (RP) seçilen TVN0382, TVN0947, TVN0486 ve TVN1145 genlerine özgü tasarlanmış ve TIB, MOLBIOL, Syntheselabor GmbH tarafından sentezlenmiştir. Kit protokolü daha önce laboratuvarımızda bazı ısı şoku genlerinin ekspresyon çalışmaları için optimize edilmiştir. Bu deneylerde izlenen başlıca adımlar aşağıda verilmiştir:

Pre inkübasyon: 95 °C 15 dak

Amplifikasyon:

Denatürasyon 95 °C 10 san

Hibridizasyon 60 °C 10 san

Sentez 72 °C 10 san

"Melting" eğrisi:

Denatürasyon 95 °C 0 san

Hibridizasyon 65 °C 15 san

"Melting" 72 °C 10 san

Soğuma: 40 °C 30 san

qRT-PCR sonuçlarının validasyonu denatürasyon eğrisi ya da "Tm analizi" ile yapılmıştır. Her bir RNA örneği için deneyler optimize edilmiş koşullarda en az 2-3 kez tekrarlanmıştır.

RT-PCR sonuçları, bir göreceli kantitasyon metodu olan 2- $\Delta\Delta T$ yönteminin bir varyasyonu kullanılarak analiz edilmiştir [Livak ve Schmittgen, 2001]. Bu yöntemle kontrollere görece olarak testlerde gen ekspresyon düzeyinde kaç kat değişiklik meydana geldiği bulunmuş ve sonuçlar bar grafik olarak gösterilmiştir. Sonuçlar en az 3 biyolojik tekrarın aritmetik ortalaması ve standart sapma (yani ortalama \pm SD) olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 RNA Kalite Kontrolü

Her 3 stres koşulu (ısı-şoku, pH ve oksidatif stress) ve kontrol (optimum koşullar) için kültürler en az 4 biyolojik tekrarlı olarak yürütülmüş ve bunların her birinden >3 tane paralel RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyonu yapılan toplam 49 RNA örneğinin konsantrasyon ve kalite değerlendirmesi önce Picodrop ölçümleri ile ve agaroz jel elektroforezi (spesifik olarak RNA için denatürasyon koşullarında) ile değerlendirilmiştir. Daha sonra, bu RNA örneklerinin kalite

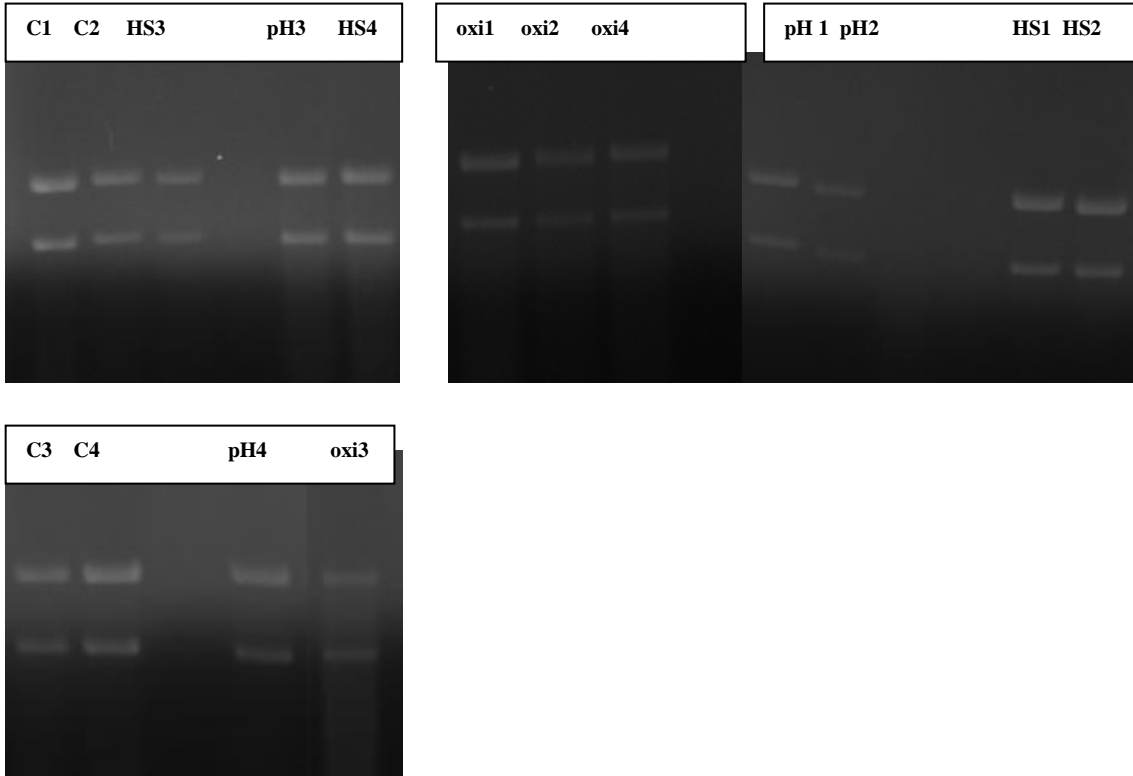
analizi Agilent 2100 Bioanalyzer System (P/N G2943C) ile Agilent RNA 6000 Nano kit (P/N 5067-1511) kullanılarak ve 2100 Expert software yardımı ile yapılmıştır: Total RNA, RNA bütünlük sayısı (RIN-RNA Integrity Number), elektrogram sonuçları, RNA konsantrasyonu, A_{260}/A_{230} , A_{260}/A_{280} oranları dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Tablo 1). Her bir stres koşulu ve kontrol için 4 er tane olmak üzere toplam 16 RNA örneği, anılan ölçüm değerlerinin analiz için uygunluğu baz alınarak mikrodizin analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

Tablo 1. RNA örneklerinin konsantrasyon ölçümleri ve kalite analizi

RNA Örnek No	RNA Örnek adı	Konsant. Bioanalyzer (ng/ μ l)	Konsant. Pico drop (ng/ μ l)	RIN	A_{260}/A_{280}	A_{260}/A_{230}
1	C1	360	382,1	9,3	2,059	2,48
2*	C2	201	332,5	N/A	2,059	1,958
3	C3	279	305	8.8	2,152	2.170
4	C4	46	139	10	2,13	1,578
5*	HS1	138	170,8	N/A	2,027	1,801
6	HS2	121	192,4	9,9	1,961	1,752
7	HS3	233	205,6	9,6	2,144	1,787
12	HS4	447	400,1	8,5	2,083	2,330
8	pH1	69	139,1	10	2,027	1,203
9	pH2	42	94,5	9,9	2,073	1,697
10	pH3	440	370,2	8,7	2,072	2,068
11*	pH4	186	259,6	8,1	2,175	1,387
13	Oxi 1	197	215,8	8,7	2,096	1,990
14	Oxi2	185	233,6	7,2	2,169	1,980
16	Oxi3	404	456	9.1	2,071	1,821
15*	Oxi4	248	245,9	9,2	2,077	1,923

*veri analizinde kullanılmayan örnekler.

Bu seçilen RNA örneklerinin RIN değerleri (RNA Integrity Number) ≥ 8.7 'dir. Bu değerler parçalanmanın olmadığı ya da minimum düzeyde olduğunu ve RNA'nın bütünlüğünü koruduğunu göstermektedir. Agaroz jel elektroforez görüntüleri ve Bioanalyzer Elektrogram sonuçları da bunu desteklemektedir. Bu resimlerde genellikle 18S ve 28S ribosomal RNA'ları temsil eden 2 farklı bant görülmüştür. Çok az miktarda da 5S RNA bandı gözlenmiştir. Şekil 1 ve 2 'de izole edilen RNA örneklerinin sırası ile jel elektroforez görüntüleri ve Bioanalyzer Elektrogram sonuçları görülmektedir.

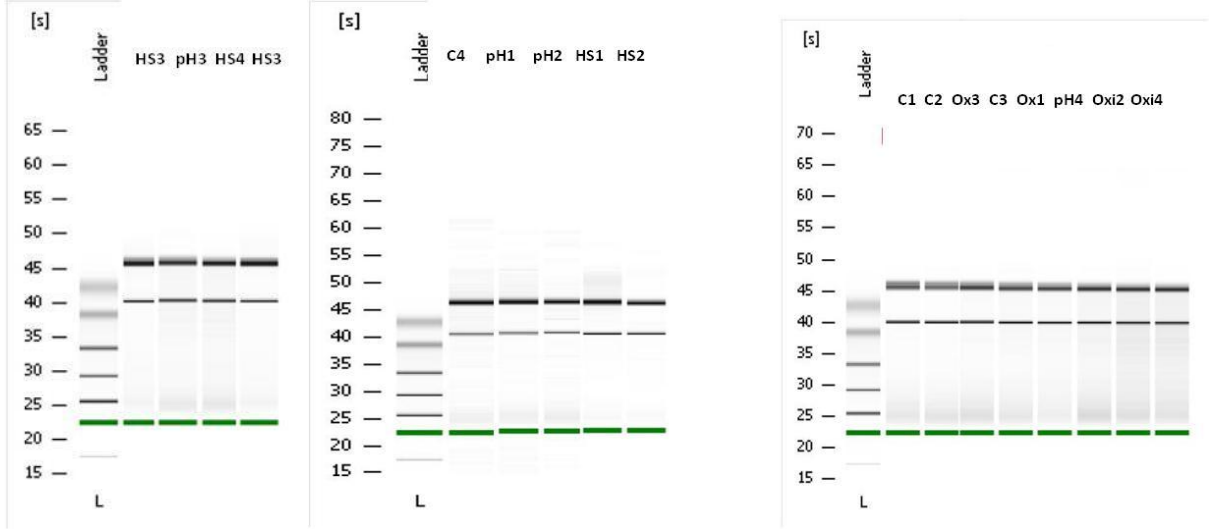


Şekil 1. Mikrodizin analizi için seçilen 16 RNA örneğinin RNA örneğinin jel elektroforez görüntüleri.

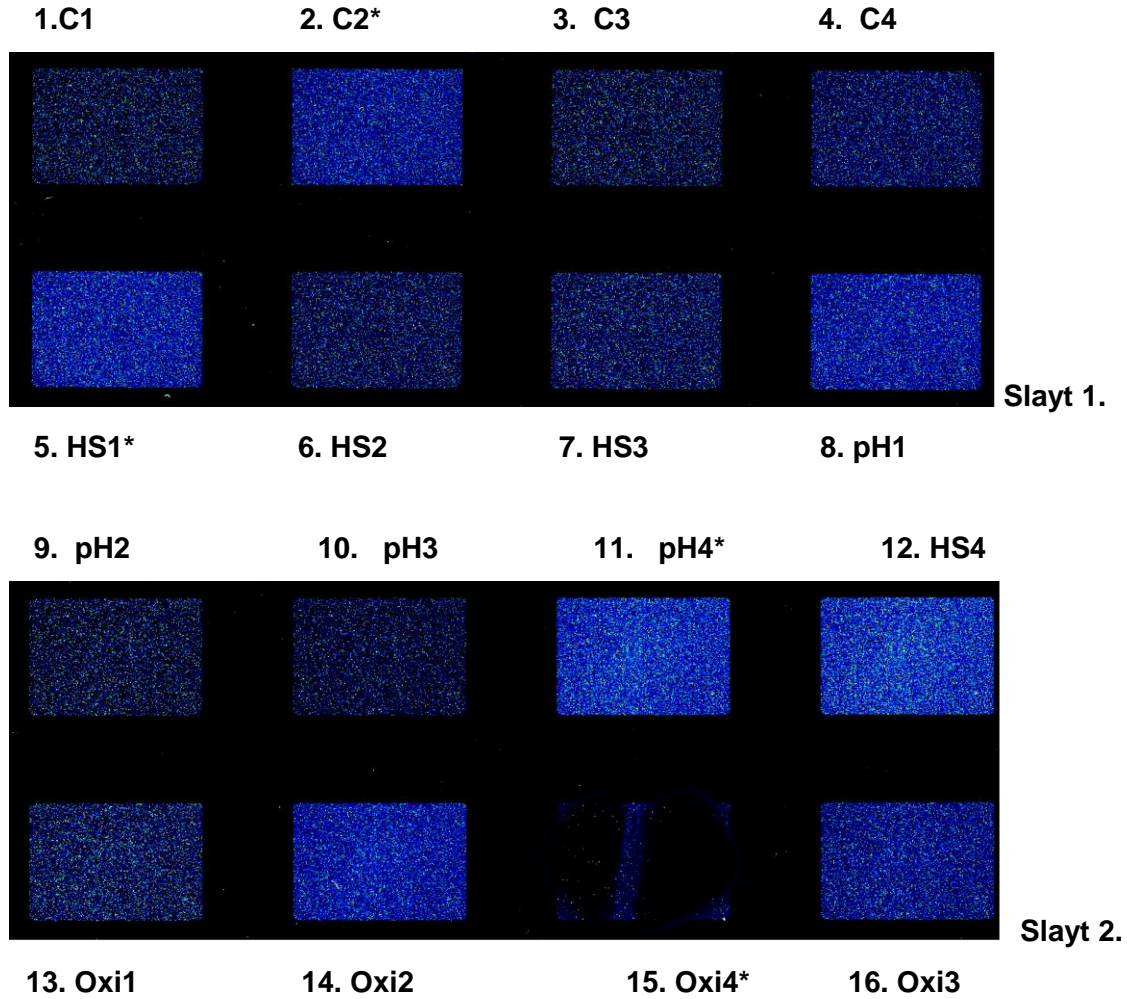
Picodrop ölçümleri ile RNA örnekleri için bulunan RNA konsantrasyonları, Bioanalyzer ile belirlenen konsantrasyon verileri ile uyumludur (Tablo 1) A_{260}/A_{280} oranının 1.8 ile 2.0 ve A_{260}/A_{230} oranının >2.0 olması örneklerin protein, karbonhidrat, organik solvent gibi kontaminantlardan arınmış olduğuna işaret etmektedir.

4.2 Mikrodizin Görüntüleri

Toplam 16 RNA örneğinden elde edilen cRNA'lar prob olarak kullanılarak iki slayt'da bulunan mikrodizinler ile yürütülen hibritleme çalışmaları sonunda elde edilen dizin görüntüleri Şekil 3'deki gibidir.



Şekil 2 Mikrodizin analizi için seçilen 16 RNA örneğinin Bioanalyzer elektrogram sonuçları.

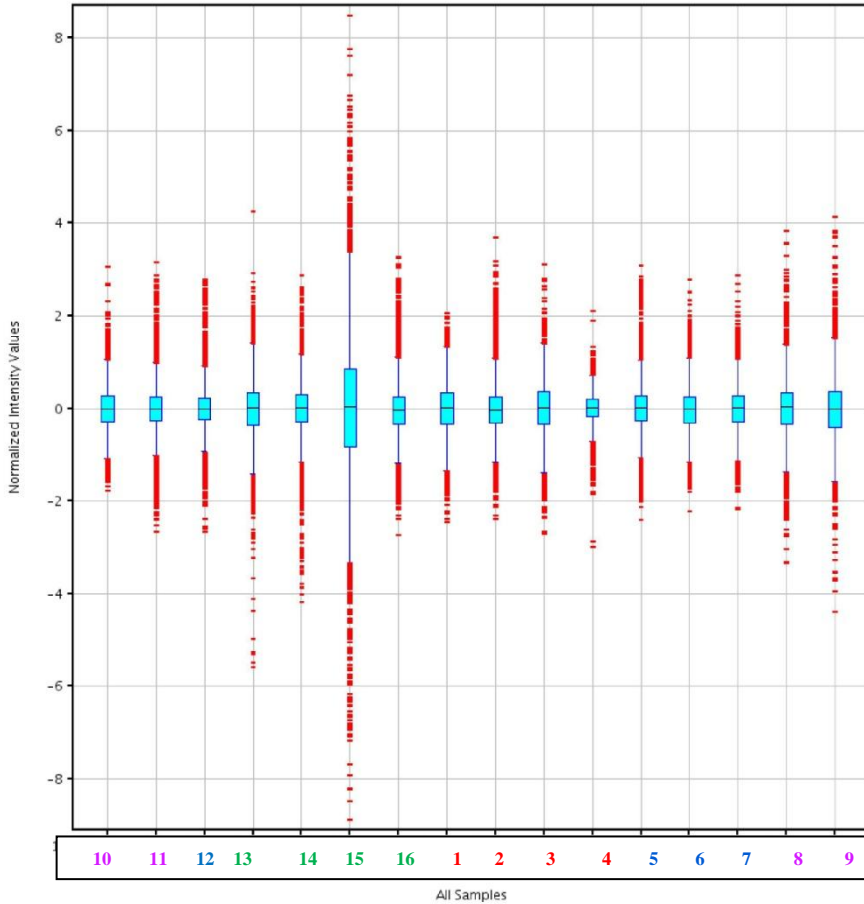


Şekil 3 Dizin görüntüleri. Dizin numara ve isimleri slide üzerinde ve altında verilmiştir.

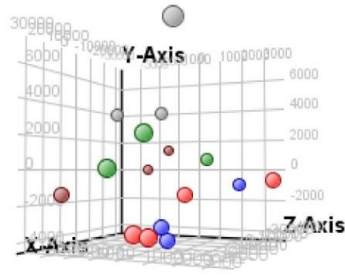
* bu dizinler very analizine alınmamıştır. 15 nolu dizinde hibridizasyon sırasında problem olmuştur.

4.3 Normalizasyon

Quantile normalizasyon ve sonrasında yapılan veri analizi için GeneSpring GX Version 12.6 yazılım programı (Demo Version) kullanılmıştır. Her bir mikrodizin deneyi için ekspresyon değerlerinin dağılımını aynı bir hedef dağılımda gösteren “quantile” normalizasyon Terry Speed grubunun RMA yazılımında kullanılan yaklaşımdır. Dizinde herbirisi için değerler büyüklüğüne göre sıralandıktan sonra, her pozisyon için orta değer alınmaktadır. Bu çalışmaya ait normalizasyon sonucu Whisker Plot ile gösterilmiştir (Şekil 4). Ham verinin “quantile” normalizasyonundan sonra, korelasyon katsayısı, 3D-korelasyon diyagramı (Şekil 5) ve hiyerarşik kümeleme sonuçları dikkate alınarak 16 örnek içinden 12 si (her bir koşul için 3er tane) daha ileri veri analizi için seçilmiştir. Tüm örneklere ait 3D-korelasyon diyagramı, hiyerarşik kümelemeyi (tekrarların ortlaması alınmadan) gösteren “Heat –Map” (Şekil 6) aşağıda verilmiştir.

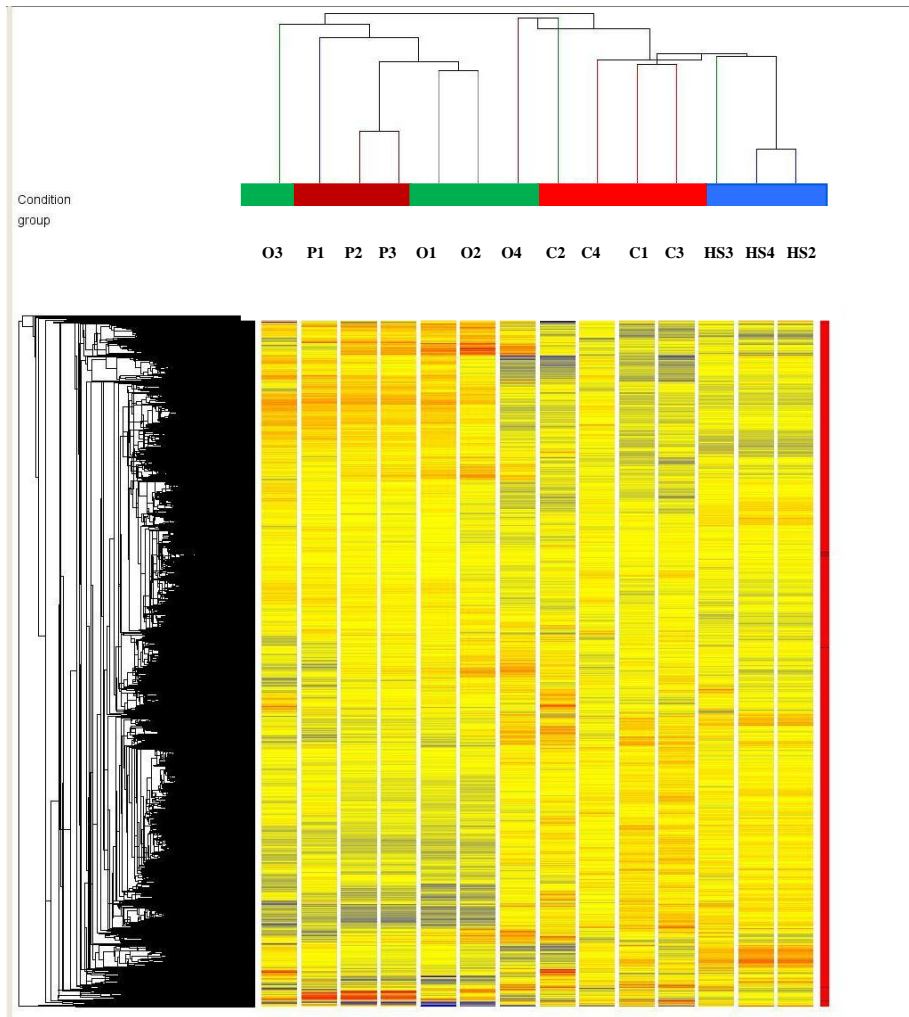


Şekil 4. Whisker plot: Dizin numaraları: **kırmızı:** kontrol (1-4), **mavi:** ısı-şoku(5-6,12), **eflatun:** pH stres (8-11), **yeşil:** oksidatif stres (13-16).



X-Axis Component 1 (71.64%) Y-Axis Component 2 (10.07%) Z-Axis Component 3 (6.01%)

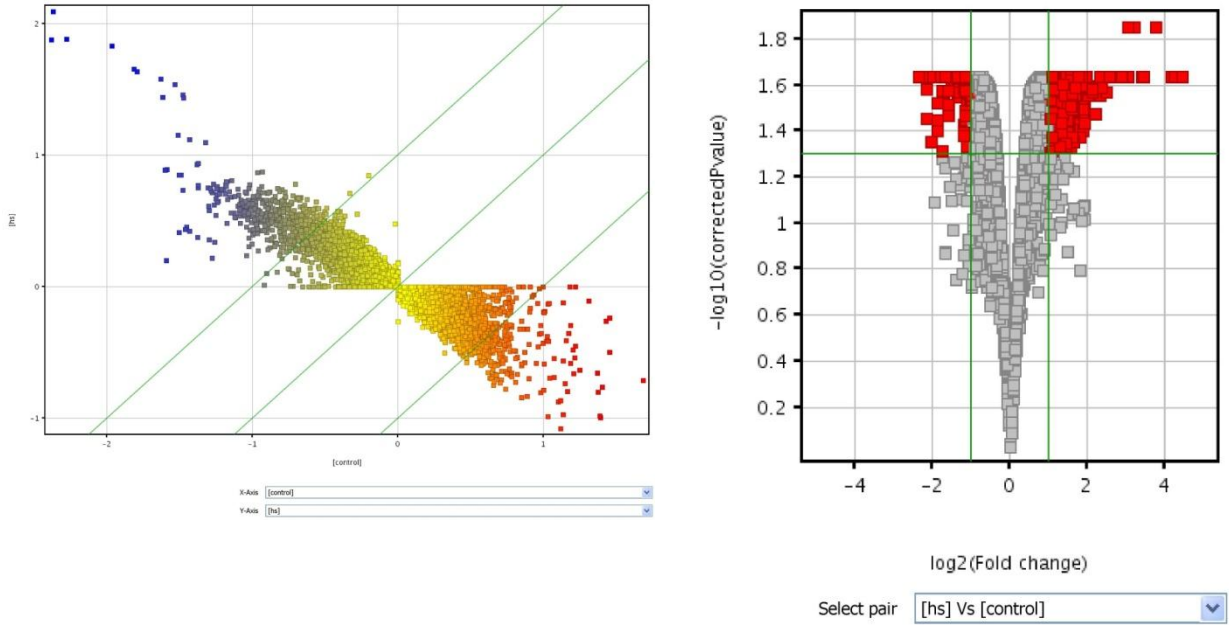
Şekil 5. 3D korelasyon grafiği



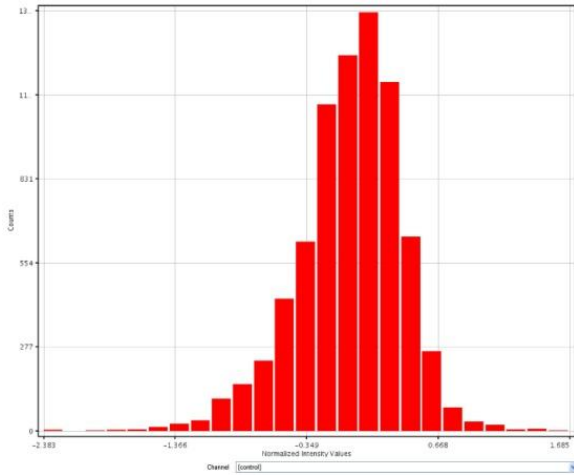
Şekil 6. Hiyarşik kümelemeyi gösteren “heat- map”. — kontrol (C1-C4), — ısı-şoku (H2-H4), — pH stres (P1-P3), — oksidatif stres (O1-O4).

İstatistiksel olarak önemli ölçüde (two-tailed student’s t-test < 0.05 , > 2 kat) farklılaşmış ekspresyon gösteren mRNA’lar “Volcano Plot” filtreleme ile belirlenmiştir. 10 tabanına göre p değerlerinin negatif logaritması ($-\log_{10}$) y ekseninde, kat-değişim değerlerinin (FC)

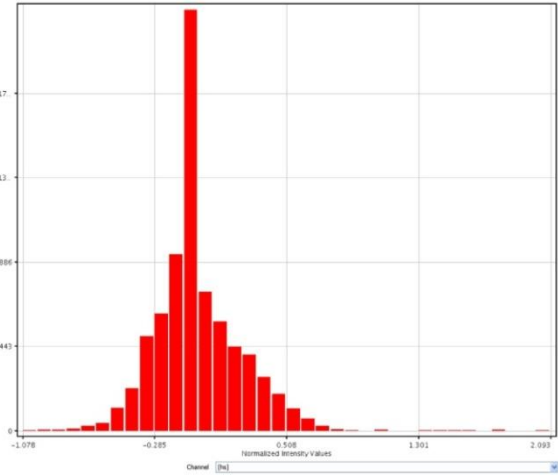
logaritması ise x-ekseninde yer almaktadır. Ayrıca saçılım eğrileri de elde edilmiştir. Test ve Kontrol gruplarına ait Volcano ve Saçılım Eğrileri Şekil 7-9 da görülmektedir.



A.



B.

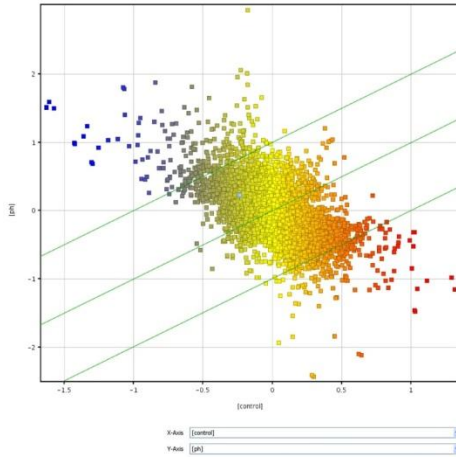


C. (kontrol)

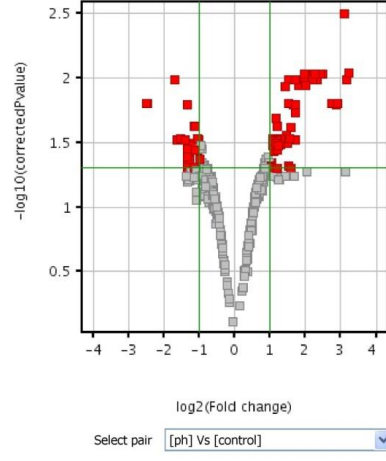
(Isı stresi)

Şekil 7. Isı şoku örneklerinin analizi.

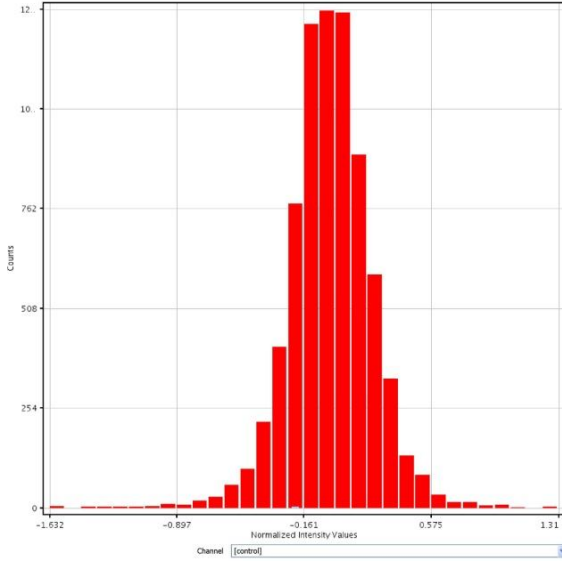
Isı şoku koşuluna ait örneklerin (HS2, HS3, HS4) anlatımının kontrole (C1, C3, C4) göreli olarak mikrodizin analiz sonuçları: A. Saçılım eğrisi, B. Volcano eğrisi (yatay yeşil çizgi $p = 0.05$ olduğu yeri göstermekte olup, üzerinde kalan noktaların p değerleri < 0.05 dir. Dikey çizgiler ise ≥ 2 -kat değişim sınırlarını göstermektedir, sol üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar önemli ölçüde ekspresyonu azalan, sağ üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar ise önemli ölçüde ekspresyonu artan genleri temsil etmektedir). C. Kontrol ve ısı şoku örneklerine ait histogramlar.



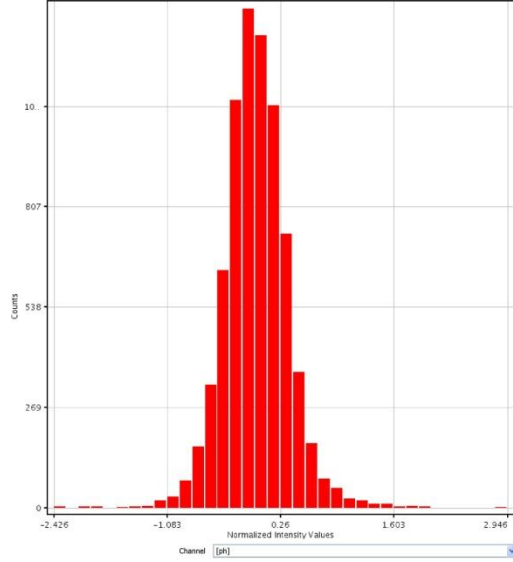
A.



B.



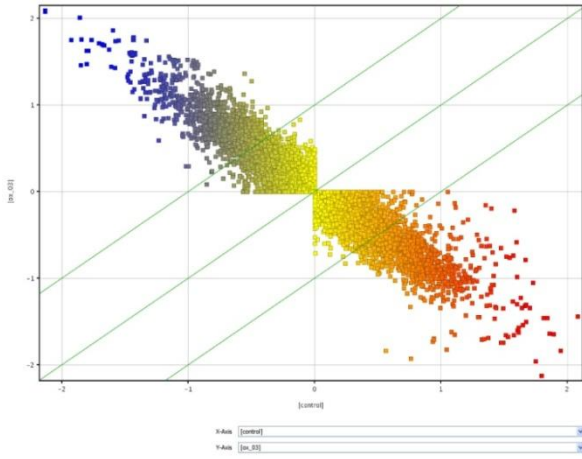
C. (kontrol)



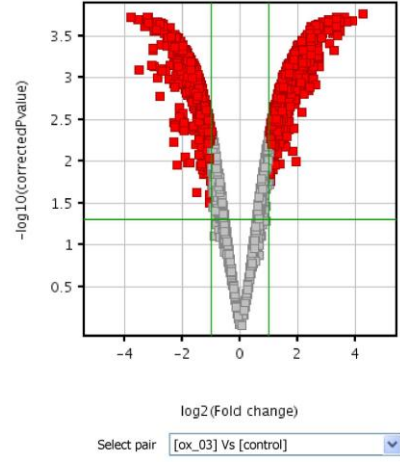
(pH stres)

Şekil 8. pH stress örneklerinin analizi.

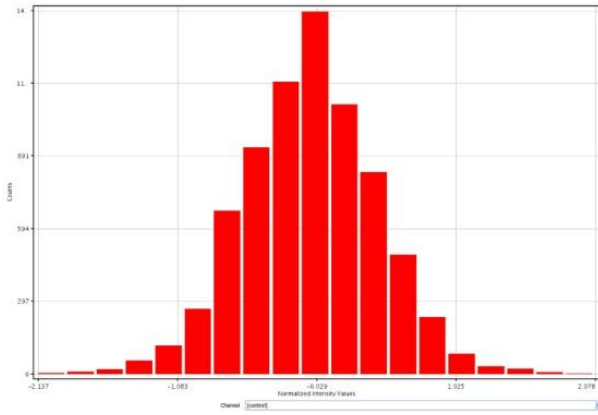
pH stres koşuluna ait örneklerin (pH1, pH2, pH3) anlatımının kontrole (C1, C3, C4) göreli olarak mikrodizin analiz sonuçları: A. Şaçılım eğrisi, B. Volcano eğrisi (yatay yeşil çizgi $p=0.05$ olduğu yeri göstermekte olup, üzerinde kalan noktaların p değerleri <0.05 dir. Dikey çizgiler ise ≥ 2 -kat değişim sınırlarını göstermektedir, sol üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar önemli ölçüde ekspresyonu azalan, sağ üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar ise önemli ölçüde ekspresyonu artan genleri temsil etmektedir. C. Kontrol ve pH stres örneklerine ait histogramlar



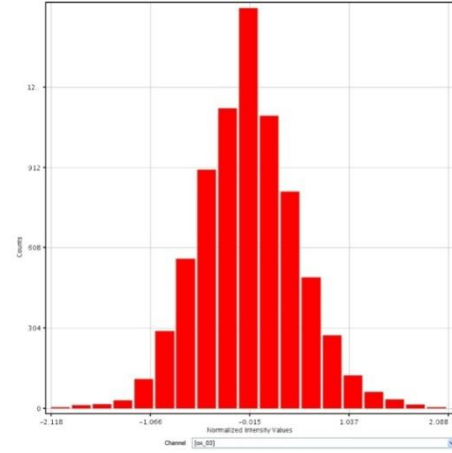
A.



B.



C. (kontrol)



(oksidatif stres)

Şekil 9. Oksidatif stres örneklerinin analizi.

Oksidatif stress koşuluna (O1, O2, O3) ait örneklerin anlatımının kontrole (C1, C3, C4) görel olarak mikrodizin analiz sonuçları: A. Şaçılım eğrisi, B. Volcano eğrisi (yatay yeşil çizgi $p = 0.05$ olduğu yeri göstermekte olup, üzerinde kalan noktaların p değerleri < 0.05 dir. Dikey çizgiler ise ≥ 2 -kat değişim sınırlarını göstermektedir, sol üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar önemli ölçüde ekspresyonu azalan, sağ üstte yeşil çizgilerin sınırladığı kırmızı noktalar ise önemli ölçüde ekspresyonu artan genleri temsil etmektedir. C. Kontrol ve oksidatif stres örneklerine ait histogramlar

4.4 Mikrodizin Veri Analiz Sonuçları

4.4.1 Isı Şokunun *T. volcanium*'da Gen Anlatımına Etkisi

Analiz sonuçlarına göre *T. volcanium* hücreleri 1 saat süre ile 70°C 'de ısı şokuna tabi tutulduklarında test edilen toplam 7458 ORF'ten 663 tanesinin ekspresyonunun kontrole

göre farklılık gösterdiği (Mod. T-Test p (Corr) cut-off = 0,05; kat değişim (FC) \geq 2,0) bunların 475 tanesinin anlatımının arttığı, 188 tanesinin ise anlatımının azaldığı bulunmuştur. Bu sonuçlara ilişkin Saçılım Eğrisi ve “Volcano” grafiği Şekil 7’de verilmektedir.

Toplam 7458 ORF içinde 1474 tane ekspres edilen genin anotasyonu yani tanımlaması yapılmış olup veri tabanlarında (NCBI, KEGG gibi) bulunmaktadır. Anotasyonu yapılmış 1474 ORF’den ısı şokuna tepki olarak 70 (% 4.7) tanesinin ekspresyonu istatistiksel olarak kontrolden önemli ölçüde (p – (Corr) cut-off = 0,05; FC \geq 2,0) farklılık göstermiştir. Bunlardan 33 tanesinin ekspresyon düzeyi artmış, 37 tanesinin ise ekspresyonu azalmıştır. Ekspresyonu değişiklik gösteren (indüklenen ve ya baskılanan) 70 gen listesi Ek 1 de verilmiştir.

Fonksiyonlarına göre kategorize edildiğinde ekspresyon farklılaşması gösteren genlerin hücresel işlevlerinin çok geniş bir yelpazede dağıldığı görülmektedir. Artan ya da azalan mRNA düzeyine göre en fazla etkilenen kategoriler ısı şoku proteinleri, enerji üretimi ve çevrimi ile ilgili proteinler, inorganik iyon ve amino asit taşınması ve metabolizmasına ilişkin proteinler, genel membran transport sistemleri, hücre hareketine ilişkin proteinler, hücre/membranı sentezi ile ilgili proteinler ile replikasyon ve rekombinasyonda rol alan proteinlerdir. Bunlara ek olarak çeşitli hidrolaz enzimleri ile yağ metabolizması ve detoksifikasyon ile ilgili genlerin anlatımı da indüklenmiştir. Ayrıca bazı “fonksiyonu bilinmeyen” ve “hipotetik” proteinlerin de transkripsiyonunun önemli ölçüde değiştiği görülmüştür.

Mikro dizin analizi sonuçlarına göre GroEL/ES (termozom) alt birim genlerinin (TVN0507, 2.6-kat ve TVN01128, 2.7-kat) ve Hsp70’ye ilişkin moleküler şaperon GrpE geninin (TVN0489, 2.5-kat) ekspresyonundaki artışın önemli olması *T. volcanium*’da ısı şoku tepkisinde bu şaperon sistemlerinin etkin rol oynadığına işaret etmektedir. Söz konusu moleküler şaperon sistemleri protein sentezinin ilk aşamalarında sentezlenmekte olan proteinlerin doğru katlanmalarına yardımcı olduğu gibi, ayrıca çeşitli stres etkisi, mutasyon, sentez hataları gibi nedenlerle denatüre olan proteinlerin yeniden katlanmalarını sağlayarak agregasyonlarını önlemektedirler.

Daha düşük düzeyde (1.5-2.0-kat) olmakla birlikte ekspresyon düzeyleri artan ısı şoku proteinleri arasında TVN0487 (Moleküler şaperone DnaJ, 1.8–kat), TVN0488 (Moleküler şaperon DnaK, 1.7-kat), TVN0984 (Moleküler şaperon Hsp20 benzeri sHSP, 1.7–kat), TVN0947 (AAA-ATPaz, 1.6-kat) bulunmaktadır. Bu sonuçlar genel olarak birçok organizmada global ısı şoku tepkisinde yer aldığı bilinen proteinlerin *Tpv* için de ısı şoku tepkisinde önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Hipertermofilik arke *Archaeoglobus fulgidus* ve *Pyrococcus furiosus* ’un ısı şoku tepkisinin global gen ekspresyonuna etkisi

üzerine yürütülen çalışmaların sonuçları da bu bulgularla uyumludur [Shockley vd.,2003; Rohlin vd., 2005].

Diğer taraftan ATP-ye bağımlı olmayan ko-şaperon olan prefoldinin alt birim genleri (TVN0351 ve TVN1213) anlatımının kontrolden önemli ölçüde farklı olmaması *P. furiosus* [Shockley vd.,2003] ve *Archaeoglobus fulgidus* [Rohlin vd., 2005] ile yapılan ısı şoku çalışmalarından elde edilen ile uyumludur

Hernekadar ATP bağımlı proteazlar *Trp*'de çalıştığımız koşullarda ısı şokundan önemli ölçüde etkilenmemişlerse de metal-bağımlı karboksipeptidaz (TVN0740, 1.7-kat) ve membrana bağlı bir peptidaz olan ısı şoku proteini X (Htp X) (TVN0 1.8-kat) indüklenen proteolitik enzimlerdir. Benzer sonuç *P. furiosus*'da ısı şoku tepkisi çalışmalarında da gözlenmiştir [Shockley vd., 2003].

Anlatımı azalan genlerden bir kısmı COG sınıflamasına göre transkripsiyondan (transkripsiyon faktörleri gibi) ve translasyondan (örneğin, tRNA CCA-pirofosforilaz, TVN0117, 1.7-kat; tRNA (guanin 37-N1)-metiltransferaz, TVN0815, 1.5-fold; GTPaz, TVN0001, 1.7-kat) sorumlu genler kategorisinde yer almaktadır. Bu sonuçlar daha önceki raporlarla uyumlu olarak ısı stresi altında transkripsiyon ve protein sentezinin genel olarak engellenmesi sonuçları ile uyumludur [Cheng ,2009]. Diğer taraftan ısı şoku sürecinde görülen global enerji azalması, enerji üretimi ve dönüşümü ile ilgili genlerin ekspresyonlarının azalmasının bir sonucudur. Buna bağlı olarak enerji gerektiren süreçlere ilişkin genlerin, örneğin hücre hareketi (flagellin genleri gibi), protein trafiği/salımı (sinyal tanıma parçasının bir komponenti olan 7SL RNA geni) hücre duvarı/membranı sentezine ilişkin genlerin anlatımının azalması da beklenen bir sonuçtur. Diğer taraftan aminoasit metabolizması, lipid ve karbonhidrat metabolizmasına ilişkin genlerin anlatım düzeyinin artması termal stres altında metabolik adaptasyonunun önemini göstermektedir. Benzer sonuç *A. fulgidus*'un ısı tepkisinde de elde edilmiştir [Rohlin vd., 2005]. Lipid metabolizması ve modifikasyonu ile ilgili hgen anlatımının artması (örneğin asil-KoA dehidrogenaz, TVN0670, 2.03–kat, uzun zincir yağ asit ligaz , TVN 109, 2.6-kat) ısı tepkisi ile hücrede ve membranda lipid kompozisyonunu değiştirmek yolu ile yüksek ısının etkisinden korunma mekanizması olabilir (örneğin membran akışkanlığını azaltmak gibi).

Özellikle karbonhidrat metabolizması ile ilgili olarak ABC-tip şeker transporter (TVN0206, 2.4-kat) proteininin düzeyinin artması ısı stresi sırasında hücrede enerji dengesini korumak için ATP'ye olan gereksinimin bir gösteregesi olabilir. Sıcaklık artışının çok sayıda transport protein geninin (lipit, amino asit, iyon transport, membran biogenezi ve hücre hareketi ile ilgili proteinler gibi) anlatımın farklılaşması *T. volcanium*'da ısı şoku tepkisinde hücre dışı stres mekanizmalarının kritik rolleri olabileceğini göstermektedir.

4.4.2 pH Stresinin *T. volcanium*'da Gen Anlatımına Etkisi

T. volcanium termoasidofilik bir arke olup optimum olarak pH 2.0-2.7 aralığında aerobik olarak gelişmektedir. *Tpv* hücreleri normal koşullarda pH2.0 ile 2.7 arasında geliştiği için sitozolik pH'yı nötral sınırdaki tutmak için membrandan proton atımına dayanan bir pH gradienti oluşturmaktadır. Mikrodizin analizi ile artan pH koşullarında (pH 5.0) hangi proteinlerin sentezinin etkilendiği (indüklendiği ya da baskılandığı) bulunmuştur. Ekspresyon oranları ≥ 2 kat (mod. T-test $p < 0.05$) değişim gösteren genlerin listesi Ek 2 de verilmiştir. Stres koşulu olarak pH daki artışı ile (pH 2.7 den 5.0'e) test grubunda kontrol grubuna göre anlatımı artan gen sayısı anlatımı azalan gen sayısından daha fazla bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, toplam 7458 ORF'in 97 tanesinin anlatımının önemli ölçüde değiştiği, bunlardan 65 tanesinin anlatım düzeyi artarken, 32 tanesinin anlatımının kontrole göre önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Bu ORF'lerden anotasyonu yapılmış *T. volcanium* genleri ile örtüşen 1474 tanesinin içinde 48 tanesinin (%3) anlatımı önemli ölçüde (Mod. T-Test p (Corr) cut-off = 0,05; kat değişim (FC) $\geq 2,0$) farklılaşmış, bunların da 32 tanesinin (%67) ekspresyon düzeyi yükselirken 16 tanesinin (%33) düşmüştür. Transkripsiyonu kontrol gruplarına göre test (pH 5.0) gruplarında önemli ölçüde farklılaşmış genleri gösteren "Volcano" eğrisi ve ortalama prob sinyal yoğunluğunun dağılımını gösteren saçılım grafiği Şekil 8'de görülmektedir. Artan pH ile en fazla regüle olan genlerin dahil olduğu başlıca fonksiyonel kategoriler, translasyon, karbonhidrat taşınımı ve metabolizması, inorganik iyon ve aminoasit taşınması ve metabolizmasıdır. Birçok membran proteinin, özellikle çeşitli taşıma proteinlerinin sentezinin pH'ya bağımlı olması, hücre dışı pH değişikliği esas olarak membrana ilişkin fonksiyonları etkileyeceği için şaşırtıcı değildir.

Transkripsiyon ve translasyonla ilgili genler global bir stres tepkisi olarak kuvvetli bir şekilde baskılanmıştır: örneğin, TVN1447, transkripsiyon regülatörü, 2.9-kat; DNA-yönlendirmeli RNA polimeraz ait altbirim M, TVN0742, 1.8-fold; TVN0761 lösil t-RNA sentaz, 2.2-kat; TVN1085, GTPaz, 2.1-kat; TVN0401 GTPaz, 2.1-kat; TVN0555, 30S ribozomal protein S 8, 2.1-kat; TVN1247, 30S ribozomal protein S 3,2-kat). Diğer taraftan, inorganik iyon transportu (TVN0123, fosfat ABC transporter permeaz, 8-kat; TVN1319, demir ile regüle edilen membran bileşeni, 4.7-kat; TVN 1390, ABC transporterin demir ile regüle edilen membran bileşeni, 3.9-kat; Fe-S redüktaz (Fe-S oksidoredüktaz), TVN0932, 2.7-kat) ve lipid metabolizmasına ait genler (lipoat protein ligazA, TVN0990, 3.3-kat; lipoat protein ligaz A, TVN0991, 2.1-kat,) indüklenmiştir. Bugüne dek termoasidofilik arkede pH stresine bağlı gen regülasyonu ile ilgili bir rapor yoktur. Ancak bakterilerde pH değişikliğine adaptasyonun proton transportu ve membran geçirgenliğini regüle ederek sağlandığına ilişkin bulguları içeren çalışmalar bulunmaktadır [Mayer vd., 2008] ve bizim bulgularımızla uyumludur.

Isı şoku proteinleri genlerinin transkripsiyon düzeyinde önemli bir değişim görülmezken,

protein translokasyonunda (TVN0992, SRP protein 54, 2.1-kat; TVN1447, protein translokaz alt birim Sss1, 2.1-kat) ve ATP'ye bağımlı proteaz LON, TVN0494, 2.2-kat) rol alan protein genlerinin ekspresyonu artmıştır. Bu durum denatüre olmuş proteinlerin yıkımı ve uzaklaştırılmasına işaret etmektedir.

Tpv 'de pH stresine karşı gen ekspresyonları artış eğilim gösteren proteinler içinde membran proteinleri, iyon ve aminoasit transporterlerin önemli yer tutması bunların mevcut stres altında hücrede pH homeostazını sağlamada etkili olduklarını göstermektedir. Özellikle antiporterelerin *B. subtilis*'te alkali stres durumunda pH homeostazını, özellikle iyon denegesini sağlamada önemli olduğu gösterilmiştir [Kaczowka ve Maupin-Furlow, 2003].

4.4.3 Oksidatif Stresin *T. volcanium*'da Gen Anlatımına Etkisi

T. volcanium hücreleri 0.03 mM H₂O₂ ye 1 saat maruz kaldığında mRNA düzeylerinde kontrol grubuna göre değişme mikrodizin analizi ile incelenmiştir. H₂O₂ uygulaması sonunda toplam 7458 ORF'den 2193 tanesinin anlatımı kontrol grubuna göre önemli ölçüde (Mod. T-Test p (Corr) cut-off = 0,05; kat değişim (FC) >= 2,0) değişmiştir. Anlatım düzeyi değişen bu genlerden 1078 tanesi yüksek düzeyde ekspres olurken, 1115 tanesinin anlatım düzeyi kontrole göre düşmüştür. Toplam ORF içinde *T. volcanium*'un ekspres edilen genlerine karşılık gelen 1474 geninin 452 tanesinin (%30) anlatımının farklılaşmıştır. Bunlardan, 113 tanesinin (%25) anlatımı artarken, 339 tanesinin (%75) anlatım düzeyi kontrole göre önemli ölçüde azalmıştır. Anlatımları önemli ölçüde değişen genlerin listesi Ek 3'de verilmiştir. Transkripsiyonu kontrol gruplarına göre test (0.03 mM H₂O₂) gruplarında önemli ölçüde farklılaşmış genleri gösteren "Volcano" eğrisi ile ortalama prob sinyal yoğunluğunun dağılımını gösteren "Saçılım" grafiği Şekil 9'da verilmiştir.

Fonksiyonel analizler anlatımı azalan genlerin çoğunun yaşamsal genler olduğunu göstermiştir. Bunlar içinde en önde gelenler, translasyon (TVN0401, GTPaz, 6.1-kat; TVN0655, translasyon başlatma faktörü IF-2 altbirim beta, 4.3-kat; 50S ribozomal protein L37, TVN0355, 3.8-kat; 30S altbirim proteini, TVN0399, 3.4-kat ve ayrıca 3.5-2-kat aralığında ekspresyonu azalan 12 ribozomal protein) olması protein biyosentezinin inhibasyonuna işaret etmektedir. Negatif olarak etkilenen diğer gen kategorileri: transkripsiyon (TVN0603, transkripsiyon regülatörü, 5.7-kat; TVN0938, metal-bağımlı transkripsiyon regülatörü, 4-kat; TVN0658, transkripsiyon regülatörü, 3.9-kat; TVN0498, RNA polimeraz II kompleks ELP altbirimi, 3.8-kat) enerji üretimi ve çevirimi (TVN0473, NAD (FAD)-bağımlı dehidrogenaz, 4.7-kat), hücre duvarı sentezi (TVN00877, glikosiltransferaz, 4.7-kat; TVN0880, glikoziltransferaz, 4.6-kat) ve amino asit taşınması ve metabolizmasıdır.

TCA siklüsündeki proteinlere homolog olanlarına ait genlerin transkripsiyonu da azalmıştır. Bunlar arasında NAD(FAD) bağımlı dehidrogenaz (TVN0473, 4.7-kat), elektron transfer

flavoprotein (TVN1280, 4.8-kat), ferrodoksin (TVN1279, 3.6-kat), FE-S redüktaz (TVN1004, 4-kat), sitokrom bd-tipi kinol oksidaz bulunmaktadır. Bunun yanında şeker permeaz enziminin anlatımının artması merkezi metabolik yollara substrat sağlamak için olabilir.

Genel olarak diğer organizmalarda oksidatif stresle ilgili superoksit dismutaz, alkil hidroperoksidaz ve ya glutaredoksin gibi başlıca deoksifikasyon sistemlerine ait genler *Tpv*'de oksidatif stresten önemli ölçüde etkilenmemiştir [Benaroudj vd., 2000; Chamieh vd., 2008;]. Ancak bizim sonuçlarımız bunlara alternatif olarak Fe-S oksidoredüktaz (TVN0932, 5.3-kat), aldo/keto redüktaz (TVN0875, 12.8-kat), pirüvat:ferrodoksin oksiredüktaz- alfa altbirimi (TVN0835, 3.8-kat), ekspresyonun arttığını ortaya koymuştur. Ayrıca iyon transporterler ve permeazları kodlayan genlerin anlatımında da artış olmuştur (TVN1053, 6-kat; TVN13894,6-kat; TVN08284.1-kat; TVN1391, 3.8-kat; TVN0303, 3.8-kat; TVN1245, 3.5-kat; TVN0097, 3.4-kat).

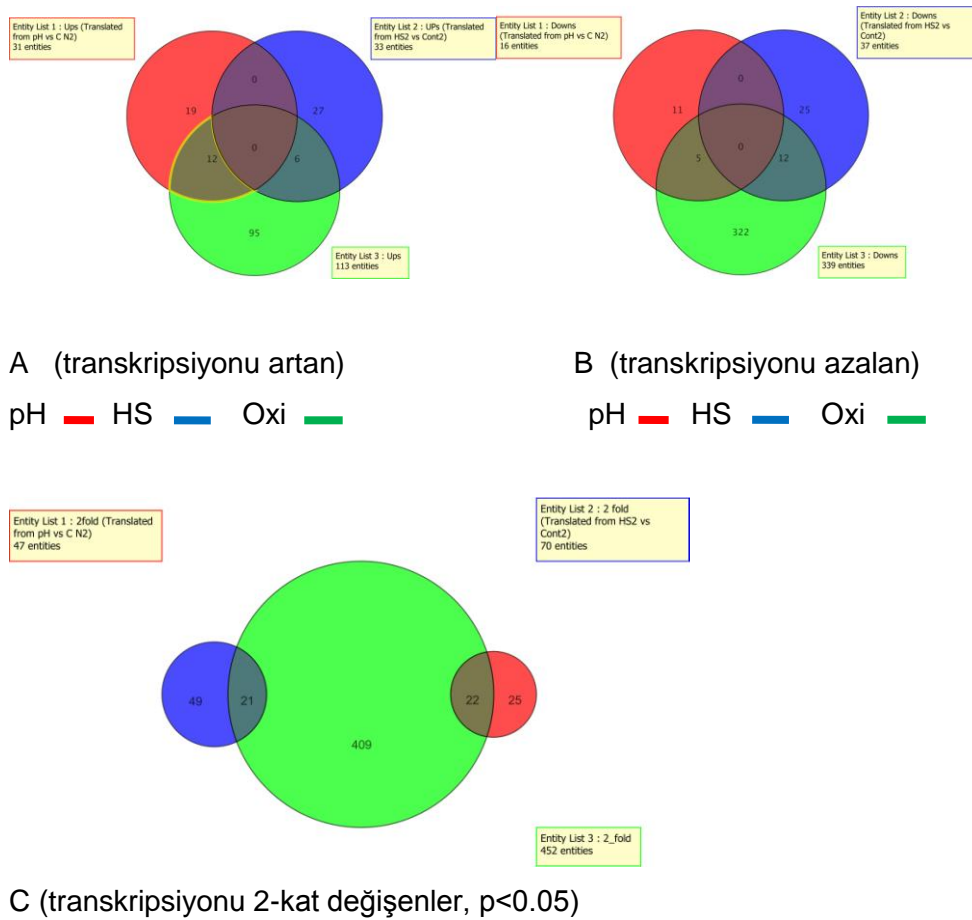
Aldo-keto redüktazlar (AKR), hücre içi metabolizma ile ya da hücre dışında besin, ilaç ya da toksin olarak bulunan aldehit ve ketonların transformasyon ve detoksifikasyonunda rol oynarlar. Çok çeşitli oksidasyon-redüksiyon reaksiyonunu (glikoz, glikokortikoidler ve küçük karbonil metabolitlerin redüksiyonundan, glutatyon konjugatları ve fosfolipit aldehitlere kadar) katalizlerler. Bu kapsiteleri ile AKR'lar bağımsız metabolik üniteler ya da metabolik yolların komponentleri olarak diğer karbonil metabolize eden aldehit ve alkol dehidrogenazlar, GST, CYP'ler ile işbirliği halinde çalışırlar [Barski vd., 2008].

Ferrodoksinler demir-kükürt proteinleri olup, çeşitli elektron transfer reaksiyonunda yer alırlar. Ayrıca çok sayıda ABC transporter genleri ve inorganik iyon transportuna ilişkin genlerinin transkripsiyonu artmıştır. Bu sonuç bu proteinlerin *Tpv*'de oksidatif stres altında hücre içi redoks potansiyelini düzenlemede etkili olabileceklerini göstermektedir. Katyon atım pompalarının *Methanosarcina barkeri* ve *Bacteroides fragilis*'de oksidatif strese karşı dirençte yer aldıkları ileri sürülmüştür [Rocha vd., 2007; Chamieh vd., 2008]. Diğer taraftan bu kategorilere giren bazı genlerin anlatımında ise azalma görülmüştür. *Tpv*'de çeşitli olası oksidatif stres genlerinin ekspresyonundaki bu tutarsızlık, reaktif oksijenin detoksifikasyonu için çok sayıda, birbiri ile örtüşen yolların söz konusu olduğunu ve buna ilişkin gen anlatımının ve ya regülasyonunun zamana bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Oksidatif strese tepki olarak anlatımı artan diğer grup proteinler replikasyon ve rekombinasyon ve hücre duvarı sentezi ile ilişkilidir.

4.4.4 Stres Koşullarında Transkripsiyonları Etkilenen Ortak Genler

Venn diyagram dikkate alındığında transkripsiyonu her üç stress koşulunda etkilenen ortak gen bulunmamaktadır (Şekil 10). Isı şoku ve oksidatif stres altında anlatım düzeyi anlamlı birşekilde artan genler (6 adet) arasında aldo-keto redüktaz (AKR), alkol dehidrogenaz gibi

detoksifikasyon rolü olanlarla, iyon ve aminoasit transportu ile ilgili genler yer almaktadır. Isı şoku ve oksidatif stres altında anlatımı önemli ölçüde azalan genler (12 adet) ise hücre hareketi, enerji üretimi, hücre duvarı/membranı sentezi ve transport proteinlerine ilişkindir. pH ve oksidatif stres koşullarında ise ortak olarak (5 adet gen) translasyonla ilgili bazı genler ile yağ asiti parçalanması ve beta oksidasyondan sorumlu Enoil-KoA hidrataz geni anlatımı azalmıştır. Oksidatif stres ve pH koşullarında ekspresyon düzeyi önemli ölçüde artan genler (12 adet) ise organik ve inorganik madde transportu ve inorganik fosfat transportuna ilişkin genler ile Fe-S oksidoredüktaz geni ile bir transkripsiyon faktörünü kodlayan genlerdir. Farklı stres koşullarında ekspresyonu değişen ortak genlerin listesi EK 4'de verilmiştir.



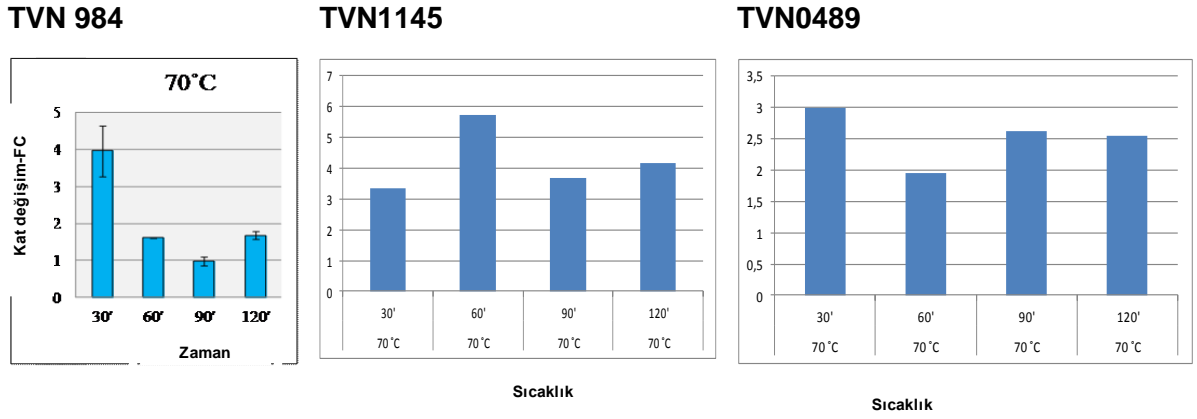
Şekil 10. Venn eğrileri. pH: ■ HS: ■ oxi: ■

4.4.5 Gerçek Zamanlı Nicel PCR Sonuçları

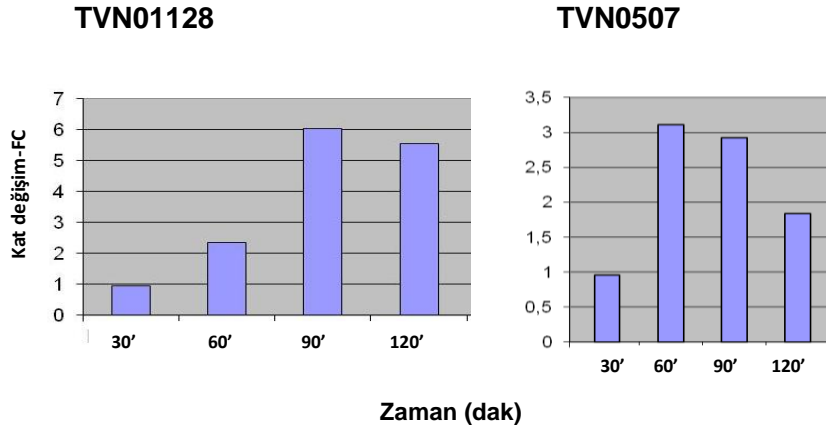
Isı stresi koşulunda anlatımı anlamlı olarak artan AAA ATPaz geni (TVN0947), termozom α - ve β - genleri (TVN0507 ve TVN1128), moleküler şaperon GrpE geni (TVN0489) ve şeker permeaz geninin (TVN1145) 3 mikrodizin deneylerinde uygulanan stres koşulunda transkripsiyon düzeylerinde kontrole göreli değişim qRT-PCR ile incelenmiştir.

Isı şokunun 1 saat süre ile uygulanması TVN0947, TVN0489 TVN1145 genlerinin anlatımının kontrole göre sırası ile 1.6- ve 5.8- ve 2-kat artmasına neden olmuştur (Şekil 11). Aynı uygulama ile termozom alfa- (TVN0507) ve beta- (TVN1128) genlerinin transkripsiyonunda ise sırası ile 2- ve 3-kat artış görülmüştür (Şekil 12). Mikrodizin analizi ile oksidatif stresin söz konusu genlerin anlatımına etkisinin önemli olmadığı bulunmuştu. qRT-PCR sonuçları da TVN0947, TVN0507 ve TVN1128 genlerinin anlatımının oksidatif stresten önemli ölçüde etkilenmediğini göstermiştir (Şekil 13).

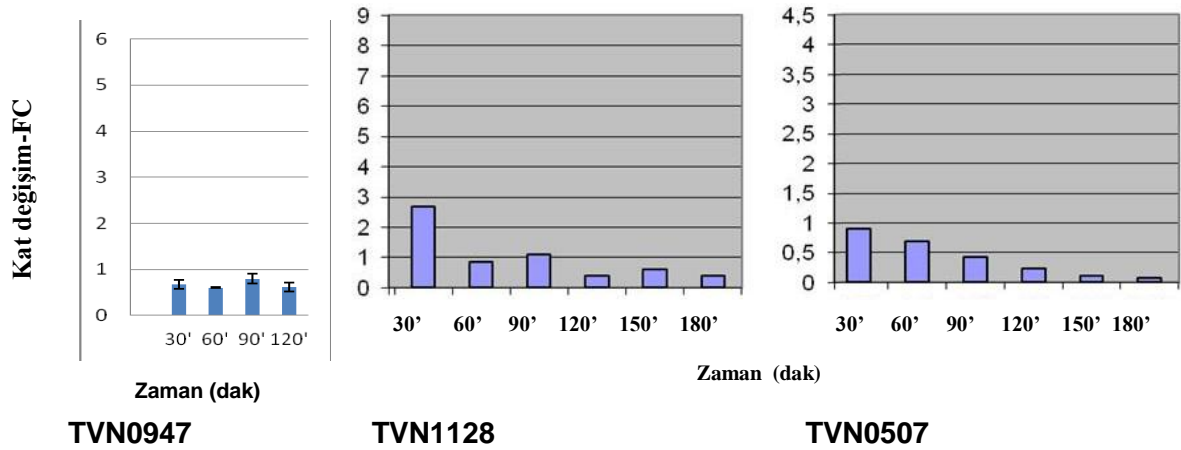
pH ve oksidatif stresle mikrodizin analizinde anlatımları anlamlı olarak değişmeyen TVN0382 ve TVN0947 genlerinin RT-PCR ile de transkripsiyon düzeylerinde önemli bir değişim olmadığı görülmüştür.



Şekil 11. TVN0947, TVN0489 ve TVN01145 genlerinin transkripsiyonuna ısı şokunun etkisi.



Şekil 12. TVN1128 (alfa) ve TVN0507 (beta) termozom genlerinin transkripsiyonuna ısı şokunun etkisi.



Şekil 13. TVN0947, TVN1128 ve TVN0507 genlerinin transkripsiyonuna oksidatif stresin (0.03 mM H₂O₂) etkisi.

5. TARTIŞMA

Isı şoku (70 °C), pH stresi (pH 5.0) ve oksidatif stresin (0.03 mM H₂O₂) ayrı ayrı bir saat süre ile uygulandığı *T. volcanium* hücrelerinde anotasyonu yapılmış 1474 genin sırası ile % 4.7, %3 ve % 30'unun transkripsiyon düzeyleri kontrol gruplarına göre anlamlı olarak değişmiştir. Seçilen Mikrodizin analizi ile ortaya çıkan global gen ekspresyon profilleri pH ve oksidatif stres tepkileri arasında bağlantı ya da benzerlik olduğunu ortaya koymuştur. Bununla bağlantılı olarak her iki stres etkisi ile ekspresyonu regüle edilen birçok ortak gen bulunmaktadır. Ancak ısı stresinin etkisi ile transkripsiyonu değişim gösteren genlerle pH stresi etkisi ile anlatımı değişen ortak bir gen olmadığı gibi, ısı stresi ve oksidatif stres koşullarında anlatım düzeyleri değişmiş örtüşen çok az sayıda gen vardır. Genlerin kodladığı proteinlerin COG sınıflamasına göre ait oldukları kategoriler dikkate alındığında, stres tipine özgü anlatımı değişiklik gösteren genler dışında her üç tip stres uygulaması ile genellikle karbonhidrat metabolizması ve transportuna ilişkin genler indüklenirken, enerji gerektiren transkripsiyon, protein sentezi ve hücre hareketi ile ilgili genler baskılanmıştır. Birincisi, stres sırasında hücrelerde genel bir durum olan enerji azalmasına karşı hücreye şeker transferini ve metabolizmasını hızlandırmak üzere kullanılan bir strateji olup, ikincisi ise zaten kısıtlı olan enerjinin kullanımını minimize etmek üzere seçilen bir yöntemdir. Isı şoku tepkisinde spesifik olarak ısı şoku proteinlerinin kritik rolleri olduğu görülmektedir. Oksidatif strese özgü kabul edilebilecek tepki ise serbest radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu redoksin sistemlerinin tetiklenmesidir. Ancak bu sisteme ilişkin bazı genlerin transkripsiyon

düzeylerindeki değişimin uyumlu olmaması, yani bazılarında artarken diğerlerinde azalması, *Tpv*'de oksidatif stres tepkisinde, ilgili genlerin ekspresyonlarının zamana bağlı ve düzey olarak değiştiği birden fazla ve birbirini ile örtüşen yolların rol aldığı ihtimalini düşündürmektedir. pH stresinde ise kritik proteinler hücrede homeostazı sağlama ve sürdürmede önemli rolleri olan transporter ve antiporterler olarak dikkat çekmektedir. Diğer taraftan çalışılan stres koşullarında hücre duvarı ve hareketi ile ilgili genlerin anlatımın anlamlı ölçüde değişmesi, çevresel strese karşı hücrelerde henüz üzerinde pek durulmayan hücre dışı defans mekanizmalarının önemine dikkat çekmektedir.

Bu çalışma ile elde edilen sonuçlar, ayrıca anotasyonu bilinen genler içerisinde anlatım düzeyleri strese tepki olarak yüksek düzeyde değişim gösteren stres spesifik genleri de ortaya çıkarmıştır. Yapılacak fonksiyonel analizlerle söz konusu genlerin *Tpv*'de stress tepkisindeki konumu ve önemini araştırmak mümkündür. Ayrıca hipotetik ve henüz fonksiyonu bilinmeyen bazı genlerin anlatımlarının stresle önemli ölçüde değişmiş olması, bunlar üzerinde yapılacak çalışmalarla strese özgü yeni genlerin bulunmasını mümkün kılacaktır.

Bu proje desteği ile, çalıştığımız üç stres çeşidi için daha önceki araştırmalarımız ışığında *T. volcanium* için en güçlü stres oluşturması beklenen koşullarda mikrodizin çalışmaları yürütülmüştür. İleriye yönelik olarak, her stres koşulu için parametrelerin değiştirilmesi ile benzer strateji kullanılarak *T. volcanium*'da stres tepkisinin daha geniş bir profilini ortaya çıkarmak ve gen ekspresyonu farklılaşmasının kinetiğini incelemek de mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

Baliga, N. S., Pan M., Goo Y. A., Yi E. C., Goodlett D. R., Dimitrov K., Shannon P., Aebersold, R., Ng W.V., Hood, L . 2002. "Coordinate regulation of energy transduction modules in *Halobacterium* sp. analyzed by a global systems approach", Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A, 99, 14913–14918.

Baliga, N. S., Bjork S. J., Bonneau R., Pan M., Iloanusu C., Kottmann M.C.H., Hood L., Ruggiero J. 2004. "Systems level insights into the stress response to UV radiation in the halophilic archaeon *Halobacterium* NRC-1", Genome Research, 14, 1025–1035.

Barski, O. A., Tipparaju S.M., Bhatnagar A . 2008. "The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification", Drug Metabolism Reviews, 40, 553-624.

Chamieh, H., Guetta D., Franzetti B. 2008. "The two PAN ATPases from *Halobacterium* display N-terminal heterogeneity and form labile complexes with the 20S proteasome", Biochemical Journal, 411, 387-397.

Cheng, Y. 2009. "Toward an atomic model of the 26S proteasome", *Current Opinion in Structural Biology*, 19, 203-208.

Ettema, T. J. G., de Vos W. M., van der Oost J. 2005. "Discovering novel biology by *in silico* archaeology", *Nature Reviews Microbiology*, 3, 859– 869.

Ettema, T.J.G., Van der Oost J., Huynen M. 2001. "Modularity in the gain and loss of genes: applications for function prediction", *Trends in Genetics*, 17, 485–487.

Frickey, T., Lupas A. N. 2004. "PhyloGenie: automated phylome generation and analysis", *Nucleic Acids Research*, 32, 5231–5238.

Gasch, A. P., Spellman P. T., Kao C. M., Carmel-Harel O., Eisen M. B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. 2000. "Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes", *Molecular Biology of the Cell*, 11, 4241–4257.

Gething, M.J. 1997. *GuideBook to the Molecular Chaperones and Protein Folding, Catalysts*. Oxford: Oxford University Press.

Glatz, A., Vass I., Los D. A., Vigh L. 1999. "The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes", *Plant Physiology and Biochemistry*, 37, 1–12.

Guhathakurta, D., Palomar L., Stormo G. D., Tedesco P., Johnson T. E., Walker, DW., Lithgow G., Kim S., Link C.D. 2002. "Identification of a novel cis-regulatory element involved in the heat shock response in *Caenorhabditis elegans* using microarray gene expression and computational methods", *Genome Research*, 12,701–712.

Kaczowka S.J., Maupin-Furlow J.A. 2003. "Subunit topology of two 20S proteasomes from *Haloferox volcanii*", *Journal of Bacteriology*, 185,165-174.

Kagawa, H. K., Yaoi T., Brocchieri L., McMillan R. A., Alton T., Trent J.D. 2003. "The composition, structure and stability of a group II chaperonin are temperature regulated in a hyperthermophilic archaeon", *Molecular Microbiology*, 48,143–156.

Kagawa, H. K., Osipiuk J., Maltsev N., Overbeek R., Quate-Randall E., Joachimiak A., Trent, J.D. 1995. "The 60 kDa heat shock proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae*", *Journal of Molecular Biology*, 253,712–725.

Kuo, Y. P., Thompson D. K., St. Jean A., Charlebois R. L., Daniels C. J. 1997. "Characterization of two heat shock genes from *Haloferox volcanii*: a model system for transcription regulation in the *Archaea*", *Journal of Bacteriology*, 179, 6318–6324.

Lindquist, S., Craig E. A. 1988. "The heat-shock proteins", *Annual Review of Genetics*, 22, 631–677.

Livak, K.J., Schmittgen T. D. 2001. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-delta delta C(T) method", *Methods*, 25, 402-408.

Macario, A. J., de Macario E. C.1999. "The archaeal molecular chaperone machine: peculiarities and paradoxes", *Genetics*, 152, 1277–1283.

Mayer, R.J., Ciechanover A., Rechsteiner M. 2008. Protein Degradation, Weinheim: Wiley-Vch Verlag.

Makarova, K. S., Koonin E. V. 2003. "Comparative genomics of archaea: how much have we learned in six years, and what's next? ", *Genome Biology*, 4, 115.

Ranford, J. C., Coates A. R., Henderson B. 2000. "Chaperonins are cell-signalling proteins: the unfolding biology of molecular chaperones", *Expert Review of Molecular Medicine*, 2000,1–17.

Richmond, C. S., Glasner J. D., Mau R., Jin H., Blattner F. R.1999. "Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12", *Nucleic Acids Research*, 27, 3821–3835.

Rocha, E.R., Tzianabos A.O., Smith C. J. 2007. "Thioredoxin reductase is essential for thiol/disulfide redox control and oxidative stress survival of the anaerobe *Bacteroides fragilis*", *Journal of Bacteriology*, 189, 8015-8023.

Rohlin, L., Trent J. D., Salmon K., Kim U., Gunsalus R.P., Liao J.C. 2005. Heat Shock Response of *Archaeoglobus fulgidus*. *Journal of Bacteriology*, 187, 6046–6057.

Ruepp, A., W. Graml, M. L., Santos-Martinez M.L., Koretke K.K., Volker C., Mewes HW., Frishman D., Stocker S., Lupas A.N., Baumeister W. 2000. "The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*", *Nature*, 407, 508– 513.

Santos, H., da Costa M.S. 2002. "Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments", *Environmental Microbiology*, 4, 501–509.

Schut, G. J., Zhou J., Adams M. W. 2001. "DNA microarray analysis of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a new type of sulfur-reducing enzyme complex", *Journal of Bacteriology*, 183,7027–7036.

Shockley, K.R., Ward D.E., Chhabra S.R., Connors S.B., Montero C.I., Kelly R.M. 2003."Heat shock response by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*", *Applied Environmental Microbiology*, 69,2365-2371.

Somer, L., Shmulman O., Dror T., Hashmueli S., Kashi Y. 2002. " The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae*", *Cell Stress Chaperones*, 7, 47–54.

Tachdjian, S, Kelly RM. 2006. "Dynamic Metabolic Adjustments and Genome Plasticity Are Implicated in the Heat Shock Response of the Extremely Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*", *Journal of Bacteriology*, 188, 4553–4559.

Trent, J. D., Nimmegern E., Wall J. S., Hartl F. U., Horwich A. L. 1991. "A molecular chaperone from a thermophilic archaebacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1", *Nature*, 354, 490–493.

Trent, J.D., Kagawa H. K., Paavola C. D., McMillan R. A., Howard J., Jahnke L., Lavin C., Embaye T., Henze C.E. 2003. "Intracellular localization of a group II chaperonin indicates a

membrane-related function”, Proceeding of the National Academy of Sciences, U.S.A, 100, 15589–15594.

Zaigler, A., Schuster S.C., Soppa J. 2003.” Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*”, Molecular Microbiology, 48,1089–1105.

Zhang, W., David E. C., Nie L., Brockman F.J. 2006. ”DNA microarray analysis of anaerobic *Methanosarcina barkeri* reveals responses to heat shock and air exposure”, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 33, 784–790.

7. TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 113T085
Proje Başlığı: Termoasidofilik Arkeon <i>Thermoplasma volcanium</i> 'un Ekspresyon Mikrodizinleri Kullanılarak Stres Koşullarında Transkriptom Analizi
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Semra KOCABIYIK, Sema ZABCI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Biyolojik Bilimler Bölümü, 06800 , Ankara
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 1.05.2013-1.05.2014
Öz (en çok 70 kelime) Bu çalışmada <i>Thermoplasma volcanium</i> 'da yüksek sıcaklık, yüksek pH ve oksidatif stres koşullarında transkriptom analizi mikrodizin tekniği ile yapılmıştır. Isı şoku tepkisi, termozom ve GrpE,K gibi bazı ısı-şoku bağlantılı genlerin anlatımının artması ile ilişkilendirilendirilmiştir. pH stresinde ise kilit proteinler olarak hücrede iyon dengesini sağlamada önemli rolleri olan transporter ve antiporterler bulunmuştur. Oksidatif strese özgü tepki ise serbest radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu sistemlerinin tetiklenmesidir. Mikrodizin analizi ve qRT-PCR yöntemi elde edilen sonuçlar her iki teknikle belirlenen gen anlatım örüntülerinin tutarlı olduğunu göstermiştir.
Anahtar Kelimeler: Stres tepkisi, <i>Thermoplasma volcanium</i> , mikrodizin teknolojisi, ısı-şoku, transkriptom
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
Projeden Yapılan Yayınlar: Proje sonuçları 13-17 Temmuz 2014, Edinburg , İskoçya'da yapılacak 16 th European Congress on Biotechnology' de sunulacaktır.

EKLER:

EK1. Isı Şoku Etkisiyle Ekspresyonu Farklılaşan *T. volcanium*

p (Corr)	FC (abs)	Regulation	GeneSymbol	Description
0,023057647	6,3339586	up	tvo_TVNO164	phosphoribosylaminoimidazole synthetase (EC:6,3,3,1); K01933 phosphoribosylformylglycinamide cyclo
0,023057647	5,8601775	up	tvo_TVNO167	Zn-dependent hydrolase
0,023057647	4,0493426	down	tvo_TVNO1426	flagellin; K07325 archaeal flagellin FlaB
0,023057647	3,9352822	down	tvo_TVNO1423	7S ribosomal RNA; K01983 SRP RNA
0,025127789	3,861244	up	tvo_TVNO1423	amino acid transporter
0,023057647	3,555387	up	tvo_TVNO161	hypothetical protein
0,023057647	3,227925	down	tvo_TVNO1236	single-stranded DNA-binding protein; K07466 replication factor A1
0,025441384	3,1894548	up	tvo_TVNO204	hypothetical protein
0,023057647	3,1551793	up	tvo_TVNO1285	Zn-dependent hydrolase (AttM-related)
0,03365401	3,0724602	down	tvo_TVNO147	hypothetical protein
0,031018285	3,0404258	up	tvo_TVNO721	major facilitator superfamily permease
0,02520805	2,8969014	down	tvo_TVNO1463	Type III restriction-modification enzyme, helicase subunit
0,023057647	2,8179464	up	tvo_TVNO1290	hypothetical protein
0,035438776	2,8006592	up	tvo_TVNO723	integrase/recombinase
0,023057647	2,74156	up	tvo_TVNO1128	molecular chaperone GroEL
0,039612006	2,7195563	up	tvo_TVNO1221	cationic amino acid transporter
0,023057647	2,7173774	down	tvo_TVNO135	hypothetical protein
0,028393123	2,665708	up	tvo_TVNO885	hypothetical protein
0,029062307	2,6638136	up	tvo_TVNO1284	alcohol dehydrogenase; K00001 alcohol dehydrogenase [EC:1,1,1,1]
0,023057647	2,6193733	down	tvo_TVNO1464	adenine-specific DNA methylase
0,02835946	2,5878246	down	tvo_TVNO361	hypothetical protein
0,023057647	2,5780692	up	tvo_TVNO507	molecular chaperone GroEL
0,024621263	2,569598	down	tvo_TVNO948	hypothetical protein
0,025127789	2,5688524	up	tvo_TVNO1309	long-chain-fatty-acid--CoA ligase (EC:2,3,1,86); K00666 fatty-acyl-CoA synthase [EC:6,2,1,-]
0,023057647	2,559215	up	tvo_TVNO678	integrase/recombinase
0,023057647	2,5529466	down	tvo_TVNO436	major facilitator superfamily permease; K08368 MFS transporter, putative metabolite transport protei
0,023057647	2,4555843	up	tvo_TVNO489	molecular chaperone GrpE (heat shock protein); K03687 molecular chaperone GrpE
0,026059052	2,4530427	down	tvo_TVNO472	transporter component; K07112
0,023057647	2,4450614	down	tvo_TVNO476	transporter component; K07112
0,025506329	2,433296	down	tvo_TVNO1422	transcription regulator
0,023057647	2,422587	down	tvo_TVNO898	amino acid transporter
0,02681917	2,4191287	up	tvo_TVNO683	hypothetical protein
0,023057647	2,4040933	down	tvo_TVNO648	hypothetical protein
0,027511416	2,4040132	up	tvo_TVNO766	hypothetical protein
0,03314252	2,345887	up	tvo_TVNO206	ABC-type sugar transporter, permease component; K02025 multiple sugar transport system permease prot
0,023605071	2,3302224	up	tvo_TVNO692	hypothetical protein; K07497 putative transposase
0,023057647	2,3135843	down	tvo_TVNO642	hypothetical protein
0,024576396	2,31082	down	tvo_TVNO1303	RNA helicase
0,037295144	2,2874072	down	tvo_TVNO830	rhodanese-related protein
0,034162045	2,2782156	up	tvo_TVNO1260	acetyl-CoA acetyltransferase (EC:2,3,1,9); K00626 acetyl-CoA C-acetyltransferase [EC:2,3,1,9]
0,023057647	2,2549026	up	tvo_TVNO1199	hypothetical protein
0,023057647	2,2521586	down	tvo_TVNO473	NAD(FAD)-dependent dehydrogenase; K17218 sulfide:quinone oxidoreductase [EC:1,8,5,-]
0,034757853	2,2494948	down	tvo_TVNO226	major facilitator superfamily permease
0,023057647	2,232282	down	tvo_TVNO200	phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC:4,1,1,32); K01596 phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) [EC:
0,023057647	2,2234113	down	tvo_TVNO802	carbamoyl phosphate synthase small subunit (EC:6,3,5,5); K01956 carbamoyl-phosphate synthase small s
0,023057647	2,1772559	down	tvo_TVNO430	glycosyltransferase
0,03274651	2,167447	up	tvo_TVNO809	hypothetical protein
0,025441384	2,162715	up	tvo_TVNO1190	ATP:corrinoid adenosyltransferase; K00798 cob(II)alamin adenosyltransferase [EC:2,5,1,17]
0,023716269	2,155174	down	tvo_TVNO699	hypothetical protein
0,024228727	2,1532593	down	tvo_TVNO611	flagellar protein G; K07330 archaeal flagellar protein FlaG
0,023057647	2,148869	down	tvo_TVNO073	metal-binding protein containing
0,023057647	2,1472476	down	tvo_TVNO1030	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methylase; K03183 ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltran
0,025127789	2,1405265	down	tvo_TVNO900	dTDP-4-dehydrothiamine reductase; K00067 dTDP-4-dehydrothiamine reductase [EC:1,1,1,133]
0,023057647	2,135254	up	tvo_TVNO1283	NAD-dependent aldehyde dehydrogenase; K00155 [EC:1,2,1,-]
0,036611587	2,127924	up	tvo_TVNO1173	hypothetical protein
0,023057647	2,1205702	up	tvo_TVNO021	permease; K07087
0,040860716	2,1122842	up	tvo_TVNO216	major facilitator superfamily permease
0,026059052	2,109055	down	tvo_TVNO624	transcription regulator; K06024 segregation and condensation protein B
0,023605071	2,1016128	down	tvo_TVNO365	hypothetical protein
0,025696617	2,080928	down	tvo_TVNO255	major facilitator superfamily permease
0,028873263	2,0752919	down	tvo_TVNO547	cell wall biosynthesis glycosyltransferase
0,028651102	2,074074	up	tvo_TVNO1224	amino acid transporter
0,023057647	2,0721602	down	tvo_TVNO1428	GTP:adenosylcobinamide-phosphate guanylyltransferase
0,04891628	2,0717328	up	tvo_TVNO875	aldo/keto reductase
0,023057647	2,0700428	down	tvo_TVNO869	cell wall biosynthesis glycosyltransferase
0,029258361	2,0576336	up	tvo_TVNO1259	nucleic-acid-binding protein; K07068
0,023057647	2,0383818	down	tvo_TVNO546	ABC-type molybdate transporter, ATPase component; K15497 molybdate/tungstate transport system ATP-bi
0,02991429	2,0345519	up	tvo_TVNO670	acyl-CoA dehydrogenase; K00257 [EC:1,3,9,-]
0,031150352	2,0345418	down	tvo_TVNO1405	hypothetical protein
0,023057647	2,018691	down	tvo_TVNO1029	hypothetical protein

EK2.

pH Stres ile Ekspresyonu Farklılaşan *T. volcanium* Genleri

p (Corr)	FC (abs)	Regulation	GeneSymbol	Description
0,009005	9,259897	up	tvo_TVNO679	hypothetical protein
0,010208	8,871412	up	tvo_TVNO300	hypothetical protein
0,003138	8,444629	up	tvo_TVNO123	phosphate ABC transporter permease; K08176 MFS transporter, PHS family, inorganic phosphate transpor
0,015719	7,419066	up	tvo_TVNO570	transcription initiation factor IIB; K03124 transcription initiation factor TFIIIB
0,009351	5,367934	up	tvo_TVNO743	CoA-binding protein; K06929
0,009351	4,686169	up	tvo_TVNO1391	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit; K09013 Fe-S cluster assembly ATP-binding protein
0,010208	4,535515	up	tvo_TVNO1389	membrane component of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter; K07033
0,010157	4,506952	up	tvo_TVNO1059	3-oxoacyl-ACP reductase
0,009351	4,472804	up	tvo_TVNO502	nucleotide-binding protein (UspA-related)
0,011415	3,968764	up	tvo_TVNO1390	membrane component of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter; K09014 Fe-S cluster as
0,010208	3,529474	up	tvo_TVNO844	hypothetical protein
0,015944	3,277689	up	tvo_TVNO990	lipoate-protein ligase A
0,018322	3,261409	up	tvo_TVNO406	transcription regulator
0,010157	3,222583	up	tvo_TVNO1392	transcription regulator
0,02999	3,097595	down	tvo_TVNO784	benzoylformate decarboxylase; K01576 benzoylformate decarboxylase [EC:4,1,1,7]
0,023812	2,947112	up	tvo_TVNO243	hypothetical protein; K00123 formate dehydrogenase major subunit [EC:1,2,1,2]
0,029175	2,922826	up	tvo_TVNO1371	hypothetical protein
0,029175	2,892298	down	tvo_TVNO1447	transcription regulator (HTH)
0,015719	2,879814	up	tvo_TVNO1600	KEOPS complex Cgi121-like subunit
0,010208	2,836307	up	tvo_TVNO1393	aromatic ring hydroxylating enzyme
0,027523	2,707015	up	tvo_TVNO932	Fe-S oxidoreductase; K06937
0,034914	2,566933	down	tvo_TVNO971	endonuclease IV; K01151 deoxyribonuclease IV [EC:3,1,21,2]
0,049524	2,551328	down	tvo_TVNO188	hypothetical protein
0,015944	2,550487	down	tvo_TVNO549	hypothetical protein
0,046758	2,521504	down	tvo_TVNO896	SAM-dependent methyltransferase
0,029175	2,430845	up	tvo_TVNO601	hypothetical protein
0,023728	2,270121	up	tvo_TVNO214	hypothetical protein
0,049524	2,2696	up	tvo_TVNO1272	transcription regulator
0,020282	2,248303	up	tvo_TVNO771	nicotinamidase-like amidase
0,049524	2,245791	down	tvo_TVNO761	leuS; leucyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,4]; K01869 leucyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,4]
0,031755	2,244717	up	tvo_TVNO494	ATP-dependent protease Lon; K04076 Lon-like ATP-dependent protease [EC:3,4,21,-]
0,023728	2,238594	down	tvo_TVNO1343	acyl-CoA dehydrogenase
0,035973	2,188472	down	tvo_TVNO363	enoyl-CoA hydratase
0,049915	2,162808	down	tvo_TVNO1085	GTPase; K06943 nucleolar GTP-binding protein
0,030669	2,161526	up	tvo_TVNO940	hypothetical protein
0,023728	2,157372	down	tvo_TVNO643	hypothetical protein
0,049524	2,136476	up	tvo_TVNO1084	H/ACA RNA-protein complex component Gar1
0,02999	2,130477	up	tvo_TVNO991	lipoate-protein ligase A; K03800 lipoate-protein ligase A [EC:2,7,7,63]
0,035877	2,129469	up	tvo_TVNO992	signal recognition particle protein Srp54; K03106 signal recognition particle subunit SRP54
0,029175	2,099335	up	tvo_TVNO1444	protein translocase subunit Sss1; K07342 protein transport protein SEC61 subunit gamma and related p
0,031755	2,079484	up	tvo_TVNO961	hypothetical protein
0,035877	2,069649	down	tvo_TVNO401	GTPase; K06883
0,029175	2,063918	down	tvo_TVNO1088	GMP synthase subunit A (EC:6,3,5,2); K01951 GMP synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6,3,5,2]
0,049524	2,063164	down	tvo_TVNO1243	nicotinate phosphoribosyltransferase (EC:2,4,2,11); K00763 nicotinate phosphoribosyltransferase [EC:
0,049524	2,057823	down	tvo_TVNO555	30S ribosomal protein S8; K02995 small subunit ribosomal protein S8e
0,047509	2,039219	up	tvo_TVNO1238	amino acid transporter
0,042438	2,015093	down	tvo_TVNO1247	30S ribosomal protein S3; K02984 small subunit ribosomal protein S3Ae

EK.3 Oksidatif Stresle Ekspresyonu Değişen *T. volcanium* Genleri

p (Corr) (Moderated T-Test [ox_03] Vs [control] P <= 0,05 FC >=2,0)	FC (abs) (Moderated T-Test [ox_03] Vs [control] P <= 0,05 FC >=2,0)	Regulation (Moderated T-Test [ox_03] Vs [control] P <= 0,05 FC >=2,0)	GeneSymbol	Description
2,06E-04	14,65086	up	tvo_TVNI466	ATPase AAA
2,15E-04	12,8416	up	tvo_TVNI0875	aldo/keto reductase
4,75E-04	9,275651	up	tvo_TVNI1417	hypothetical protein
2,15E-04	9,258174	down	tvo_TVNI0848	aspartate aminotransferase
2,43E-04	8,418194	up	tvo_TVNI0150	hypothetical protein
4,37E-04	8,165158	down	tvo_TVNI1125	5,10-methylenetetrahydrofolate red
2,15E-04	8,151483	up	tvo_TVNI1418	hypothetical protein
2,15E-04	7,372934	down	tvo_TVNI0946	hypothetical protein
2,65E-04	7,124046	down	tvo_TVNI1405	hypothetical protein
8,18E-04	6,463184	down	tvo_TVNI0578	FKBP-type peptidylprolyl isomeras
2,39E-04	6,358281	down	tvo_TVNI0860	hypothetical protein
2,91E-04	6,153731	down	tvo_TVNI0401	GTPase; K06883
2,88E-04	6,109563	up	tvo_TVNI1053	major facilitator superfamily perme
6,99E-04	6,004044	up	tvo_TVNI1130	threonine dehydratase
8,20E-04	5,982682	down	tvo_TVNI1349	chorismate mutase (EC:5,4,99,5)
3,31E-04	5,782414	down	tvo_TVNI0603	transcription regulator (HTH)
0,001025	5,592822	down	tvo_TVNI0911	amino acid transporter
3,31E-04	5,561893	up	tvo_TVNI1441	RNA-binding protein
3,96E-04	5,485493	up	tvo_TVNI0203	hypothetical protein
2,44E-04	5,398757	up	tvo_TVNI1403	HD family phosphatase; K06885
5,27E-04	5,374686	up	tvo_TVNI0933	hypothetical protein
3,96E-04	5,287104	up	tvo_TVNI0932	Fe-S oxidoreductase; K06937
5,06E-04	5,163001	up	tvo_TVNI0137	integrase/recombinase
3,96E-04	5,13472	up	tvo_TVNI0241	hypothetical protein
3,96E-04	5,103509	down	tvo_TVNI0740	metal-dependent carboxypeptidase
6,71E-04	4,96975	down	tvo_TVNI0471	transcription regulator (HTH)
3,03E-04	4,936245	down	tvo_TVNI0381	hypothetical protein
0,003393	4,916814	down	tvo_TVNI0300	hypothetical protein
3,56E-04	4,890167	down	tvo_TVNI0574	SAM-dependent methyltransferase
3,04E-04	4,864136	down	tvo_TVNI1186	transcription regulator
3,99E-04	4,83969	down	tvo_TVNI0027	cell division protein FtsZ; K03531
0,003841	4,806019	down	tvo_TVNI1280	electron transfer flavoprotein subur
3,31E-04	4,752277	down	tvo_TVNI0115	hypothetical protein; K06869 uncha
3,20E-04	4,725956	down	tvo_TVNI0473	NAD(FAD)-dependent dehydrogen
7,12E-04	4,724846	down	tvo_TVNI0877	glycosyltransferase
0,001183	4,71186	up	tvo_TVNI0688	hypothetical protein; K07485 trans
4,80E-04	4,678183	down	tvo_TVNI0890	acylaminoacyl peptidase
8,18E-04	4,673326	up	tvo_TVNI1389	membrane component of an unchar
9,33E-04	4,664547	down	tvo_TVNI1123	methionine synthase; K00549 5-me
4,61E-04	4,623442	down	tvo_TVNI0880	glycosyltransferase
4,59E-04	4,613407	down	tvo_TVNI0956	phosphoheptose isomerase; K0327
5,53E-04	4,594512	31 up	tvo_TVNI0697	hypothetical protein
6,53E-04	4,550658	down	tvo_TVNI0873	SAM-dependent methyltransferase
6,53E-04	4,509412	down	tvo_TVNI0218	amino acid transporter
6,33E-04	4,497277	down	tvo_TVNI0637	acyl-CoA hydrolase

6,53E-04	4,550658	down	tvo_TVNO873	SAM-dependent methyltransferase
6,53E-04	4,509412	down	tvo_TVNO218	amino acid transporter
6,33E-04	4,497277	down	tvo_TVNO637	acyl-CoA hydrolase
6,18E-04	4,4677067	down	tvo_TVNO910	proline iminopeptidase; K01259 proline iminopeptidase [EC:3,4,11,5]
6,53E-04	4,459461	down	tvo_TVNO1082	phosphoserine phosphatase; K01079 phosphoserine phosphatase [EC:3,1,3,3]
8,79E-04	4,455959	down	tvo_TVNO1124	hypothetical protein
7,02E-04	4,4508734	down	tvo_TVNO657	cell division GTPase
4,59E-04	4,4407773	down	tvo_TVNO201	metal-dependent hydrolase related to alanyl-tRNA synthetase; K07050
0,001204357	4,391109	down	tvo_TVNO538	agmatinase; K01480 agmatinase [EC:3,5,3,11]
3,65E-04	4,3534093	down	tvo_TVNO171	folate-dependent phosphoribosylglycinamide formyltransferase; K11175 phosphoribosylglycinamide formyltransferase
3,60E-04	4,3215504	down	tvo_TVNO655	translation initiation factor IF-2 subunit beta; K03238 translation initiation factor 2 subunit 2
6,53E-04	4,3088894	down	tvo_TVNO762	pyruvoyl-dependent arginine decarboxylase [EC:4,1,1,19]; K02626 arginine decarboxylase [EC:4,1,1,19]
3,96E-04	4,302997	down	tvo_TVNO788	hypothetical protein
3,96E-04	4,283693	down	tvo_TVNO416	hypothetical protein
6,29E-04	4,2768216	down	tvo_TVNO1160	proline/betaine transport permease
7,07E-04	4,2392383	down	tvo_TVNO209	alpha-mannosidase; K01191 alpha-mannosidase [EC:3,2,1,24]
3,64E-04	4,2049475	down	tvo_TVNO802	carbamoyl phosphate synthase small subunit [EC:6,3,5,5]; K01956 carbamoyl-phosphate synthase small s
0,001145015	4,198791	up	tvo_TVNO700	hypothetical protein
5,40E-04	4,1809916	down	tvo_TVNO995	coiled-coil protein
3,76E-04	4,156954	down	tvo_TVNO845	nicotinamide-nucleotide adenyltransferase [EC:2,7,7,1]; K00952 nicotinamide-nucleotide adenyltra
4,40E-04	4,135316	down	tvo_TVNO1073	hypothetical protein
0,001318939	4,1167827	up	tvo_TVNO828	Mn2+ transporter
7,02E-04	4,0947676	down	tvo_TVNO913	hypothetical protein
6,14E-04	4,072053	up	tvo_TVNO1442	hypothetical protein
8,01E-04	4,068811	up	tvo_TVNO1390	membrane component of an uncharacterized iron-regulated ABC-type transporter; K09014 Fe-S cluster as
4,75E-04	4,017953	down	tvo_TVNO1004	Fe-S oxidoreductase; K06936
6,29E-04	3,9886093	up	tvo_TVNO938	metal-dependent transcription regulator; K03709 DtxR family transcriptional regulator, Mn-dependent
4,10E-04	3,98688	down	tvo_TVNO945	metal-dependent transcription regulator
3,96E-04	3,9740424	up	tvo_TVNO1600	KEOPS complex Cgi121-like subunit
6,30E-04	3,9693232	down	tvo_TVNO231	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase; K00020 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase [EC:1,1,1,31]
5,06E-04	3,9539835	down	tvo_TVNO1240	cation transport ATPase; K01533 Cu2+-exporting ATPase [EC:3,6,3,4]
7,07E-04	3,943609	down	tvo_TVNO1090	aspC; aspartyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,12]; K01876 aspartyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,12]
5,06E-04	3,907418	down	tvo_TVNO658	transcription regulator
4,75E-04	3,8846166	down	tvo_TVNO1360	metal-dependent amidohydrolase
4,75E-04	3,8400128	down	tvo_TVNO602	hypothetical protein
4,75E-04	3,8360016	up	tvo_TVNO660	DNA polymerase elongation subunit
5,06E-04	3,8318238	up	tvo_TVNO835	pyruvate:ferredoxin oxidoreductase, alpha subunit; K00169 pyruvate ferredoxin oxidoreductase, alpha
4,75E-04	3,8244548	down	tvo_TVNO355	rpl37e; 50S ribosomal protein L37; K02922 large subunit ribosomal protein L37e
6,53E-04	3,8234968	down	tvo_TVNO899	dTDP-glucose pyrophosphorylase; K00973 glucose-1-phosphate thymidyltransferase [EC:2,7,7,24]
7,19E-04	3,8154728	down	tvo_TVNO812	N-methylhydantoinase A; K01473 N-methylhydantoinase A [EC:3,5,2,14]
6,92E-04	3,809033	down	tvo_TVNO177	hypothetical protein
9,75E-04	3,7983294	up	tvo_TVNO1391	Iron-regulated ABC transporter ATPase subunit; K09013 Fe-S cluster assembly ATP-binding protein
6,00E-04	3,793055	down	tvo_TVNO739	DNA helicase II; K03657 DNA helicase II / ATP-dependent DNA helicase PcrA [EC:3,6,4,12]
4,66E-04	3,7926652	down	tvo_TVNO439	asparagine synthase; K01953 asparagine synthase (glutamine-hydrolysing) [EC:6,3,5,4]
7,24E-04	3,7860172	down	tvo_TVNO498	RNA polymerase II complex ELP3 subunit; K07739 elongator complex protein 3 [EC:2,3,1,48]
0,010019557	3,7834878	up	tvo_TVNO303	phosphate ABC transporter permease
6,53E-04	3,7678478	down	tvo_TVNO865	transposase; K07483 transposase
6,76E-04	3,7635126	down	tvo_TVNO656	hypothetical protein
0,001381139	3,7428708	down	tvo_TVNO996	asnC; asparaginyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,22]; K01893 asparaginyl-tRNA synthetase [EC:6,1,1,22]
0,001085042	3,7300346	down	tvo_TVNO1492	glutamine synthetase; K01915 glutamine synthetase [EC:6,3,1,2]
6,53E-04	3,7286503	down	tvo_TVNO1141	glycerol kinase; K00864 glycerol kinase [EC:2,7,1,30]
6,98E-04	3,686283	up	tvo_TVNO567	LysR family transcriptional regulator; K03750 molybdopterin molybdotransferase [EC:2,10,1,1]
5,21E-04	3,6695998	down	tvo_TVNO929	gluconolactonase
0,001065583	3,6468542	down	tvo_TVNO1286	hypothetical protein
0,010093598	3,6085815	down	tvo_TVNO1279	ferredoxin-like protein
7,84E-04	3,5960584	down	tvo_TVNO997	hypothetical protein
6,92E-04	3,5837755	down	tvo_TVNO529	dTDP-glucose pyrophosphorylase; K00973 glucose-1-phosphate thymidyltransferase [EC:2,7,7,24]
6,82E-04	3,5582414	up	tvo_TVNO437	RNA processing exonuclease; K07577 putative mRNA 3-end processing factor
7,07E-04	3,5533874	down	tvo_TVNO944	alcohol dehydrogenase; K15020 acryloyl-coenzyme A reductase [EC:1,3,1,84]
5,06E-04	3,544516	down	tvo_TVNO943	molybdopterin/thiamine biosynthesis dinucleotide-utilizing protein; K11996 adenyltransferase and s
0,001608839	3,520339	down	tvo_TVNO1157	oxidoreductase; K00266 glutamate synthase (NADPH/NADH) small chain [EC:1,4,1,13 1,4,1,14]
7,03E-04	3,4956844	down	tvo_TVNO998	pyridoxal biosynthesis lyase PdxS; K06215 pyridoxal 5'-phosphate synthase pdxS subunit [EC:4,3,3,6]
6,49E-04	3,4735975	down	tvo_TVNO292	Fe2+ uptake regulation protein; K03711 Fur family transcriptional regulator, ferric uptake regulator
0,001131511	3,465444	up	tvo_TVNO1245	major facilitator superfamily permease
6,34E-04	3,4601953	down	tvo_TVNO078	histidinol-phosphate aminotransferase; K00817 histidinol-phosphate aminotransferase [EC:2,6,1,9]
7,16E-04	3,443159	up	tvo_TVNO097	Kef-type K+ transporter NAD-binding component

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. SEMRA KOCABIYIK
Proje No:	113T085
Proje Başlığı:	Termoasidofilik Arkeon Thermoplasma Volcanium Un Ekspresyon Mikrodizinleri Kullanılarak Stres Koşullarında Transkriptom Analizi
Proje Türü:	Hızlı Destek
Proje Süresi:	12
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	ORTA DOĞU TEKNİK Ü. FEN EDEBİYAT F. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/05/2013 - 01/05/2014
Onaylanan Bütçe:	30000.0
Harcanan Bütçe:	28767.1
Öz:	<p>Bu projede tüm genom mikrodizin teknolojisi kullanılarak, termoasidofilik bir arkea bakterisi olan Thermoplasma volcanium'da yüksek sıcaklık (70 °C), yüksek pH (pH 5.0) ve oksidatif stres (0.03 mM H₂O₂) koşullarında transkripsiyon düzeyinde değişim gösteren ve stres tepkisinde yer alması olası proteinleri kodlayan genler belirlenmiştir. Mikrodizin analiz sonuçları, T.volcanium hücrelerinin strese maruz kaldıkları 60 dakika boyunca anlatım düzeyleri düşen başlıca genler içinde işlevsel olarak enerji üretimi ve dönüşümü, transkripsiyon, translasyon ve hücre hareketi ile bağlantılı olanlar önemli ölçüde inhibe olmuşlardır. Bu durum, stres sırasında genel olarak birçok organizmada görülen enerji azalmasına karşı bir önlem olarak yüksek enerji gerektiren sentetik süreçleri minimize etmek için geliştirilen bir strateji olarak düşünülebilir. Isı şoku tepkisi, spesifik olarak bazı ısı-şoku bağlantılı genlerin anlatımının artması ile ilişkilendirilmiştir. T. volcanium'da bu bağlamda özellikle moleküler şaperon sistemleri olan termozom ve Hsp70'in (GrpE,K gibi) kritik rolleri olduğu anlaşılmaktadır. pH stresinde ise kilit proteinler olarak hücrede iyon dengesini sağlama ve korumada önemli rolleri olan transporter ve antiporterler dikkat çekmektedir. T. volcanium'da oksidatif strese özgü kabul edilebilecek tepki ise serbest radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu redoksin sistemlerinin tetiklenmesidir. Ancak bu sistemlerle ilgili genlerin bazılarının ekspresyonlarının artarken diğerlerinde azalması, oksidatif strese baş etmede zamana bağlı olarak etkileri nitel ve nicel olarak değişen birden fazla ve birbirini ile örtüşen yolların rolü olabileceğini akla getirmektedir. T. volcanium'un mikrodizin analizi ile pH ve oksidatif stress altında ortaya çıkan global gen ekspresyon profilleri, transkripsiyonu regüle edilen birçok ortak gen bulunması nedeniyle, bu iki stres mekanizmaları arasında bağlantı olabileceğini, ancak ısı stresine spesifik mekanizmaların bunlardan bağımsız olabileceğini düşündürmektedir. Mikrodizin analiz sonuçlarına göre strese tepki olarak anlatım düzeyleri önemli ölçüde değişen TVN0947, TVN0507, TVN01128, TVN0489, ve TVN1145 genlerinin anlatımında strese tepki olarak nitel değişim qRT-PCR yöntemi ile de analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar bu genlerin her iki teknikle belirlenen anlatım örüntülerinin tutarlı olduğunu göstermiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Stres tepkisi, Thermoplasma volcanium, mikrodizin teknolojisi, ısı-şoku, transkriptom
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır