

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ  
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI



**KUTUP İZOLATI *Pseudomonas fragi* AC'de  
SOĞUK ŞOK PROTEİNLERİ (CSP2 ve CSP5)'NİN  
MOLEKÜLER VE *in silico* KARAKTERİZASYONU**

Yüksek Lisans Tezi

**Ömer KONUKSEVER**

Danışman

**Doç. Dr. Ashhan KURT KIZILDOĞAN**

Bu çalışmanın bakteri izolasyon bölümü Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından  
PYO.ZRT.1901.22.003 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN  
2023

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

22/06/2023

Ömer KONUKSEVER

## TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

**Tez Başlığı:** KUTUP İZOLATI *Pseudomonas fragi* AC'DE SOĞUK ŞOK PROTEİNLERİ (CSP2 VE CSP5)'NİN MOLEKÜLER VE *in silico* KARAKTERİZASYONU

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 22/06/2023 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : %10

Tek kaynak oranı : %3 çıkmıştır.

22/06/2023

Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

## ÖZET

### KUTUP İZOLATI *Pseudomonas fragi* AC'DE SOĞUK ŞOK PROTEİNLERİ (CSP2 VE CSP5)'NİN MOLEKÜLER VE *in silico* KARAKTERİZASYONU

Ömer KONUKSEVER

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Ağustos/2023

Danışman: Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN

Antarktika'nın zorlu ekolojik şartlarına rağmen bölgede hayatta kalma yetisine sahip biyokütlenin en büyük bileşeni prokaryotik organizmalardır ve özel adaptasyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu aşırı şartlara uyum sağlayabilen mikroorganizmalar, kirleticilerin mineralizasyonundan soğuk uyarılabilir genlere ve ekstremozimlere kadar birçok biyomolekül için potansiyel gen kaynağıdır.

Bu çalışmanın amacı, kutup izolatu, psikrotolerant *Pseudomonas fragi* AC'de soğuk şoku proteinlerinin belirlenmesini ve literatürde ilk defa farklı sıcaklık değerlerinde bu proteinleri kodlayan genlerin ifadelerinin qPCR ile analizini içermektedir. Çalışma kapsamında literatürde temelde iki farklı gen olan toplam 10 gen tespit edilmiştir. AC-csp2 ve AC-csp5 fragmentleri PCR ile klonlanmış ve baz dizisi çıkarılmıştır. Dizi analizi sonucuna göre, ilgili genlerden AC-csp2 literatürdeki eşleniği ile %100 özdeş çıkarken, AC-csp5'in nükleotit dizilimindeki 17 bazlık farklılığa rağmen protein yapısında 1 amino asit farklılık sergilediği görülmüştür. İlgili genlerin birbiri ile özdeşliği %73 olarak belirlenmiştir. Proteinlerin *in silico* karakterizasyonu iki genin de ATP bağımlı helikaz ile yakından etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Her iki proteinin de  $\beta$  iplikçik oluşumunun %54 olduğu ve  $\alpha$  sarmalı oluşumu içermediği görülmüştür. AC-CSP2 *P. fluorescens*'e ait soğuk şok proteini CapA ile %100 aynı domaini içerirken AC-CSP5 *P. fragi*'de *tapB* geninin ürünü olan sıcaklık alıştırma proteini ile %98.4 aynı domaini içermektedir. qPCR analizine göre 15 °C'dekine kıyasla *csp2*'nin ifadesi 28 °C' de artış ( $p<0.05$ ), *csp5* geninin ifadesi ise 28 °C'de istatistiksel açıdan anlamlı azalış göstermiştir. Buna göre, *csp5* geninin kontrole kıyasla rölatif ifade değeri 28 °C' de 0.004'tür ( $p<0.0001$ ).

Çalışma kapsamında *P. fragi* AC suşuna ait 16S rRNA dizisi OR150484 erişim numarası ile *csp2* ve *csp5* genleri ise ilgili erişim numaraları ile NCBI/GenBank'ta kayıt altına alınmıştır. İleriki çalışmalarda *P. fragi* *csp2* ve *csp5* genlerinin heterolog ifadesinin farklı suşlarda soğuk stresine toleranstaki rolünün araştırılması amaçlanmaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Antarktika, Psikrotolerant, *Pseudomonas*, Soğuk şoku proteini, Kantitatif PZR

## ABSTRACT

### MOLECULAR AND *in silico* CHARACTERIZATION OF COLD SHOCK PROTEINS (CSP2 AND CSP5) IN POLAR ISOLATE *Pseudomonas fragi* AC

Ömer KONUKSEVER

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Agricultural Biotechnology

Master, August/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ashhan KURT KIZILDOĞAN

Despite the difficult ecological conditions of Antarctica, the largest component of biomass capable of surviving in the region is prokaryotic organisms and they have special adaptation mechanisms. Microorganisms that can adapt to these extreme conditions are potential gene sources for many biomolecules, from the mineralization of pollutants to cold inducible genes and extremozymes.

The aim of this study is to determine the cold shock proteins in the polar isolate, psychrotolerant *Pseudomonas fragi* AC, and to analyze the expressions of the genes encoding these proteins at different temperature values by qPCR for the first time in the literature. A total of 10 genes were determined in the present database and the representative two genes were identified here. The AC-csp2 and AC-csp5 fragments were cloned by PCR and sequenced. According to the results of the sequence analysis, AC-csp2 was 100% identical with its counterparts in the literature, while AC-csp5 showed a difference of 1 amino acid in its protein structure, despite the 17-base difference in the nucleotide sequence. The identity of the csp2 and csp5 with each other was determined as 73%. *in silico* characterization of the proteins showed that both genes interact closely with ATP-dependent helicase. It was observed that both proteins had 54%  $\beta$ -strand formation and no  $\alpha$ -helix formation. AC-CSP2 contains 100% the same domain as CapA, the cold shock protein of *P. fluorescens*, while AC-CSP5 contains 98.4% the same domain as the temperature acclimation protein, the product of *tapB* gene, in *P. fragi*. According to qPCR analysis, the expression of csp2 increased at 28 °C ( $p<0.05$ ) compared to that at 15 °C, and the expression of csp5 gene showed a statistically significant decrease at 28 °C. Accordingly, the relative expression value of the csp5 gene compared to the control was 0.004 at 28 °C ( $p<0.0001$ ).

Within the scope of the study, the 16S rRNA sequence of *P. fragi* AC strain was registered in NCBI/GenBank with the accession number OR150484 and the csp2 and csp5 genes with the related accession numbers. In future studies, it is aimed to investigate the role of heterologous expression of *P. fragi* csp2 and csp5 genes in tolerance to cold stress in different strains.

**Keywords:** Antarctica, Psychrotolerant, *Pseudomonas*, Cold Shock Protein, Quantitative PCR

## ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak gerçekleştirilmiştir.

“Kutup İzolatı *Pseudomonas fragi* AC’de Soğuk Şok Proteinleri (CSP2 VE CSP5)’nin Moleküler ve *in silico* Karakterizasyonu” başlıklı tez konusunu bana önererek konu üzerinde çalışma fırsatı veren, bilimsel düşünce, bilgi birikimi ve tecrübesiyle yüksek lisansım süresince bana yol gösteren akademik danışmanım Sayın Doç. Dr. Aslıhan KURT KIZILDOĞAN başta olmak üzere öğrenimim boyunca desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Önlisans eğitimim sırasında biyoteknolojiye olan merakımı farkedenden ve bu merakın ilgiye dönüşmesini sağlayarak, bu bölümü seçmemde büyük rol oynayan Dr. Öğr. Üyesi Yakup ERMURAT’a bana kattıkları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, tecrübesi ile her daim yanımda olan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım değerli çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Çiğdem OTUR’a, Ziraat Yük. Müh. Büşra ABANOZ SEÇGİN’e, Dr. Zafer SEÇGİN’e, Ziraat Yük. Müh. Cihat Erdem BÜLBÜL’e, Lokman BAŞ’a, Araş. Gör. Ziraat Yük. Müh. S. Faruk KIRKINCI’ya ve Ziraat Yük. Müh. Fulya ÖZAYDIN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eğitim hayatım boyunca en büyük destekçim olan aileme ve beni yalnız bırakmayan tüm sevdiklerime sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmamda kullandığım suşun izole edildiği su örneğinin temin edildiği TÜBİTAK Üçüncü Ulusal Antarktika Bilim Seferi’ne gerekli izinleri veren Cumhurbaşkanlığına, Bilim ve Teknoloji Bakanlığına ve İstanbul Teknik Üniversitesi Kutup Araştırma Uyg-Ar Merkezi ve TÜBİTAK-MAM Kutup Araştırmaları Enstitüsü’nün yanı sıra bu kapsamda örneği bizim kullanımımıza sunan sayın Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz KAYA’ya teşekkürlerimi sunarım.

Aynı zamanda bu çalışmanın mikroorganizma izolasyonu aşaması Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi Başkanlığı tarafından PYO.ZRT.1901.22.003 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Ömer KONUKSEVER

# İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TEZ KABUL VE ONAYI .....                                                                                          | i    |
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI .....                                                                              | ii   |
| TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI .....                                                                        | ii   |
| ÖZET .....                                                                                                        | iii  |
| ABSTRACT .....                                                                                                    | iv   |
| ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR .....                                                                                          | v    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                 | vi   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR .....                                                                                     | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                                             | ix   |
| TABLolar DİZİNİ .....                                                                                             | x    |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                    | 1    |
| 2. LİTERATÜR ÖZETİ .....                                                                                          | 4    |
| 2.1. Antarktika Kıtası .....                                                                                      | 4    |
| 2.1.1. Antarktika Mikrobiyal Çeşitliliği ve Biyoteknolojik Önemi .....                                            | 6    |
| 2.2. Psikrofil/Psikrotolerant Bakteriler .....                                                                    | 11   |
| 2.2.1. Soğuk Şoku Proteinleri (CSP) .....                                                                         | 12   |
| 2.3. <i>Pseudomonas</i> sp. ve Biyoteknolojik Önemi .....                                                         | 15   |
| 2.4. Mevcut Çalışmanın Amacı .....                                                                                | 17   |
| 3. MATERYAL VE METOT .....                                                                                        | 18   |
| 3.1. Mikroorganizmanın Eldesi .....                                                                               | 18   |
| 3.2. Besiyerleri .....                                                                                            | 18   |
| 3.3. Tamponlar ve Çözeltiler .....                                                                                | 18   |
| 3.4. Kimyasallar ve Enzimler .....                                                                                | 18   |
| 3.5. AC İzolatından Genomik DNA İzolasyonu .....                                                                  | 18   |
| 3.6. Bakteriyel İzolatın Moleküler Karakterizasyonu .....                                                         | 20   |
| 3.6.1. 16S ribozomal RNA Amplikonların Dizilenmesi ve Filogenetik Ağacın Oluşturulması .....                      | 21   |
| 3.7. <i>Pseudomonas fragi</i> 'de <i>csp</i> Genlerinin Taranması .....                                           | 22   |
| 3.8. <i>csp</i> Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klonlanması .....                                      | 22   |
| 3.8.1. Klonlama Primerlerinin Tasarımı .....                                                                      | 22   |
| 3.8.2. <i>csp</i> Genlerinin Amplifikasyonu .....                                                                 | 23   |
| 3.8.3. Klonlanan <i>csp</i> Genlerinin Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi .....                                   | 25   |
| 3.9. <i>P. fragi</i> AC'de Soğuk Stresinin <i>csp</i> Gen İfade Profili Üzerine Etkisinin Belirlenmesi .....      | 25   |
| 3.9.1. <i>P. fragi</i> AC Suşunun Üç Farklı Sıcaklıkta İnkübasyonu .....                                          | 25   |
| 3.9.2. RNA İzolasyonu .....                                                                                       | 25   |
| 3.9.3. Kantitatif PZR (qPCR) .....                                                                                | 26   |
| 3.9.4. qPCR Verilerinin Rölatif Kantifikasyonu ve İstatistiksel Analiz .....                                      | 27   |
| 3.10. <i>P. fragi</i> AC'ye ait CSP Proteinlerinin <i>in silico</i> Karakterizasyonu .....                        | 27   |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                 | 28   |
| 4.1. Ardley Adası Göl Suyu Örneğinden AC Suşunun İzolasyonu .....                                                 | 28   |
| 4.2. AC Suşundan gDNA İzolasyonu ve PZR ile 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu .....                          | 28   |
| 4.3. Sanger Dizileme ve Filogenetik Dendogramın Oluşturulması .....                                               | 31   |
| 4.4. <i>P. fragi csp</i> Genlerinin <i>in silico</i> Tespiti .....                                                | 32   |
| 4.5. <i>P. fragi</i> AC'e ait <i>csp2</i> ve <i>csp5</i> Genlerinin Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi .....      | 33   |
| 4.6. <i>P. fragi</i> AC Suşuna ait <i>csp</i> Genlerinin BLAST Analizleri .....                                   | 35   |
| 4.7. <i>P. fragi</i> AC'deki <i>csp2</i> ve <i>csp5</i> Genlerinin Farklı Sıcaklıklardaki İfade Değişimleri ..... | 37   |
| 4.8. <i>P. fragi</i> AC Suşunda <i>in silico</i> CSP Karakterizasyonu .....                                       | 40   |

|                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                    | <b>43</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                               | <b>47</b> |
| <b>EKLER .....</b>                                                   | <b>56</b> |
| EK-A: Proje Kapsamında Alınan Örneklerin İzin Belgesi.....           | 56        |
| EK-B: Çalışmada Kullanılan Besiyeri İçerikleri.....                  | 57        |
| EK-C: Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler.....              | 58        |
| EK-D: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler .....     | 59        |
| EK-E: Klonlanan Amplikonların Nükleotit ve Amino Asit Dizileri ..... | 60        |
| EK-F: <i>csp</i> /CSP BLAST Analizi Sonuçları .....                  | 61        |
| EK-G: Çalışmada Kullanılan DNA Markör Büyüklükleri .....             | 69        |
| <b>ÖZ GEÇMİŞ.....</b>                                                | <b>75</b> |



## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                |                                            |
|----------------|--------------------------------------------|
| ARGs           | : Antibiyotik direnç genleri               |
| bç             | : Baz çifti                                |
| BLAST          | : Basic Local Alignment Search Tool        |
| cDNA           | : Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit       |
| CTAB           | : Cetyltrimethylammonium bromide           |
| CSPs           | : Soğuk şoku proteinleri                   |
| Ct             | : Threshold cycle                          |
| DMSO           | : Dimethyl sulfoxide                       |
| EtBr           | : Etidyum bromür                           |
| gt             | : Gigaton                                  |
| HF             | : Yüksek doğruluklu                        |
| IPCC           | : Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli |
| kGy            | : Kılıgrey ışınlama dozu                   |
| qPCR           | : Kantitatif PZR                           |
| RT-PCR         | : Reverse Transcriptase PZR                |
| rRNA           | : Ribozomal ribonükleik asit               |
| rpm            | : Dakikadaki döngü sayısı                  |
| S              | : Svedberg sedimentasyon kat sayısı        |
| SDS            | : Sodium dodecyl sulfate                   |
| ssDNA          | : Tek zincirli DNA                         |
| T <sub>m</sub> | : Erime sıcaklığı                          |
| TNT            | : Trinitrotoluen                           |
| UTR            | : Untranslated region                      |
| UV             | : Morötesi                                 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Antarktika Kıtası'nın NASA Blue Marble veri seti kullanılarak oluşturulan uydu görüntüsü. ....                                             | 4  |
| Şekil 3.1. Primer çiftlerinin ilgili gen dizilerine bağlanma pozisyonları. ....                                                                       | 23 |
| Şekil 4.1. Kutup izolatının MHA besiyerindeki koloni morfolojisi. ....                                                                                | 28 |
| Şekil 4.2. AC izolatına ait iki farklı yöntemle izole edilen gDNA'larının agaroz jel elektroforezi sonucu. ....                                       | 29 |
| Şekil 4.3. AC gDNA'ların UV spektrumları. ....                                                                                                        | 29 |
| Şekil 4.4. Modifiye edilmiş Pospiech ve Neumann (1995), yöntemi ile izole edilen AC-gDNA'sının görünümü. ....                                         | 30 |
| Şekil 4.5. AC suşuna ait 16S rRNA geninin PZR amplifikasyonu. ....                                                                                    | 31 |
| Şekil 4.6. 16S rRNA baz dizisine göre oluşturulan filogenetik ağaç. ....                                                                              | 32 |
| Şekil 4.7. csp2FR primer çifti ile gerçekleştirilen gradiend PZR'a ait jel görüntüsü. ....                                                            | 34 |
| Şekil 4.8. csp5FR primer çifti ile gerçekleştirilen PZR'a ait jel görüntüsü. ....                                                                     | 34 |
| Şekil 4.9. <i>P. fragi</i> AC suşunun AC-csp2 ve AC-csp5 genlerine ait nükleotit ve karşılık gelen amino asit dizileri. ....                          | 35 |
| Şekil 4.10. <i>csp2-csp5</i> genleri ve CSP2-CSP5 proteinleri dizi benzerliklerinin blastn ve blastp ile karşılaştırılması. ....                      | 36 |
| Şekil 4.11. <i>P. fragi</i> AC'nin üç farklı sıcaklıkta zaman bağlı üreme profili. ....                                                               | 37 |
| Şekil 4.12. <i>P. fragi</i> AC'den izole edilen RNA'lara ait jel fotoğrafları. ....                                                                   | 38 |
| Şekil 4.13. <i>P. fragi</i> AC'de <i>csp2</i> ve <i>csp5</i> genlerinin farklı sıcaklıklardaki rölatif ifade değişimleri. ....                        | 39 |
| Şekil 4.14. <i>P. fragi</i> AC'ye ait CSP2 ve CSP5 proteinlerinin Phyre2 tarafından c3camB şablonu baz alınarak oluşturulan tahmini 3B yapıları. .... | 40 |
| Şekil 4.15. Phyre2 bazında CSP2 (a) ve CSP5 (b)'e ait sekonder yapı ve hata tahmin güvenilirliği sonuçları. ....                                      | 41 |

## TABLÖLER DİZİNİ

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 2.1. Ekstremozim kaynağı canlıların yaşama alanı ve ortam istekleri.....                                                               | 7  |
| Tablo 3.1. 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan üniversal primer çifti.                                                    | 21 |
| Tablo 3.2. 16S rRNA geninin klonlanması için kullanılan PZR bileşenleri.....                                                                 | 21 |
| Tablo 3.3. Q5 DNA Polimeraz için tavsiye edilen sıcaklık döngüleri.....                                                                      | 21 |
| Tablo 3.4. <i>P. fragi</i> AC'de <i>csp</i> genlerinin amplifikasyonu amacıyla tasarlanan primer çiftleri .....                              | 23 |
| Tablo 3.5. <i>csp</i> genlerinin klonlama primerlerine ait erime sıcaklıkları .....                                                          | 24 |
| Tablo 3.6. <i>csp2</i> ve <i>csp5</i> primerleri ile klonlamada kullanılan reaksiyon bileşenleri .....                                       | 24 |
| Tablo 3.7. <i>csp</i> genlerinin klonlanmasında uygulanan TouchDown PZR sıcaklık döngüleri.                                                  | 24 |
| Tablo 3.8. cDNA sentezi için reaksiyon içerik ve koşulları .....                                                                             | 26 |
| Tablo 3.9. qPCR için uygulanan içerik ve koşullar .....                                                                                      | 26 |
| Tablo 3.10. qPCR'da kullanılan primerler ve özellikleri.....                                                                                 | 26 |
| Tablo 4.1. AC suşuna ait gDNA'larının konsantrasyonları ve saflık değerleri.....                                                             | 29 |
| Tablo 4.2. Modifiye edilmiş protokolle izole edilen gDNA'nın konsantrasyon ve saflık değeri .....                                            | 30 |
| Tablo 4.3. AC suşunun 16S rRNA dizi analizi ve hizalama sonuçlarına göre benzerlik yüzdeleri .....                                           | 31 |
| Tablo 4.4. NCBI veri tabanında genom dizileri bulunan <i>P. fragi</i> suşları .....                                                          | 32 |
| Tablo 4.5. NCBI BLAST uygulaması kullanılarak oluşturulan gen benzerlik tablosu.....                                                         | 33 |
| Tablo 4.6. Sekansa gönderilecek AC suşuna ait AC- <i>csp2</i> ve AC- <i>csp5</i> ampikonlarının konsantrasyonları ve saflık değerleri .....  | 34 |
| Tablo 4.7. CSP2 ve CSP5 proteinlerinin benzerlik verileri .....                                                                              | 37 |
| Tablo 4.8. <i>P. fragi</i> AC'ye ait farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerden izole edilen RNA'ların kalite ve saflık dereceleri..... | 38 |
| Tablo 4.9. <i>csp2</i> ve <i>csp5</i> genlerinin rölatif ifade değerleri.....                                                                | 39 |
| Tablo 4.10. PDB'deki CSP2 yapısal analogları.....                                                                                            | 42 |
| Tablo 4.11. PDB'deki CSP5 yapısal analogları.....                                                                                            | 42 |

## 1. GİRİŞ

Kutupsal kriyosfer, Dünya yüzeyinin yaklaşık %14'ünü kapsamaktadır (Malard ve Pearce, 2018). Buzullarla kaplı bu alanlarda canlılığın sürdürülmesi için gereken değişken sıcaklıkların, erime/çözülme döngülerinin olmayışı ve ihtiyaç duyulan besin maddeleri ile sıvı formda su mevcudiyetinin kıtlığı gibi nedenler ile bölgenin aşırı düşük sıcaklıklarına karşı uyum sağlamanın zorluğundan dolayı burada var olan yaşamın uykuda olduğu düşünülmektedir (Malard ve Pearce, 2018). Kutupsal mikroorganizmalar, çevre ve iklim koşullar nedeniyle yavaş büyüme ve düşük biyolojik aktivite sergilemelerine rağmen biyojeokimyasal döngüde önemli roller sergilemektedir (Nemergut vd., 2005; Malard ve Pearce, 2018). Kutup mikrobiyal topluluklarını incelemedeki ana zorluk, numune sayısını büyük ölçüde sınırlayan bölgenin uzaklığı ve aşırı iklim şartlarıdır (Nemergut vd., 2005).

Antarktika insan eliyle bozulmamış bir alan olarak kabul edilse de günümüzde okyanus akıntıları ve gelgit olayları etkisiyle böcek ilaçları, ağır metaller, kalıcı organik kirleticiler gibi insan kaynaklı çeşitli katı ve sıvı atıklara maruz kalarak kirlenmektedir (Chu vd., 2019; Colesie vd., 2022). Küresel ısınma, turistik ve bilimsel faaliyetler gibi antropojenik etkilerin yanı sıra endüstriyel gelişme ve nüfus artışı da, Antarktika'da kirliliğe neden olmaktadır (Tomova vd., 2015; Otur vd., 2023; Özaydın, 2023). İklim değişikliğine ilişkin 2021 yılına ait Hükümetlerarası İklim Değişikliği Paneli (IPCC) değerlendirme raporu, kıtadaki insan kaynaklı ilk fiziksel bozunma kanıtlarına dikkat çekmektedir ve bu durum yeni tür, ırk ve suşların tespit edilebilme ihtimalini tehlikeye sokmaktadır (Chu vd., 2019; Colesie vd., 2022; McCarthy vd., 2022). Antarktika kıtasının yaklaşık %0.18'ini teşkil eden potansiyel yaşanabilir alan habitatı değişen iklim karşısında karmaşık biyolojik tepkiler sergilemektedir. Buradaki karasal ekosistem likenler, briyofitler, ökaryotik algler ve siyanobakterilerin baskınlığından dolayı benzersizdir ve yalnızca iki vasküler bitki türü bu coğrafyada canlılığını sürdürmeyi başaramıştır. Dünyanın son derece soğuk, kuru ve rüzgarlı bu bölgesinde yalnızca sınırlı sayıda organizmanın yaşayabilmesi, yüzeyin buzla kaplı olması nedeniyle çok az bitki türünün bitki örtüsü şeklinde kolonileşebilmesi, bilim insanlarını canlılığı sınırlandıran bu gibi zorlu koşullara dayanıklılık ve direncin araştırılması konusunda çalışmalara teşvik etmektedir (Abd-Manan vd., 2014; Colesie vd., 2022).

Antarktika numunelerinden izole edilen psikrofil, psikrotolerant ve mezofil-psikrotolerant organizmalar incelendiğinde bakteri, arke ve ökaryot sınıfına dahil türleri içerdiği görülmektedir (Duarte vd., 2018; Ordóñez-Enireb vd., 2022). Antarktik sistemlerdeki prokaryotik çeşitlilik ve metabolizmalarının itici gücü hakkındaki mevcut bilgilerin derinleştirilmesine ihtiyaç söz konusudur. Morfotip bileşimine bağlı olarak, Antarktik prokaryotların genel dağılımı: basil (%27), kokobasil (%26), kok (%23) ve ipliksi formlar (%24) şeklindedir (Papale vd., 2021). Antarktika'dan izole edilen bakteriler temel olarak Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria ve Firmicutes filumlarına aittir. Temsil edilen başlıca cinsler *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas* ve *Rhodococcus* olarak ortaya çıkmaktadır. Silva vd. (2018), Antarktika Yarımadası'nın kuzeyinde bulunan Güney Shetland Adaları'ndan sağlanan örneklerden antimikrobiyal aktivite gösteren *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* ve *Candida albicans* suşları ile antiproliferatif ve antiparazitik *Pseudomonas* sp. türü tanımladıklarını bildirmektedirler.

Antarktika fungusları topraklar, penguen ve kuş tüyleri ile pisliği, likenler ile likenli kayalar, deniz ve göl suları, sünger ve makroalgler gibi çok çeşitli ortamlardan izole edilmiştir. İzole edilen türler arasında okyanus akıntıları, göçmen kuşlar, turizm gibi etkilerle mikrobiyal propagüller olarak dışarıdan süreklenen fungus türleri de yaygındır (Duarte vd., 2018). Antarktika'dan izole edilen lifli mantarlar yaygın olarak Ascomycota filumuna aittir, literatürde ise *Candida antarktika* çalışmaları hakimdir (Duarte vd., 2018; Oldham ve Kindness, 2020). *Pseudogymnoascus* ve *Mortierella* cinsinin temsilcileri de sıklıkla izole edilmiştir. Bölgeden bildirilen diğer cinsler şunlardır: *Alternaria*, *Antarktomyces*, *Ascobolus*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Cadophora*, *Capnobotryella*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Dactylella*, *Davidiella*, *Embellisia*, *Entrophospora*, *Engyodontium*, *Epicoccum*, *Eurotium*, *Fusarium*, *Gyoerffyyella*, *Lecanicillium*, *Leuconeurospora*, *Microdochium*, *Mycocentrospora*, *Penicillium*, *Phaeosphaeria*, *Phoma*, *Pseudogymnoascus*, *Tetracladium*, *Thelobolus*, *Trichoderma* ve *Verticillium* (Duarte vd., 2018). Antarktika'dan izole edilen mayaların çoğu Basidiomycota filumuna aittir ve *Cryptococcus* ile *Rhodotorula* cinsinin temsilcileri sıklıkla Antarktika ortamlarından izole edilmiştir. (Santiago vd., 2017). Yakın zamanda Antarktika'da tanımlanan *Cystobasidium portillonense*, *Piskurozyma fildesensis*, *Leucosporidium escuderoi*,

*Taphrina antarctica*, *Naganishia vaughanmartinae* suşları ve yeni fungus taksonları bölgede gizli bir çeşitliliğe işaret etmektedir (Duarte vd., 2018; Ordóñez-Enireb vd., 2022).

Papale vd. (2021), Antarktika'nın farklı bölgelerindeki üç farklı tuzlu su kaynağından aldıkları örnekler ile yaptıkları çalışmada arkeal cinslerin homojen bir şekilde dağıldığı ve özellikle *Aeropyrum*, *Desulfurococcus*, *Ignicoccus*, *Sulfolobus*, *Methanothermus*, *Methanoplanus*, *Methanosalsum* ve *Thermococcus* cinslerinin tüm tuzlu sularda ortak olarak bulunduğu sonucunu sunmaktadırlar. Tüm örneklerde baskın cinsin *Methanothermus* olduğunu bildirmektedirler.

Literatür çalışmaları değerlendirildiğinde aslında Antarktika kıtasının mikrobiyal açıdan oldukça zengin olduğu görülmektedir. Habitata özgü popülasyonlara ait gen/proteinlerin tespit ve karakterizasyonu biyoteknolojik açıdan özgün moleküllerin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

### 2.1. Antarktika Kıtası

60° Güney enleminin güneyindeki 14 milyon km<sup>2</sup>'lik tüm alanı kapsayan, yalnızca %0.35'i (49.500 km<sup>2</sup>) buzsuz alan olan ve Güney Kutbu'nu da içeren bölge Antarktika kıtası olarak adlandırılmaktadır (Bockheim vd., 2015). Ortalama buz kalınlığı yaklaşık 2000 m olan bu yer Dünya'daki en büyük tatlı su kütlesini oluşturmaktadır ve bu yeryüzünün kullanılabilir tatlı su kaynaklarının yaklaşık %70'ini buz şeklinde teşkil etmektedir (Li vd., 2022). Kıtanın NASA'ya ait Blue Marble uydusundan sağlanan görüntüsü Şekil 2.1'de gösterilmektedir. İnsan keşiflerinin yer kürede en son gerçekleştiği ve nüfus yoğunluğunun en az olduğu Antarktika'da, Dünya üzerinde tespit edilen en düşük doğal sıcaklıkların ölçülmesinin yanı sıra yıllık ortalama yağış miktarı baz alındığında bazı bölgeleri yer kürenin en kurak alanlarını oluşturmaktadır (Bockheim vd., 2015; Kırkinci vd., 2021a; Li vd., 2022). İklim değişikliğine oldukça duyarlı olan Antarktika'nın sahip olduğu buz tabakasının hızlı bir erime sürecinden geçtiği bildirilmektedir (Li vd., 2022). Velicogna vd. (2020), erime ile meydana gelen kütle kaybının yıllık 261 gt olduğunu bildirmişlerdir.



Şekil 2.1. Antarktika Kıtası'nın NASA Blue Marble veri seti kullanılarak oluşturulan uydu görüntüsü (<https://geology.com/world/antarctica-satellite-image.shtml> Erişim tarihi: 26.02.2023).

Kutup bölgeleri kuvvetli rüzgarlara, aşırı düşük sıcaklıklara, nispeten düşük yağış miktarına, yazları yüksek ve kış dönemi düşük UV radyasyonuna maruz kalmaktadır (Malard ve Pearce, 2018; Kırkinci vd., 2021a). Antarktika’da iklim profiline göre coğrafi olarak sınıflandırılmış iki bölge bulunmaktadır. Doğu’da yer alan Antarktika Yarımadası “Kıta Antarktikası” olarak adlandırılırken, daha ılıman sıcaklıklara sahip ve yaz aylarında daha fazla yağmur alan batı kesimleri “Deniz Antarktikası” olarak adlandırılmaktadır (Abd-Manan vd., 2014). Kıta Antarktika’sında, göller genellikle yüzeyle her yıl gelişen buzlanma kabarcıklarının varlığıyla karakterize edilir. Arktik muadillerinden farklı olarak, Antarktika buzlanma kabarcıkları çoğunlukla kış aylarında göl-buz örtüsünün altındaki yüksek tuz içerikli suyun kademeli olarak donmasıyla oluşan hidrostatik basınçlardan kaynaklanır (Papale vd., 2021). Antarktika, deniz bilimi modellerinde merkezi bir rol oynamakta olup küresel iklim değişikliği tartışmalarının ayrılmaz bir parçasıdır (Colesie vd., 2022). Küresel ısınma ve benzeri çevre koşullarındaki değişikliklere rağmen, Antarktika kıtası genel olarak insan kirliliği etkisiyle henüz bozulmamış bir ortam olarak kabul edilmektedir. Buz-deniz suyu ara yüzünün bakteri, mikroalg, heterotrofik protozoa ve küçük metazoanlar için zengin ve özel yaşamlarını oluşturmaktadır (Tanimura vd., 1996). Dünya üzerindeki en izole ve sert ortamları barındıran Antarktika’da meydana gelen biyolojik, fiziksel, kimyasal ve jeolojik süreçler bilim insanları için oldukça ilgi çekicidir. Bu nedenle, Antarktika Yarımadası farklı ülkelerden en yüksek araştırma istasyonu yoğunluğuna sahip bölgedir (Zelano vd., 2017; Dopchiz ve Ansaldo, 2022).

Sayıları az olsa da Antarktika’da doğal seleksiyon ve adaptasyon yetenekleriyle canlılığını devam ettirebilmiş kıtaya özgü hayvan ve bitki türleri, alg ve mikroalgler, çeşitli likenler ve mikroorganizma türleri bulunmaktadır (Anonim, 2023). Bu canlı türlerinin fizyolojik ve genetik adaptasyon mekanizmaları üzerinde gerçekleştirilen araştırmalarla, iklim değişikliği ve güncel çevresel problemlere çözüm aranmaktadır (Chu vd., 2019). Bu canlıların, genlerinin ve ürettikleri enzimlerin biyoteknolojik araştırmalarda kullanılarak başta biyokontrol ve biyo/fito-remidasyon olmak üzere farklı problemlere çözüm arama çalışmaları yoğunlaşarak devam etmektedir (Chu vd., 2019; Kırkinci vd., 2021a).

Antarktika ekosistemleri, küresel iklimsel ve biyojeokimyasal döngülere önemli katkıda bulunmakta ve biyolojik çeşitliliğin küresel değişime nasıl tepki vereceğine dair basitleştirilmiş küresel nöbetçileri temsil etmektedir. Antarktika ekosistemleri artan antropojenik baskı altındadır, ancak Antarktika biyolojik çeşitliliğinin çevresel değişime tepkilerini tahmin etme çabaları, önemli veri zorlukları nedeniyle engellenmektedir. Ekolojik süreçleri hibrit modelleme çerçevelerine dahil ederek, mevcut verilerden daha fazla yararlanılabilir ve Antarktika'daki biyolojik çeşitlilik tahminlerinin kapasitesini ve doğruluğunu artırabilir (Koerich vd., 2022).

### **2.1.1. Antarttika Mikrobiyal Çeşitliliği ve Biyoteknolojik Önemi**

Dünyada iklimsel değişiklikler, tuz madenlerinin gelişigüzel kullanımı, yanlış sulama, ağaçların tahrip edilmesi gibi nedenlerden dolayı tuzluluk ve beraberinde kuraklık stresi dünyada tarımsal üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres sorunları olarak karşımıza çıkmaktadır. Mikroorganizmalar volkanik kaynakların yüksek sıcaklıkları, kutup bölgelerinin düşük sıcaklıkları, yüksek basınca sahip okyanus derinlikleri, asidik veya alkali pH değerleri ile çok yüksek tuz konsantrasyonları gibi ekstrem çevre şartlarına adapte olarak dünya üzerinde pek çok yerde yaşamlarını sürdürebilmektedirler (Tablo 2.1) (Mechri vd., 2017). Bu tür aşırı çevresel şartlarda yaşamını sürdürerek üreyebilen mikrobiyal popülasyonlar ekstremofil olarak isimlendirilmektedirler (Stanley, 2002; Abanoz, 2016). Kutup bölgeleri gibi daimi soğuk habitatların ortalama sıcaklığı 5°C'nin altında olsa da psikrofiller adı verilen organizmalar buralara uyum sağlayarak başarıyla kolonize olabilmişlerdir (Rong vd., 2020).

Tablo 2.1. Ekstremozim kaynağı canlıların yaşama alanı ve ortam istekleri (van den Burg, 2003)

|                   | Kaynak organizmaların yaşam alanı                      | Organizmaların ortam istekleri                       |
|-------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Psikofil</b>   | Antarktik ve Arktik topraklar ve sular, buzullar       | Düşük sıcaklıklar (< 15 °C)                          |
| <b>Halofil</b>    | Tuz gölleri, kaya tuzu madenleri, tuzlalar             | Yüksek tuz konsantrasyonu (2-5 M NaCl)               |
| <b>Asidofil</b>   | Atık arıtma tesisleri                                  | Düşük pH (< pH 2)                                    |
| <b>Alkalifil</b>  | Sodalı göller, maden atıkları                          | Yüksek pH (> pH 10)                                  |
| <b>Metallofil</b> | Karasal hidrometal kaynaklar, metal işleme fabrikaları | Yüksek ağır metal konsantrasyonu (Cu, Cd, As, Zn vs) |
| <b>Barofil</b>    | Okyanus ve derin deniz tabanı                          | Yüksek hidrostatik basınç (40-130 MPa)               |
| <b>Radiofil</b>   | Nükleer atıklar                                        | Yüksek iyonize radyasyon (>25 kGy)                   |

Biyocoğrafya, gıda koruma, biyoteknoloji ve hatta astrobiyolojideki soruları yanıtlamak ve sorunları aşmak için ekstremofil canlılar kapsamlı bir şekilde incelenmektedir (Seckbach vd., 2013). Aşırı çevre şartlarında canlılığını sürdürebilen hayvan, bitki ve mikroorganizmaların bu ortamlara adaptasyon mekanizmalarının belirlenmesi, diğer canlıların bu tip aşırı ortamlara alıştırılabilmesi ve gen kaynağı olarak kullanılabilecek yeni türlerin keşfedilmesi çalışmaları için önem taşımaktadır (Ventosa vd., 1998; Quillaguaman vd., 2005). Ekstrem yaşamın araştırılmasına termofiller ışık tutmuş olsa da araştırmacılar kısa süre içerisinde soğuk, asidik, tuzlu, yüksek basınçlı ve hatta radyoaktif ortamlar gibi diğer ağır yaşam şartlarındaki çeşitliliği incelemeye başlamıştır (Seckbach vd., 2013).

Antarktika'nın tüm olumsuz koşullarına rağmen prokaryotlar bölgenin baskın biyokütlesini teşkil etmeyi başarmıştır ve göller, akarsular ve toprak dahil olmak üzere bölgenin tüm habitatlarından bakteri, fungus ve arkeler izole edilebilmiştir (Rios vd., 2022). Kutup mikroorganizmaları sert çevresel koşulların etkisiyle düşük mikrobiyal aktivite sergileseler de besin döngüsünde önemli role sahiptirler (Convey ve Stevens, 2007). Biyojeokimyasal döngüde biyoçözünürlük gibi kritik bir görevi üstlenen bu mikroorganizmalar, besin ağının temelini oluşturmaktadırlar (Vincent, 2000; Jakosky vd., 2003). Bölgede organik karbon kaynağının az olmasından dolayı azot, fosfor ve hatta metanol parçalama yeteneğine sahip mikroorganizmalara rastlanmaktadır (Laybourn-Parry vd., 2002; Shivaji, 2017). Bölgenin sulak kesimlerinde daha yaygın rastlanan *Planctomycetes*, amonyumun anaerobik

oksidasyonuna katılarak azot döngüsü ve üretiminde önemli rol üstlenmektedir (Pearce vd., 2009; Malard ve Pearce, 2018). Kuru kayalıklarda kolonize olmuş en yaygın takson *Gloeocapsa* cinsidir. Kuru vadilerde öne çıkan aktinobakterileri ise *Arthrobacter* spp., *Brevibacterium* spp. ve *Corynebacterium* spp. oluşturmaktadır (Adams vd., 2006; Cary vd., 2010; Vyverman vd., 2010). Kuzey Victoria Land'da termal olarak ısınan bölgelerdeki bazı sıcak topraklardan termofilik bakterilerin izole edildiği de bildirilmektedir. Bunların dışında kıttadan; *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria* ve *Pseudomonas* suşları da izole edilmiştir (Cary vd., 2010; Kırkinci vd., 2021a).

Bakterilerle birlikte fungal ve arkeal topluluklar da Antarktik mikrobiyal çeşitliliğin önemli bir parçasıdır. Funguslar çok çeşitli substratları kolonize ederek farklı çevresel koşullara dayanabilmekte ve bu özelliklerinden dolayı tüm dünyada yayılım göstermektedirler. Antarktika kaynaklı funguslar, ekstremofilik uyartılabirlikleri nedeniyle araştırmaların odak noktasını oluşturmaktadır (Duarte vd., 2018). Antarktika fungal topluluklarında biyolojik döngüye katkı sağlayan en önemli varyeteleri *Candida antarctica*, *Ascomycota* ve *Basidiomycota* oluşturmaktadır (Ruisi vd., 2007; Duarte vd., 2018; Oldham ve Kindness, 2020). Antarktika mikrofungusları arasında buraya taşınan ancak Antarktika koşullarında büyümeyen kozmopolit propagüller bulunsa da buraya adapte olmuş düşük sıcaklıklarda üreyip büyüeyebilen, hızlı sporlanan ve çoğunlukla psikrotolerant yerli formlar da bulunmaktadır (Ruisi vd., 2007; Rios vd., 2022). Dry Valley gibi kıttanın en uç ve izole bölgelerinde fizyolojik ve morfolojik adaptasyonlar sergileyen endemik yerel türler lokalize olmuştur. Antarktika fungusları ve diğer kuru ve soğuk habitatlardan kıttaya taşınan funguslar, düşük sıcaklıklara, tekrarlanan donma ve çözölme döngülerine, düşük su mevcudiyetine, ozmotik strese, kurumaya, düşük besin mevcudiyetine ve yüksek UV radyasyonuna adapte olacak şekilde evrimleşmişlerdir (Ruisi vd., 2007).

Yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilen enzimatik endüstriyel uygulamaların daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirilebilmesi için Antarktika gibi ekstrem soğuk iklimlerden izole edilecek organizma ve sahip oldukları enzimler son derece önem arz etmektedir. Rios vd. (2022), Antarktik kuş yuvalarından endüstriyel öneme sahip proteolitik bir enzim olan keratinaz için yeni bir üretici olan psikrotolerant *Pedobacter* sp. 3.14.7 suşunu tanımlamışlardır. Bu suştan sağladıkları geniş pH

aralığında kararlı metalloproteaz, 238 saat sonra %85'lik bir aktivite sergilemiştir. Bu enzim ekstraktı 20 °C'de pamuklu kumaştan kan lekesini tamamen çıkarabilmektedir. İlk olarak Victoria Land'deki Vanda Gölü'nün 9 metre derinliğindeki bir tortudan izole edilen *Candida antarktika*'dan sağlanan  $\beta$ -bileşenli ve yüksek derecede stereospesifik dayanıklı lipazlar biyoteknoloji, biyokimya ve biyomühendislikte biyoyakıt üretimi, karbohidradların çözünmesi, amin/amid üretimi gibi çok çeşitli uygulamalarda kullanılmıştır (Oldham ve Kindness, 2020).

Bu fizyolojik adaptasyonlar, potansiyel biyoteknolojik uygulamalarla benzersiz ikincil metabolitlerin üretilmesine neden olabilir. Antarktika mikroorganizmalarının adaptasyonunun metabolik mekanizmaları henüz yeterince çalışılmamış olsa da, mevcut birçok araştırma düşük sıcaklıkta yüksek katalitik aktivite, antrifiriz protein üretimi, yüksek doymamış yağ asidi içeriği gibi metabolik özelliklerinden dolayı potansiyel biyoteknolojik uygulamalarını işaret etmektedir (Ordóñez-Enireb vd., 2022). Styczyński (2022), toplamda 427 Antarktika bakterisinin sekonder metabolitlerinin biyokimyasal özelliklerini, biyolojik aktivitelerini ve biyoteknolojik potansiyellerini i) biyosürefektanlar, ii) sideroforlar, iii) karotenoidler ve iv) pyomelanin bakımından analiz ettiği tez çalışmasında, verimli bir şekilde siderofor, biyosürefektan ve pigment içeren 16 suş belirlemiştir. Ayrıca, üç suşun yonca büyümesinin uyarılması ve topraktan demir biyoyararlanımının artırılması konusunda umut verici sonuçlar elde ettiğini ve bu bakterilerin ve metabolitlerinin agroteknik faaliyetlerde kullanılabileceğini bildirmektedir.

Hidrokarbonların biyoremediasyonu, özellikle yakıt ve diğer yağlarla ilgili olarak son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Zakaria vd., 2021). Mikroorganizmalar aşırı ve zorlu ekosistemlerde baskın yaşam formlarıdır ve biyojeokimyasal döngülerde kirleticilerin mineralizasyonunda rol oynarlar (Rios vd., 2022). Centurion vd. (2019), Antarktik biyoçeşitliliğinin rezistom (ağır metal, antibiyotik, tuzluluk vs. direnci) profilleri üzerine yaptıkları çalışma sonucunda, bölgede antropojenik kaynaklı olabilecek kirlilik unsurlarına karşı tespit ettikleri direnç/tolerans mekanizmalarının, biyoremediasyon potansiyelleri bakımından dikkate değer olduğunu bildirmişlerdir.

Antimikrobiyal direnç küresel ölçekte önemli bir sağlık sorunudur (White ve Hughes, 2019) ve son yıllarda antibiyotiklere dirençli suşların artması sonucu antimikrobiyal direncin hızla yayılması dünyada endişe yaratmaktadır. Bu durum antibiyotiklere dirençli suşlar üzerine tesir edebilecek daha etkili ve yeni antibiyotiklerin bulunabilme çalışmalarını bir öncelik haline getirmektedir (Hwengwere vd., 2022). Antarktika'nın uzaklığı, ulaşım zorluğu ve çalışmayı zorlaştıran iklimsel faktörleri buradan yapılan bakteri ve plazmit izolasyon çalışmalarını sınırlandırmakta olduğundan burada yapılacak çalışmalar yeni bakteri türlerinin karakterize edilebilme ve yeni antimikrobiyal ajanların ortaya çıkarılma potansiyelinden dolayı oldukça önem taşımaktadır (Kobori vd., 1984). Sınırlı insan faaliyeti nedeniyle çok düşük antimikrobiyal direnç düzeyine sahip olduğu varsayılan Antarktika, antimikrobiyal direnç evriminin erken aşamalarını, iletimini destekleyen mekanizmaları ve etkileşimlerini anlamak için potansiyel model ortamları temsil etmekte olmakla birlikte bugüne kadar yapılan çalışmalar sınırlıdır (Hwengwere vd., 2022). İnsan kaynaklı bozunmanın sınırlı olduğu bu coğrafyada yapılacak araştırmalar ile insan kaynaklı antimikrobiyal direncin doğal olarak gerçekleşen dirençle karşılaştırılması ve endemik vahşi yaşamın bu direnç yayılmasındaki rolünün tespiti mümkün olacaktır (Chu vd., 2019; Hwengwere vd., 2022). Öte yandan, Antarktika kıtasının zorlu çevresel şartları, yeni antibiyotik keşfine neden olacak potansiyel antimikrobiyal özelliklere sahip farklı metabolitlerin üretilmesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Ordóñez-Enireb vd., 2022).

Otur vd. (2023), Antarktika Ardley Adası'ndan sağlanan göl suyu örneklerinden *Flavobacterium azizsancarii* adını verdikleri psikrotolerant özellikte yeni bir tür tanımlamışlardır. 4-30 °C gibi geniş bir üreme sıcaklığına sahip bu bakteri, %5'lik dizel parçalama ve krom (Cr), nikel (Ni), kurşun (Pb), bakır (Cu) ve çinko (Zn)'ya 2.88 ila 2.14 mM konsantrasyon aralığında tolerans göstererek hidrokarbon ve ağır metal kirliliğine karşı biyoremediasyon potansiyeli sunmaktadır. Söz konusu bakterinin antibiyotik duyarlılık testi sonucunda sergilediği çoklu ilaca dirençli profili, ihtiva ettiği biyofilm, soğuk şoku proteini ve oksidatif strese tepki genleri ile sergilediği proteaz, amilaz ve lipaz aktiviteleri sayesinde biyoteknolojik bir öneme işaret etmektedir.

İnan vd. (2023), yaptıkları çalışmada, Antarktika'ya özgü mikroalg *Chlorella variabilis*'in büyüme ortamı parametrelerinin manüpile edilerek ılıman koşullarda verimli bir şekilde üretilebileceğini ve böylece ticari önemi olan karotenoidler için potansiyel bir kaynak sağlanabileceğini vurgulamaktadırlar. Kırkinci vd. (2021b), Galindez Adası'ndan toplanan su örneklerinden ilk defa pestisit parçalayan bakteri tanımlayarak literatüre kazandırmışlardır. TaeBurcu001 ve TaeBurcu002 adını verdikleri bu bakteriler, pestisit etken maddesi olan dalaponu parçalayarak karbon kaynağı olarak kullanabilmektedirler. Bu özelliklerinin genetik mekanizmaları aydınlatılarak tarım ilacı ile kirlenmiş alanlarda canlılığını sürdürebilen transgenik bitkiler geliştirilebilir, böylece hem bu alanların yeniden tarımsal üretime kazandırılabilmesi hem de tarım ilacı ile kirlenmiş toprakların ıslahının yapılabilmesi imkanı doğacaktır.

## **2.2. Psikrofil/Psikrotolerant Bakteriler**

Soğuk çevreler dünya biyosferinin %85'ini oluşturmakta olup, biyosferde ölçülen sıcaklığının dörtte üçü 5 °C'nin altında kalarak yaşamın sürdürülmesinde büyük bir caydırıcı unsur oluşturmaktadır (Awasthi vd., 2019). Kutuplar gibi sürekli düşük sıcaklığa sahip ortamlarda canlılığını devam ettirebilen organizmalar psikrofiller olarak adlandırılmaktadır (Rong vd., 2020). Gezegenimizin en eski kolonicileri olan mikroorganizmalar, eşsiz metabolik işlevleri sayesinde aşırı ekolojik ortamların iyi bilinen sakinleridir (Awasthi vd., 2019). 15-25 °C arasında optimum üreme sıcaklığı isteğine sahip mikroorganizmalar psikrotolerant olarak sınıflandırılırken büyüme için 15 °C' ye eşit veya daha düşük optimum sıcaklığa ihtiyaç duyanlar psikrofilik mikroorganizmalar olarak isimlendirilmektedir (Duarte vd., 2018). Bu organizmalar, soğuk stresine karşı yalnızca hayatta kalmaz, bu tür zorlu ortamlarda hayatta kalabilmelerini sağlayacak mekanizmalar geliştirerek ortama uyum sağlamaktadırlar. Psikrofilik mikroorganizmalar, hücresel işlevlerini ciddi anlamda etkileyen soğuk stresi ve öldürücü soğukların neden olduğu fizikokimyasal kısıtlamalarla başa çıkmak için, zar akışkanlığını koruyan çoklu doymamış yağ asitlerinin içeriğini artırmak, buzlanma ve donma önleyici proteinler üretmek ve uygun çözünenleri biriktirmek gibi bir takım adaptasyon mekanizmaları geliştirmişlerdir. Ayrıca, düşük sıcaklıklarda artan oksijen çözünürlüğünün neden olabileceği oksidatif stresi azaltmak için dioksijenazları kodlamaktadırlar. Bu adaptatif mekanizmalardan bir diğeri ise ani sıcaklık düşüşü karşısında translasyon

ve protein katlanmasına yardımcı olarak hücrel donmaya karşı direnç sağlayan bir takım proteinleri üretmeleridir. Bu proteinlerin başlıcalarını soğuk şoku proteinleri (CSP) ve soğuk alıştırma proteinleri (CAP) teşkil etmektedir (Abraham vd., 2020; Rong vd., 2020).

### 2.2.1. Soğuk Şoku Proteinleri (CSP)

IPCC (2022)'ye göre, küresel sıcaklıklardaki istikrarsızlık, sıcak hava dalgaları ve soğuk dönemlerin sıklığı ve yoğunluğundaki artış nedeniyle mahsul verimi üzerine olumsuz etkiler oluşturmaktadır. Soğutma (<20 °C) ve donma (<0 °C) olarak sınıflandırılan soğuk stresi, bitki büyüme ve gelişimini sınırlandırarak mahsul verimini direk olarak etkilediği gibi canlıların yaşam döngülerini ve coğrafi dağılımlarını da etkileyen başlıca çevresel faktörlerden birini teşkil etmektedir (Eom vd., 2022). Biyolojik sistemler UV ışını, pH, tuzluluk, basınç ve sıcaklık gibi stres koşullarından etkilenmektedirler (Üzümcü, 2009). Sıcaklığın düşmesi ile membran akışkanlığını değiştirerek hücre zarının sıvı kristal fazdan jel benzeri katı faza fiziksel faz geçişi, üşüme stresinden kaynaklanan birincil olay olarak bilinir ve yetersiz enerjiye, iyon sızıntısına ve reaktif oksijen türlerinin birikmesine neden olur (Üzümcü, 2009; Eom vd., 2022). Eom vd. (2022), yaptıkları çalışma sonucu soğuk stresi ile mücadele etmede antioksidan mekanizmayı güçlendirerek bitkilerde soğuğa toleransı geliştirmenin önemli bir temel oluşturacağını bildirmişlerdir.

Genel olarak düşük sıcaklık, mRNA'da ikincil yapı oluşumunu indükleyerek düşük sıcaklıkta protein sentezinin uygun şekilde gerçekleşmesini engellemektedir (Üzümcü, 2009; Abraham vd., 2020). Ancak soğuğa adapte olmuş bakteriler, düşük sıcaklıkta protein sentezleme mekanizmasının düzgün çalışması için CSP ve CAP gibi proteinleri üreterek, düşük sıcaklıklarda transkripsiyon, translasyon ve protein katlanmasını doğru şekilde gerçekleştirebilmektedir (Üzümcü, 2009; Abraham vd., 2020). CSP'ler, soğuk şoku ya da sıcaklıktaki ani düşüşlerle başa çıkmak için hem ökaryotik hem de prokaryotik sınıfta bulunan ve soğuğa adaptasyonda önemli görev üstlenen önemli biyomoleküllerdir (Awasthi vd., 2019). CSP'ler sıcaklık düşüşü sırasında üretilen, büyük ölçüde korunmuş, DNA bağlanma proteinleri ile yapısal olarak ilişkili protein ailesidir (Awasthi vd., 2019) ve bu proteinler soğuk etkisi ile katlanarak ikincil yapı oluşturan mRNA'ların açılmasını teşvik eden moleküler şaperonlar olarak görev yapmaktadır (Zhang vd., 2018; Xu vd., 2021). CSP'ler ssDNA ve RNA'ya iş birliği içerisinde bağlanarak fonksiyon

göstermektedirler (Graumann & Marahiel, 1999). CSP'lerin türler arasında DNA bağlama bölgelerinde yüksek oranda korunduğu bildirilmektedir (Xu vd., 2021). Literatürdeki ilk CSP, *E. coli*'de tanımlanan CspA proteinidir ve *E. coli*'nin inkübasyon sıcaklığı düşürüldüğünde biriken toplam proteinin %10'unu teşkil etmektedir (Graumann & Marahiel, 1999; Phadtare vd., 1999; Awasthi vd., 2019). Daha sonraları bu protein ile homoloji gösteren birçok protein psikrotrofik, psikrofilik, mezofilik, termofilik ve hatta hipertermofillere kadar çeşitli bakterilerde tanımlanmıştır (Phadtare vd., 1999; Üzümcü, 2009). Soğuk şok tepkisi sırasında bakterilerde meydana gelen global değişiklikleri analiz etmek için genom çapında yöntemler kullanan bir çalışmada (Zhang vd., 2018) RNazR ve CspA'nın başlıca oyuncular olduğu, RNazR'nin yanlış katlanmış RNA'ların parçalanmasından sorumlu olduğu gözükürken, CspA'nın de translasyonun olabilmesi için çift zincirli RNA'yı açtığı bildirilmiştir (Lindquist ve Mertens, 2018). CspA proteini, ekspresyonun stressiz şartlarda olduğu gibi gerçekleşmesi için 5'UTR yapısının modüle edilmesinde rol almaktadır (Zhang vd., 2018). CspA'nın amino asit dizisi ökaryotik Y-box proteini ile %43 özdeşlik göstermekte olup esasında her iki protein de oldukça korunmuş "soğuk şok domain" (CSD) içermektedirler. CSD içeren proteinlerin değişken nükleik asit bağlanma aktiviteleri bulunmakta olup gen transkripsiyonunu, DNA replikasyonunu ve onarımını etkilemektedirler (Zhou vd., 2021). Bakteriler, hayvanlar ve yüksek bitkilerde bulunan yüksek oranda korunmuş bir nükleik asit bağlama alanı olan CSD'nin yapısı, tek sarmallı DNA/RNA bağlanma için gerekli olan iki konsensüs RNA bağlanma motifine (RNP-1 ve RNP-2) sahip beş sarmallı bir  $\beta$ -varil tabakası içerir. Bakteriyel CSP tek bir CSD'den oluşur ve RNA'lardaki ikincil yapıları dengesizleştiren RNA şaperonları olarak görev yapar (Sasaki vd., 2013). Toplamda, *E. coli*'de tanımlanan dokuz CSP'den sadece üçünün (CspA, B ve G) soğuk şokla indüklenebilir olduğu, CspC ve E'nin 37 °C'de kromozom yoğunlaşması ve bölünmesi ile ilişkili olduğu görülürken CspD'nin üremenin durağan fazının başlangıcında karbon açlığı sırasında indüklendiği bildirilmektedir (Graumann & Marahiel, 1999). *Bacillus subtilis* ile yapılan bir çalışmada ise durağan fazda indüklenen başlıca proteinlerden birbirinin homologlarının asidik CspB ve CspC olduğu bildirilmektedir (Graumann & Marahiel, 1999). *B. subtilis*'teki soğuk ile indüklenen diğer protein CspD'nin ise durağan faza geçişle uyarılmadığı belirtilmiştir. CspB ve CspC kodlayan genlerin silinmesinin, durağan fazda hücre degradasyonuna yol açtığı literatürde

bildirilmektedir (Graumann & Marahiel, 1999). Psikrotrofik *Pseudomonas fragi* ile yapılan çalışmada, sıcaklığın 30 °C'den kademeli olarak 20 ve 5°C'ye düşürülmesiyle lag fazı boyunca 20 °C'de 25, 5 °C'de de 17 farklı proteinin sentezlendiği bildirilmektedir (Üzümcü, 2009).

Bao vd. (2023), psikrotrof *P. fragi* D12'de soğuk adaptasyon mekanizmasının aydınlatılması için yaptıkları çalışmada sıcaklığın 30 °C'den 15 °C'ye indirildiğinde hücresel tepkinin; hücre zarı akışkanlığının korunması, hücre dışı proteinlerinin ifadesinin artırılması ve uyumluluk çözünenlerinin içeriğinin artırılması gibi istikrarlı metabolik ortam sağlanmasına yönelik olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, sıcaklığın 15 °C'den 4 °C'ye indirilmesiyle de temel tepkinin transkripsiyon ve translasyonun geri kazanılmasını sağlayan moleküler şaperonların ve transkripsiyon faktörlerinin ifadelerinin artışı şeklinde olduğunu belirtmişlerdir. Bakterilerin soğuğa tepki vermesinin ana mekanizmalarından biri, RNA'nın stabil bir ikincil yapı oluşturmalarını engelleyerek transkripsiyon ve translasyonun devamlılığını sağlamaktır (Xu vd., 2021). CSP'ler büyüme ve farklılaşma, sindirim, virülans ve diğer fizyolojik ve biyokimyasal süreçler dahil olmak üzere çeşitli diğer hücresel işlevlerle de bağlantılıdır ve bu nedenle, CSP'ler düşük sıcaklıklarda iyileşme, büyüme ve diğer bakteriyel hücre fonksiyonları için çok önemli biyomoleküllerdir (Xu vd., 2021). Valerie vd. (1997), psikrotrofik *P. fragi* K1'i üç farklı sıcaklıkta (30 °C, 20 °C ve 5 °C) inkübe ederek gerçekleştirdikleri çalışmada soğukla indüklenen proteinler arasında daha önce ısı aşılama proteini (TapA) ve ısı şoku proteini (Hsp) belirlediklerini bildirmektedirler. Öte yandan, Zhou vd. (2021), laktat üreten bir termofilik suş olan *Bacillus coagulans* 2-6'da bir RNA şaperon proteini olan CspL'yi bildirmişlerdir. Bu çalışmada bir soğuk şok şaperonu olan CspL'nin farklı RNA bağlanma hedefleri olduğu ve gerek normal gerekse de yüksek sıcaklıklarda bakteri ve mayaların gelişimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir.

Abiyotik stres şartlarına dayanıklı transgenik bitki üretmek amacıyla Yu vd. (2017), *E. coli* *cspA* ve *cspB* genlerini bitkinin tercih edeceği kodon dizilerine uygun şekilde modifiye ederek *Arabidopsis* bitkisinde ifadelerini sağlamışlardır. İlgili çalışmada, transgenik bitkilerde kuraklık ve tuzluluk stresi altında kontrol grubuna kıyasla hayatta kalma, çimlenme ve birincil kök oluşturma yeteneklerinin arttığı belirlenmiştir. RNA sekanslama ve qPCR analizi, sentetik CSP olan *SeCspA*'nın aşırı ifadesinin strese duyarlı diğer genlerin ekspresyonunu artırdığını bildirmektedirler.

### 2.3. *Pseudomonas* sp. ve Biyoteknolojik Önemi

*Pseudomonas* cins tanımı, ilk olarak 1872 yılında Schroeter tarafından *Bacterium aeruginosum*' un basit tanımından ve daha sonra 1895' de Migula'nın *Pseudomonas* cinsi için yaptığı öneriden bu yana önemli ölçüde değişmiştir. Cinsin taksonomik özellikleri, taksonomik kriterlere ve her an mevcut olan araçlara göre, ilk tanımdan bu yana yaklaşık 150 yıl boyunca değişiklik göstermiştir. Suşların kapsamlı morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal karakterizasyonu için 1926'da Dooren de Jong tarafından ortaya atılan yöntemleri 1966' da Stanier ve arkadaşları fenotipik özelliklerin tanımlanması ve tür gruplarının tanımlanması için kullanmışlardır. 1981 yılında Sneath ve arkadaşları, yayınlanan fenotipik kayıtları sayısal taksonomi ile analiz ederek cins içinde tanımlanan gruplamaları iyi bir şekilde analiz etmişlerdir (Kahlon, 2016). Mevcut sınıflandırmaya göre *Pseudomonas*, 191 çeşitlendirilmiş tür içeren Pseudomonadaceae familyasına dahil aerobik, gram-negatif bir Gammaproteobakteri'dir. Katalaz pozitif ve kemoorganotrofik olan *Pseudomonas*'ın bazı türleri bitki patojenidir (Das vd., 2020). *Pseudomonas* sp., et, balık ve süt gibi ürünlerin bozulmasına neden olabilecek lipazlar ve proteazlar dahil birçok enzim üretmektedirler. Psikrotrofik olmaları soğutulmuş gıda bozulmasında bu bakterileri önemli bir sorun haline getirmektedir (Wang vd., 2017).

*Pseudomonas* sp., muazzam biyosentetik kapasite, çok çeşitli ikincil metabolitlerin üretimi ve bir dizi enzim ile karakterize edilirler. Biyopolimer üretimi, organik kimyasal kirleticilerin biyoremediasyonu, bitki hastalıklarının ve toprak kaynaklı patojenlerin biyokontrolü ile endüstriyel uygulamalar için gerekli olan sıcaklık, pH, toksinlerin ve çözücülerin varlığı gibi aşırı çevresel koşullara karşı yüksek derecede tolerans gösterir. Çok sayıda çalışma, *Pseudomonas* türlerinin mantar patojenleriyle antibiyotik ve hücre dışı enzim salgılayarak ve ortamdaki demir için rekabet ederek gelişimlerini engellediğini bildirmektedir (Bai vd., 2020). Ayrıca, heterolog proteinlerin ve moleküllerin üretimi gibi biyoteknolojik uygulamalar için geniş genetik potansiyelleri vardır. *Pseudomonas putida* KT2440, yabancı DNA'nın gen klonlanması ve ekspresyonu için "genel olarak güvenli kabul edilen" (GRAS) olarak onaylanmıştır (Kahlon, 2016).

*Pseudomonas* sp., bitki büyümesini teşvik eden bakteriler (PGPB) olarak literatürdeki yerlerini almışlardır (Olanrewaju vd., 2017). Styczynski vd. (2022), yeni bitki büyümesini teşvik edici suş tanımlama üzerine Antarktika kutup izolatu *Pseudomonas* sp. ANT\_H12B ile yaptıkları çalışmada, suşun sürgün uzamasını %26 ve toplam biyokütleyi %46'ya kadar artırdığını bildirmişlerdir. Bir başka Antarktika izolatu olan ve polihidroksialkonat (PHA) üretme yeteneği olan psikrotolerant ekstremofil *Pseudomonas* sp MPC6'nın tüm genom dizisinin çıkarıldığı çalışmada, izolatın toluen, fenol kloroaromatikler ve TNT gibi toksik aromatik bileşikleri metabolize edebilecek gen mekanizmasına sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca, *Pseudomonas* sp MPC6 izolatının, düşük sıcaklık değerlerinde yüksek ağır metal (arsenik, kadmiyum, bakır) konsantrasyonları varlığında yaşamını sürdürdüğünü bildirmişlerdir (Orellana-Saez vd., 2019). Antarktika izolatları *Pseudomonas* UMAB-08 ve UMAB-40 ile PHA sentaz genleri ve PHA sentezi ile ilişkili gen kümeleri üzerine yapılan çalışmada, araştırmacılar daha önce tanımlanmamış bir PHA sentaz (PhaC) sınıfı tanımlayarak literatüre kazandırmışlardır (Tan vd., 2020).

Son yıllarda kutup izolatu psikrofil/psikrotolerantlardan soğuk uyarılabilir enzim çalışmaları enzimoloji alanında gelişmekte olan bir araştırma alanı haline gelmiştir (Salwoom vd., 2019). Araştırmacılar Antarktika izolatu *Pseudomonas* sp. LSK25'den soğuk uyarılabilir ve organik çözücülere dayanıklı LSK25 lipazı başarılı bir şekilde klonlayarak, *E. coli*'de aşırı bir şekilde ifadelendirebilmişlerdir. Söz konusu enzimin 5-30 °C ve pH 6-8 aralığında stabil lipolitik aktivite sergilediği bildirilmiştir (Salwoom vd., 2019).

*Pseudomonas* cinsine ait türler Arktik numunelerden de izole edilmiştir. Abraham vd. (2020), Kuzey Kutbu'ndaki Svalbard takımadalarından olan Ny-Alesund'dan izole ettikleri fakültatif psikrofil *Pseudomonas psychrophila* MTCC12324'ün genom dizilimini ve karşılaştırmalı proteom analizini yaptıkları çalışmayla soğuk ortama dayanmak için benimsenen metabolik yollara ve hücresel süreçlere ışık tutmuşlardır. Çalışma kapsamında CSP'leri ve soğuk ile ilişkili şaperon geni tanımlamışlardır. Soğuk stresi altında temel hayatta kalma yollarının ve enerji metabolizmasında yer alan faktörlerin değişmediği ancak, yağ asidi uzamasında yer alan enzimlerin ve tanımladıkları soğuk ilişkili şaperonların soğuk stresi altında arttığını bildirmişlerdir. Arktik *Pseudomonas*'lar ile gıda patojenlerinin büyümesinin inhibe edilmesi üzerine yapılan çalışmada *Pseudomonas* sp.

AALPS.10.MNAAK.13'ün antibakteriyel etkisini gösterildiği bir araştırmanın bulguları, soğuk adaptif Arktik bakterilerin yeni sekonder metabolit kaynağı olma potansiyelinin umut verici olduğunu göstermektedir (Marcolefes vd., 2019).

Abraham vd. (2020), Arktik izolat *P. psychrophila* MTCC12324 genomunu Illumina HiSeq 2000 sistemi ile çıkarmış ve altı soğuk şoku protein (*csp*) geni tespit etmişlerdir. Bu soğuk şoku proteinlerinin nükleik asit şaperonları olarak soğuk stresi sırasında translasyonu başlatmaya yardımcı olduğunu bildirmişlerdir. Panicker vd. (2010), 18 adet Antarktika *Pseudomonas* izolatı üzerine yaptıkları çalışmada, izolatların hepsinde soğuk alıştırma proteini geni *capB*'nin bulunduğunu fakat soğuk şok proteini geni *cspA*'nın tespit edilemediğini bildirmektedirler.

#### 2.4. Mevcut Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, eşsiz ve ekstrem iklim koşullarına sahip Antarktika tatlı su örneklerinden psikrofilik bakteri izolasyonunun gerçekleştirilerek, literatürde düzensiz ve yetersiz olan soğuk şoku proteinleri araştırmalarına katkı sağlamak amaçlanmıştır. Antarktika'nın zorlu şartlarına uyum sağlayabilen canlıların adaptasyon mekanizmalarının aydınlatılması, aşırı soğuk ve don olayı gibi tarımsal üretimi olumsuz etkileyen abiyotik stres koşullarıyla mücadele uygulamalarında önemli sağlayabilme potansiyeline sahiptir (Panicker vd., 2010; Kristoffersen vd., 2021). Çalışma kapsamında *P. fragi* AC suşunda ilk kez soğuk şok proteinlerini kodlayan *csp2* ve *csp5* genleri klonlanmış, literatürdeki diğer soğuk şoku protein genleri ile benzerlikleri ortaya konmuştur. Elde edilen nükleotit dizi bilgileri NCBI gen bankası veri tabanına girilerek literatüre yeni bilgiler kazandırılmıştır. Ayrıca, proteinlerin biyolojik işlevleri için çok önemli olan 3B yapıları (Xu vd., 2021) ortaya konmuş ve ilgili soğuk şoku proteinlerinin *in silico* karakterizasyonu yapılarak içerdikleri domainler ve interaksiyon içinde oldukları genler tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada ilk kez Antarktika kaynaklı bir *P. fragi* suşunun soğuk stresi altında soğuk şoku protein genlerinin ifade seviyelerindeki değişimler incelenmiştir. Literatüre eklenecek yeni bilgilerin yanı sıra, çalışma kapsamında belirlenecek aday genlerin abiyotik stres ile mücadele için gerçekleştirilecek ileriki biyoteknolojik çalışmalarda kullanılma potansiyeli çalışmanın özgün değerini oluşturmaktadır.

### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1. Mikroorganizmanın Eldesi**

Çalışmamızda kullanılan AC izolatı, Antarktika'daki Ardley Adası (62°12'48.45"S 58°56'17.88"W)'ndan İstanbul Teknik Üniversitesi (İTÜ) Kutup Araştırmaları Merkezi (PolReC) koordinasyonunda, Türkiye Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı tarafından desteklenen, Ocak-Mart 2019 tarihlerinde gerçekleştirilen Türkiye Antarktika Seferi (TAEIII)'nde ve yürütücülüğü Dr. Öğr. Üyesi Yılmaz KAYA'ya ait "Genetic analysis of herbicides (Dalapon and Bromoxynil) fragmenting psychrophilic and psychrotolerant microorganisms studies" (Permit No17-2019) (Ek-A) başlıklı proje kapsamında temin edilen göl suyu örneklerinden izole edilmiştir. Aseptik şartlarda alınan tatlı su örneği soğuk zincir bozulmadan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji laboratuvarına taşınmıştır. Bakteri izolasyonu için, temin edilen tatlı su örneğinden 100 µL %1.5 Agar içeren Nutrient Broth (NB) (Ek-B) plaklarına yayılmış ve ilgili plaklar 15 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilmiştir (Labwit ZWYR-240 Shaker, Almanya). Oluşan koloniler saf kültür elde etmek amacıyla taze besiyeri plaklarına aktararak alt kültürleri oluşturulmuştur. Saf sıvı kültürden 2 mL kültür peleti %20 gliserolde çözündürülmüş ve elde edilen saf kültür stokları Nutrient Broth besiyerinde -86 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### **3.2. Besiyerleri**

Çalışmada kullanılan besiyeri içerikleri Ek-B'de verilmiştir.

#### **3.3. Tamponlar ve Çözeltiler**

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltilere ait içerik Ek-C'de verilmiştir.

#### **3.4. Kimyasallar ve Enzimler**

Çalışmada kullanılan kimyasallar ve enzimler Ek-D'de verilmiştir.

#### **3.5. AC İzolatından Genomik DNA İzolasyonu**

AC izolatından genomik DNA (gDNA) izolasyonu için CTAB temelli (Cutting ve Horn, 1990) ve tuz ile çöktürme prensibine dayalı (Pospiech ve Neumann, 1995) iki farklı prosedür kullanılmıştır.

Cutting ve Horn (1990)'da açıklanan yöntem uyarınca, NB besiyerinde kültüre alınan 2 mL bakteri örneği 15 ml hacmindeki falkon tüplere alınarak 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edilerek çöktürülmüş (Hettich Universal 320 R, Almanya) ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücre çökeltisi 567 µL TE tamponunda (Ek-C) süspanse edilmiştir. Süspansiyon üzerine TE tamponunda çözünmüş 100 mg/mL konsantrasyonundaki lizozim (Ek-D) çözeltisinden 24 µL, 20 mg/mL konsantrasyonundaki proteinaz K (Ek-D)'dan 30 µL ve %10'luk SDS (Ek-D)'den 30 µL ekledikten sonra ters yüz yapılarak karıştırılmıştır. Karışım 37 °C'ye ayarlanmış su banyosunda (Lab Companion BW-10H, Kore) 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından karışıma ilk olarak 100 µL hacminde 5 M NaCl (Ek-D) eklenip karıştırıldıktan sonra 800 µL CTAB/NaCl çözeltisi (Ek-C) ilave edilmiştir. Nazikçe karıştırılan numune 65 °C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra karışıma 1:1 oranında fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) (Ek-C) eklenerek süt beyazı bir renk oluşumu gözlenene kadar 8-10 defa ters yüz edilmiştir. İstenilen renk oluşumunun ardından faz ayrımının oluşması için 13.000 rpm'de 10 dk santrifügasyon uygulanmış ve üst fazdan 1 mL kadar alınarak 2 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Yeni tüpe alınan faz üzerine 0.7X (700 µL) hacimde izopropanol (2-propanol, Ek-D) ilave edilerek karıştırılmıştır. 13.000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmış ve çöken gDNA üzerine 1 mL %70'lik etanol (Ek-D) eklenerek hafif pipetajla yıkanmıştır. Sonrasında, 13.000 rpm'de tekrar 5 dk daha santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmış ve etanolün tamamen uçması için örneğin bulunduğu tüp 37 °C'ye ayarlanmış ısıtıcı blokta (Major Science RS-232, Tayvan) kapağı açık bir şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Etanol uçurulduktan sonra 25 µL TE tamponu eklenerek gDNA'nın 37 °C'de çözünmesi beklenmiştir (Kurt, 2011).

Pospiech ve Neumann (1995)'da tanımlanan prosedürü uygulamak üzere, öncelikle AC stoğundan 50 µL alınıp 250 mL'lik erlen içerisindeki 50 mL NB besiyerine inoküle edilmiş, 200 rpm çalkalamada ve 15 °C'de 16 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen gece kültürünün 30 mL'si 2000 rpm'de 15 dk santrifüj edilmek suretiyle hücreler toplanmış ve bu hücreler, 5 mL SET tamponu (Ek-C) kullanılarak vorteks (VELP ZX4; Avrupa) ve pipetajla yeniden süspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonuna son konsantrasyonu 2 mg/mL olacak şekilde TE tamponunda çözündürülmüş 100 mg/mL'lik lizozimden 100 µL ilave edilerek 37 °C'de 1 saat

inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra karışıma, 20 mg/mL konsantrasyonundaki proteinaz K'dan 140 µL ve %10'luk SDS'den 600 µL eklenmiş ve karışım ters yüz edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra karışıma 5 M NaCl'den 2 mL eklenerek karıştırmaya devam edilmiştir. Süspansiyona 5 ml kloroform (Ek-D) ilavesinden sonra 20 °C'de 30 dk ara ara ters yüz ederek gerçekleştirilen inkübasyonun ardından çözelti 6000 rpm devir ve 20 °C'de 15 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni bir falkon tüpe aktarılmıştır. Süpernatantın üzerine 0.6X hacimde izopropanol eklenerek karıştırılmış ve 3 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Kısa inkübasyonun ardından gözle görülebilir hale gelen gDNA mikropipet yardımıyla alınarak 15 mL'lik falkon tüpe aktarılmış ve 5 mL %70'lik etanol eklenerek pipetaj uygulamasıyla durulanmıştır. Santrifüj sonrasında etanol uzaklaştırılmış, havayla kurumaya bırakılan gDNA'daki etanol iyice uçtuktan sonra 1 mL TE tamponu eklenerek gDNA'nın çözünmesi için 55 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir (Kieser vd., 2000; Kurt, 2011).

İzole edilen gDNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Thermo Scientific NanoDrop 2000c (Kanada) ile spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve DNA bantları 100 mL için 4 µL EtBr (Ek-D) içeren %0.8'lik agaroz jelde UV ışık altında görüntülenmiştir (Bio Rad Gel Doc™ XR+, U.S.A.). Elektroforetik ayırlama Bio Rad PowerPac™ Basic (Singapur) elektroforez sisteminde, 80 V'da 50 dk olarak uygulanmıştır. Elektroforetik ayırlama için 5'er µL gDNA örneği 1'er µL 1X yükleme boyası (Ek-D) ile jele yüklenmiştir ve elektroforez 1X TAE tamponunda (Ek-C) gerçekleştirilmiştir.

### **3.6. Bakteriyel İzolatın Moleküler Karakterizasyonu**

Kutup izolatının moleküler karakterizasyonu düşük mutasyon oranı nedeniyle türler arasında korunmuş olan ve bu özellikleri sayesinde genotipik akrabalık ve taksonomik kimliklerin belirlenerek filogenetik konumun tespitine olanak sağlayan, yaklaşık 1500 baz çifti uzunluğundaki 16S ribozomal RNA gen sekansından faydalanılarak gerçekleştirilmiştir (Lane, 1991; Weisburg vd., 1991). 16S rRNA geninin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) temelli klonlanması için Tablo 3.1'de bilgileri verilen evrensel primerler ve Q5 DNA Polimeraz (Ek-D) enzimi kullanılarak Tablo 3.2'deki bileşenler ve Tablo 3.3'deki koşullarla reaksiyon uygulanmıştır.

Tablo 3.1. 16S rRNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan üniversal primer çifti

| Primer              | 5' ----- 3' Sekans   | T <sub>m</sub> | Primer Boyutu | Ürün Boyutu | Referans    |
|---------------------|----------------------|----------------|---------------|-------------|-------------|
| <b>27F (BactF)</b>  | AGAGTTTGATCATGGCTCAG | 62             | 20            | 1465-1520   | Lane (1991) |
| <b>1492R (AIIR)</b> | GGTTACCTTGTTACGACTT  | 59             | 19            |             |             |

Tablo 3.2. 16S rRNA geninin klonlanması için kullanılan PZR bileşenleri

| Bileşen                     | Bileşen Konsantrasyonu | Kullanılan Miktar | Son Konsantrasyon |
|-----------------------------|------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>dH<sub>2</sub>O</b>      |                        | 12.4              |                   |
| <b>Q5 Reaksiyon Tamponu</b> | 5X                     | 4 µL              | 1X                |
| <b>dNTPs</b>                | 10 mM                  | 0.4 µL            | 200 µM            |
| <b>Primer Karışımı</b>      | 10 µM                  | 2 µL              | 0.5'er µM         |
| <b>Kalıp DNA</b>            | 300 ng                 | 1 µL              |                   |
| <b>Q5 DNA Polimeraz</b>     | 2 U/µL                 | 0.2 µL            | 0.4 U             |
| <b>Reaksiyon Hacmi</b>      |                        | <b>20 µL</b>      |                   |

Tablo 3.3. Q5 DNA Polimeraz için tavsiye edilen sıcaklık döngüleri

|                         | Sıcaklık             | Süre             |
|-------------------------|----------------------|------------------|
| <b>İlk Denatürasyon</b> | 98 °C                | 30 sn            |
| <b>Denatürasyon</b>     | 98 °C                | 10 sn            |
| <b>Bağlanma</b>         | T <sub>m</sub> -5 °C | 30 sn            |
| <b>Uzama</b>            | 72 °C                | 1000 bç/15-30 sn |
|                         | 25-35 Tekrar         |                  |
| <b>Final Uzama</b>      | 72 °C                | 5 dk             |

### 3.6.1. 16S ribozomal RNA Amplikonların Dizilenmesi ve Filogenetik Ağacın Oluşturulması

Çalışma kapsamında PZR ile elde edilen amplikonlar jelden kesilerek Macherey-Nagel Nucleospin® Gel and PCR CleanUp kiti (Almanya) (Ek-D) kullanılarak saflaştırılmıştır. DNA dizileme işlemi BM Labosis (Ankara, Türkiye) firmasından hizmet alımı yoluyla AB3730xl cihazı kullanılarak yapılmıştır.

İlgili amplikona ait sekans verisi ile Clustal W (Thompson vd., 1994) kullanılarak dizi hizalaması gerçekleştirilmiş ve Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) uygulamasındaki veri tabanı ile karşılaştırılmıştır. Buradan sağlanan sekans verileri ile Neighbor-Joining algoritması ve Kimura iki parametre testi kullanılarak MEGA X yazılımında (Kumar

vd., 2018) filogenetik ağaç oluşturulmuştur. Dış grup olarak *Psychroserpens* sp. NJDZ02 verileri kullanılmıştır.

### 3.7. *Pseudomonas fragi*'de *csp* Genlerinin Taranması

*P. fragi*'de soğuk şoku proteini ve soğuk stresi ile ilişkili diğer genlerin belirlenmesi için <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/taxonomy/296/> adresinde tam genomu dizilenmiş ya da kromozom sekansı tamamlanmış *P. fragi* suşlarına ait nükleotit dizi verilerinde “cold, antifreeze ve acclimation” anahtar kelimeleri kullanılarak tarama yapılmıştır. (Erişim Tarihi:09.09.2022). Listelenen *csp* genlerinden aynı olanların belirlenebilmesi için ilgili genlerin baz dizileri blastn ve amino asit dizileri blastp kullanılarak karşılaştırılmıştır.

### 3.8. *csp* Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Klonlanması

Polimeraz Zincir Reaksiyonu kullanılarak gen klonlama tekniği, klonlanacak genleri hedefleyen primer çiftlerinin tasarlanması, kalıp olarak kullanılacak DNA'nın izolasyonu ve bu DNA ile PZR gerçekleştirilerek ilgili genlerin amplifikasyonu ile elektroforetik olarak ayrılması ve tanımlanmasını kapsamaktadır. Primer tasarımı için NCBI'dan çekilen hedef genlerin baz dizileri Ek-E'de verilmiştir.

#### 3.8.1. Klonlama Primerlerinin Tasarımı

Genlerin klonlaması amacıyla kullanılacak primer çiftlerinin tasarımı <https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> web adresindeki çevrimiçi Primer3 uygulaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir. NCBI'nın Primer-BLAST uygulaması ile oluşturulan primerlerin ilgili genomlarda bağlanma durumları kontrol edilmiştir. Primerlerin dimer ve hairpin gibi ikincil yapı oluşturma analizleri Thermo Fisher firmasının internet sitesindeki Multiple Primer Analyzer uygulaması ile gerçekleştirilmiştir (<https://www.thermofisher.com/tr/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>). Primerlerin bağlandıkları bölgeler Şekil 3.1'de, tasarlanan primerlerin dizileri, oluşturdukları ampikon büyüklükleri ve bağlandıkları gen dizileri bilgisi Tablo 3.4'te verilmiştir. İlgili primer çiftleri Sentebiolab (Ankara, Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir.

### csp2 primerinin tasarımı için kullanılan baz dizisi

>DBC.Csp2 CP021986.1:1267550-1267762

GGGGTTTC**CAAAGCGCACATTTCTGACTA**TGATAGCTCGGTGTGCCAGTTGGCCTGAGCAGCACAGTAC  
TACTGAAAATATAAGTTTCTTGGAGATACACC**ATG**TCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAAAATGGTTC  
AACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTCATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTCTGTACACTTCAA  
AGCTATCGAAAGCGACGGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCTTCTGTGGCTGAGAAAG  
GCCAAAAGGGTATGCAAGCTGCACAGGTTCGTCCGGAG**TAA**ATCTCCTTCGAACAAAAAACCCTGTC  
CATGTGACGGGGTTTTTTATGCCTG**ACAGAACGTTAGCCGAGTT**CACGCGGGTAATGACCGCCTGGT  
CATCC

### csp5 primerinin tasarımı için kullanılan baz dizisi

>P121.Csp5 CP013861.1:3921210-3921422

TAC**AACCCGTTCTGCGTCTCTTA**CTTTCTGCAACCCAGCACCAAGTCTCTTACACAACCTAAGAGGCT  
GTCATTAATTGTTAGCGTCAAGGAATTAAGAA**ATG**TCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTT  
AACGACGAGAAAGGTTTTGGTTTCATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGC  
CATTACAGGGTAATGGCTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAGGGCC  
AAAAAGGCCTGCAGGCTGATGAAGTGAAGCAGAAGGC**TAA**GCTTTCTCGCGTTGAAAAGCCTCTGAT  
GGTGACATCAGAGGCTTTTTTGTGGCG**TAATTCCGTAAGATGGCGCT**TTTCCTTCACGAGACCTGC  
CATGT

Şekil 3.1. Primer çiftlerinin ilgili gen dizilerine bağlanma pozisyonları. (Nükleotit erişim numaraları sırasıyla WP\_017132437.1 ve WP\_019693243.1'dir. Kırmızı işaretli diziler primer dizileri, gri renkli bazlar ise genleri 5' ve 3' bölgelerinde konumlanan nükleotit dizileridir).

Tablo 3.4. *P. fragi* AC'de *csp* genlerinin amplifikasyonu amacıyla tasarlanan primer çiftleri

| Primer | 5' ----- 3' Sekans                                | Primer Boyutu | Amplikon Boyutu | Klonladığı Genler                      |
|--------|---------------------------------------------------|---------------|-----------------|----------------------------------------|
| csp2   | F CAAAGCGCACATTTCTGACTA<br>R AACTGCGGCTAACGTTCTGT | 20<br>20      | 378             | <i>csp1-csp2-csp3-csDbp1</i>           |
| csp5   | F AACCCGTTCTGCGTCTCTTA<br>R AGCGCCATCTTACGGAATTA  | 20<br>20      | 385             | <i>csp4-csp5-csp6-csp7-csp8-csDbp2</i> |

### 3.8.2. *csp* Genlerinin Amplifikasyonu

PZR uygulamasında yüksek doğruluklu sentez yapan Thermo Fisher Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz (Ek-D) enzimi kullanılmıştır. Reaksiyon, firmanın enzim için tavsiye ettiği standart bileşenler ve standart sıcaklık döngülerinde bazı optimizasyonlar yapılarak uygulanmıştır. Primerler için erime sıcaklıkları ( $T_m$ ) kullanılan enzim için önerilen hesaplayıcı, primerleri sentezleyen firma, primer tasarımında kullanılan uygulama ve Primer-BLAST uygulaması Tablo 3.5'de görüldüğü gibi birbirinden farklı değerler olarak sunduğu için PZR uygulaması TouchDown PZR olarak gerçekleştirilmiştir. PZR içerik (Tablo 3.6) ve koşulları (Tablo 3.7) aşağıda sunulmuştur.

Tablo 3.5. *csp* genlerinin klonlama primerlerine ait erime sıcaklıkları (°C)

| Primer | T <sub>m</sub><br>(Primer3<br>v. 0.4.0) | T <sub>m</sub><br>(Primer-<br>BLAST) | T <sub>m</sub><br>(Primer<br>Kataloğu) | T <sub>m</sub><br>(Thermo<br>Calculator) |
|--------|-----------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|
| Pf-1   | 59.9                                    | 57.1                                 | 49.7                                   | 62.0                                     |
| Pf-2   | 59.7                                    | 57.1                                 | 49.7                                   | 62.4                                     |

Tablo 3.6. *csp2* ve *csp5* primerleri ile klonlamada kullanılan reaksiyon bileşenleri

| Bileşen              | Bileşen<br>Konsantrasyonu | Kullanılan<br>Miktar | Son<br>Konsantrasyon |
|----------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|
| dH <sub>2</sub> O    |                           | 11 µL                |                      |
| HF Tamponu           | 5X                        | 4 µL                 | 1X                   |
| dNTPs                | 10 mM                     | 0.4 µL               | 200 µM               |
| DMSO                 |                           | 0.4 µL               | %2                   |
| Primer Karışımı      | 10'ar µM                  | 2 µL                 | 0.5'er µM            |
| Kalıp DNA            | 250 ng/µL                 | 2 µL                 | 25 ng/µL             |
| Phusion HF Polimeraz | 2 U/µL                    | 0.2 µL               | 0.02 U/µL            |
| Reaksiyon Hacmi      |                           | 20 µL                |                      |

Tablo 3.7. *csp* genlerinin klonlanmasında uygulanan TouchDown PZR sıcaklık döngüleri

|                  | Sıcaklık | Süre  |
|------------------|----------|-------|
| İlk Denaturasyon | 98 °C    | 5 dk  |
| Denaturasyon     | 98 °C    | 10 sn |
| Bağlanma         | 58-49 °C | 30 sn |
| Uzama            | 72 °C    | 12 sn |
| 9 Tekrar         |          |       |
| Denaturasyon     | 98 °C    | 10 sn |
| Bağlanma         | 49 °C    | 30 sn |
| Uzama            | 72 °C    | 12 sn |
| 30 Tekrar        |          |       |
| Final Uzama      | 72 °C    | 2 dk  |

### 3.8.3. Klonlanan *csp* Genlerinin Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi

*P. fragi* AC'de *csp* genlerine özgü tasarlanan primerlerle amplifikasyon sonucunda oluşan PZR ürünleri agaroz jelden kesilerek Nucleospin® Gel and PCR CleanUp kiti (Macherey-Nagel, Almanya) (Ek-D) ile saflaştırılmıştır. İlgili fragmentlerin Sanger dizi analizi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma Merkezi (KİTAM) tarafından AB3130 Genetic Analyzer (U.S.A.) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

### 3.9. *P. fragi* AC'de Soğuk Stresinin *csp* Gen İfade Profili Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

#### 3.9.1. *P. fragi* AC Suşunun Üç Farklı Sıcaklıkta İnkübasyonu

*P. fragi* AC suşunda farklı gelişim sıcaklıklarının *csp* gen ifadeleri üzerine etkisinin belirlenmesi amacıyla bakteri stoğundan alınan 100 µL hacmindeki inokulum 50 mL NB besiyerine ekilmiş, 15 °C'de 200 rpm çalkalama ile 48 saat inkübe edilerek ön kültür elde edilmiştir. 48 saat sonunda OD<sub>600</sub> değeri yaklaşık 2.0 olan ön kültürden 500 µL alınıp 50 mL NB besiyerine ekim yapılarak RNA izolasyonu yapılacak kültürler oluşturulmuştur. Bu kültürler bakterinin optimum üreme performansı sergilediği 15 °C'de, soğuk uygulamasının CSP gen profili üzerine etkisinin gözlemlenebilmesi amacıyla 4 °C gibi düşük bir sıcaklıkta ve soğuk etkisinin olmadığı 28 °C'de inkübasyona alınmıştır. Her sıcaklıkta inkübasyon üç biyolojik replika olacak şekilde gerçekleştirilmiş ve üreme eğrisi oluşturulmuştur. Ayrıca, 48. saatin sonunda kültürlerden RNA izolasyonu için buz içerisinde 2 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerin 4 °C ve 9000 rpm'de 5dk santrifüjlenmesiyle elde edilen hücre peleti RNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

#### 3.9.2. RNA İzolasyonu

*P. fragi* AC suşuna ait üç farklı sıcaklıktaki NB kültürlerinden 48. saatte alınan hücre peletleri RNA izolasyonunda kullanılmıştır. Bu amaçla Nucleospin® RNA Kiti (Macherey-Nagel, Almanya) (Ek-D)'nde önerilen prosedür kullanılmıştır. RNA'lardaki DNA kirliliklerinin giderilmesi için Invitrogen firmasına ait TURBO DNA-free™ Kit (Litvanya) (Ek-D)'in standart sprosodürü ile DNaz uygulaması gerçekleştirilmiştir. RNA'ların kalite ve miktarları nanodrop ile spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

### 3.9.3. Kantitatif PZR (qPCR)

*P. fragi* AC'nin üç farklı sıcaklıkta (4, 15 ve 28 °C) 48 saat inkübasyonu sonucunda *csp* genlerinin ifadelerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla qPCR uygulanmıştır. Öncelikle cDNA'ların sentezinde High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti (Thermo Fisher Scientific, Litvanya) (Ek-D) kullanılmış ve Tablo 3.8'deki içerik ve koşullar takip edilmiştir. GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, U.S.A) (Ek-D) için kullanılan qPCR içerik ve koşulları ise Tablo 3.9'da verilmektedir (Baş vd., 2020). Zar geçirgenliğinde rol oynayan translokaz öncü proteininin alt birimini kodlayan ve sürekli eksprese olan *secA* geninin ifadesi referans alınmıştır (Bai vd., 2020). Uygulama Bio-Rad CFX X96 (U.S.A.) cihazda, üç biyolojik replikanın her birinden iki teknik replika şeklinde gerçekleştirilmiştir. qPCR için kullanılan primerler ve özellikleri Tablo 3.10'da verilmektedir.

Tablo 3.8. cDNA sentezi için reaksiyon içerik ve koşulları

| Bileşen                         | Hacim        | Sıcaklık | Süre   |
|---------------------------------|--------------|----------|--------|
| 10X RT tamponu                  | 2 µL         | 25 °C    | 10 dk  |
| 25X dNTP karışımı               | 0,8 µL       | 37 °C    | 120 dk |
| 10X RT random primer            | 2 µL         | 85 °C    | 5 dk   |
| Multi Scribe™ Ters Transkriptaz | 1 µL         | 4 °C     | ∞      |
| Total hücre RNA'sı              | 2000 ng      |          |        |
| dH <sub>2</sub> O (nükleazsız)  | Değişken     |          |        |
| <b>Total Hacim</b>              | <b>20 µL</b> |          |        |

Tablo 3.9. qPCR için uygulanan içerik ve koşullar

|                      | Sıcaklık | Süre  |               | Bileşen                        | Hacim        |
|----------------------|----------|-------|---------------|--------------------------------|--------------|
| <b>Denaturasyon</b>  | 95 °C    | 2 dk  |               | cDNA                           | 1 µL         |
| <b>Amplifikasyon</b> | 95 °C    | 15 sn | 39X           | 5X GoTaq™ qPCR Mix             | 10 µL        |
|                      | 60 °C    | 30 sn |               | Primer karışımı                | 2 µL         |
| <b>Erime eğrisi</b>  | 65 °C    | 5 sn  | -0,5 °C/döngü | dH <sub>2</sub> O (nükleazsız) | 7 µL         |
|                      | 95 °C    |       |               | <b>Total hacim</b>             | <b>20 µL</b> |

Tablo 3.10. qPCR'da kullanılan primerler ve özellikleri

| Primer | 5' ----- 3' Sekans      | T <sub>m</sub> | Primer Boyutu | Ürün Boyutu |
|--------|-------------------------|----------------|---------------|-------------|
| qcsp-2 | F GCTTCATCACTCCTCAAGGTG | 58.6           | 21            | 115         |
|        | R TTCTCAGCCACGAAGGAAAC  | 58.1           | 20            |             |
| qcsp-5 | F GGTTCAACGACGAGAAAGGG  | 58.9           | 20            | 139         |
|        | R CCTTGAAGTGCATGAAGGT   | 58.2           | 20            |             |
| secA   | F GTTTAACTTCAATGCGCTGT  | 51.8           | 20            | 114         |
|        | R GTCAGGCCACAGGTATTCGTA | 53.8           | 20            |             |

### 3.9.4. qPCR Verilerinin Rölatif Kantifikasyonu ve İstatistiksel Analiz

Rölatif kantifikasyon, mRNA ifade seviyelerinin bağıntılı değişimini ölçmektedir (Livak ve Schmittgen, 2001). Gen ifadelerinin rölatif kantifikasyonu  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  metoduna göre aşağıdaki formülle hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001; Zhuo vd., 2021). Kontrol olarak 15 °C'ye ait örnekler kullanılmıştır. qPCR verilerinin istatistiksel analizi için tek yönlü ANOVA ve Bonferroni *post hoc* testi uygulanmış, istatistiksel önem değerleri \*\*\* ( $p<0.001$ ), \*\* ( $p<0.01$ ) ve \* ( $p<0.05$ ) şeklinde ifade edilmiştir (Zhuo vd., 2021). Analizler Graphpad Prism uygulaması kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Rölarif ifade oranı (R)} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

$$-\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T \text{ CSP} - \Delta C_T \text{ secA})_{4 \text{ veya } 28^\circ\text{C örnekleri}} - (\Delta C_T \text{ CSP} - \Delta C_T \text{ secA})_{\text{kontrol grubu}}$$

$$\Delta C_T = C_T (\text{csp}) - C_T (\text{secA})$$

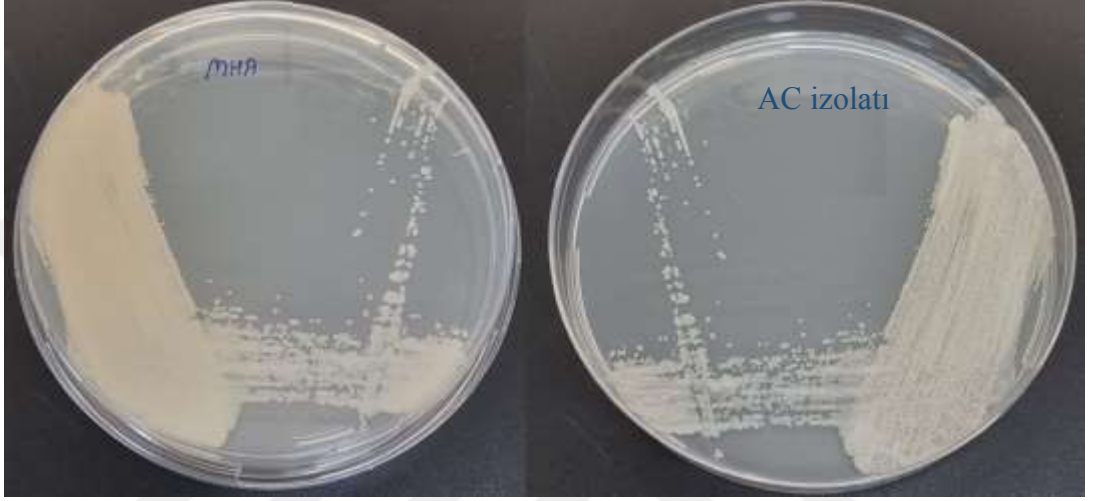
### 3.10. *P. fragi* AC'ye ait CSP Proteinlerinin *in silico* Karakterizasyonu

Nükleotit dizisi belirlenen *csp* genlerinin ürünü olan CSP'lere ait amino asit dizileri, proteinlerin moleküler ağırlığı, *pI* değerleri ve yarılanma ömürleri gibi özellikleri ExPASy (<https://www.expasy.org/>) ProtParam uygulamasından sağlanmıştır. Bilinen ve tahmin edilen protein-protein etkileşimlerinin araştırılması için STRING (<https://string-db.org/>) (Oliveira vd., 2007) veri tabanından yararlanılarak *P. fragi* AC-CSP'lerinin diğer proteinlerle etkileşim ağı belirlenerek fonksiyonel zenginleştirme analizi yapılmıştır. Protein modelleme ve 3B yapı tahmini için Phyre2 (Kelley vd., 2015) ve I-TASSER (Yang & Zhang, 2015) web portalları kullanılmıştır.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Ardley Adası Göl Suyu Örneğinden AC Suşunun İzolasyonu

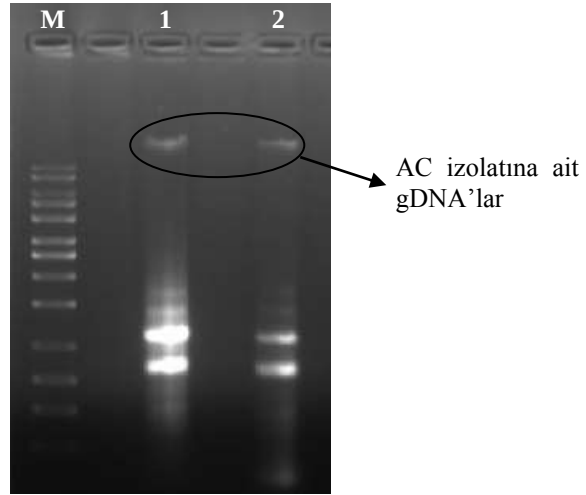
Ardley Adası göl suyu örneğinden yapılan ekimler sonucunda krem renk morfolojiye sahip küçük bir koloni seçilerek % 1.5 agar içeren Mueller Hinton Broth (MHB) besiyeri (Ek-B) plaklarına çizgi ekim tekniği ile transfer edilmiştir. 15 °C’de 48 saat inkübe edildikten sonra elde edilen saf kültür AC olarak adlandırılmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Kutup izolatının MHA (agar içeren MHB) besiyerindeki koloni morfolojisi.

### 4.2. AC Suşundan gDNA İzolasyonu ve PZR ile 16S rRNA Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

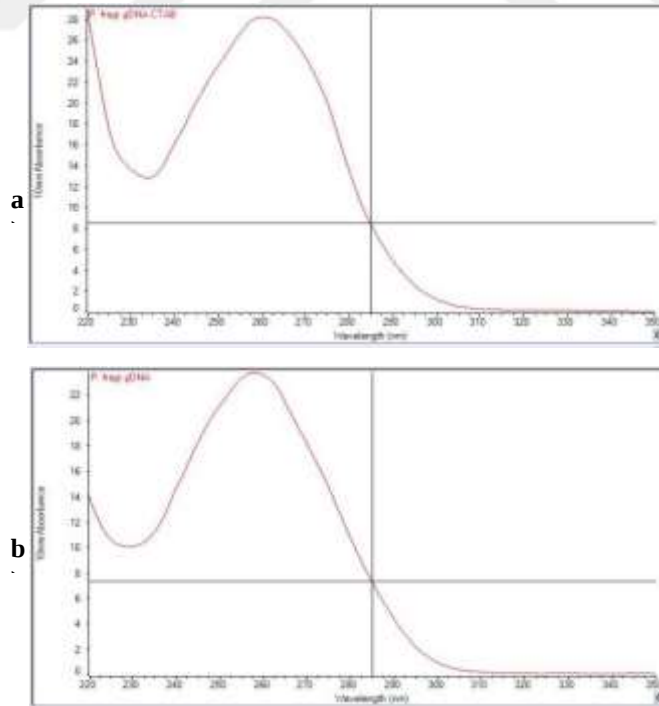
15 °C’de 48 saat inkübe edilen AC kültürlerinden iki farklı yöntem ile izole edilen gDNA’lar %0.8 konsantrasyonundaki agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.2). gDNA’ların nanodrop ölçümleri sonucunda elde edilen yoğunluk değerleri Tablo 4.1’de ve saflık durumlarını gösteren grafikler Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.2. AC izolatına ait iki farklı yöntemle izole edilen gDNA'larının agaroz jel elektroforezi sonucu. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder (Ek-G), 1: Cutting ve Horn (1990) CTAB yöntemi ile elde edilen gDNA, 2: Pospiech ve Neumann, (1995) yöntemi ile izole edilen gDNA.

Tablo 4.1. AC suşuna ait gDNA'larının konsantrasyonları ve saflık değerleri

| İzolasyon Yöntemi         | Konsantrasyon (ng/μL) | 260/280 Değeri | 260/230 Değeri |
|---------------------------|-----------------------|----------------|----------------|
| Cutting ve Horn, 1990     | 1310.5                | 2.38           | 2.29           |
| Pospiech ve Neumann, 1995 | 1279.3                | 2.29           | 2.28           |

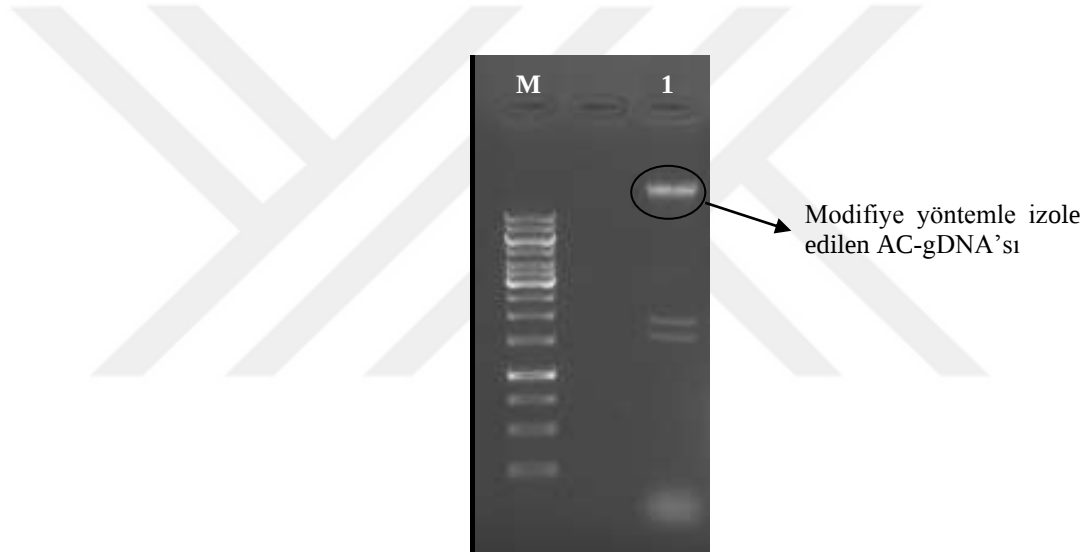


Şekil 4.3. AC gDNA'ların UV spektrumları. a) Cutting ve Horn (1990) CTAB yöntemi ile izole edilen gDNA'ya ait UV spektrumu, b) Pospiech ve Neumann (1995)'in yöntemi ile izole edilen gDNA'ya ait UV spektrumu.

AC-gDNA'ların gerek jel fotoğrafları gerekse de nanodrop değerleri/absorbans grafikleri incelendiğinde saflık kriterleri olan  $A_{260/280}$  değerinin  $\sim 1.8$  ve  $A_{260/230}$  değerinin ise  $\sim 2.0 - 2.2$  olduğu görülmüştür. Bundan dolayı, Pospiech ve Neumann (1995) protokolü RNaz eklenerek tekrarlandığında saflık değerleri istenen değer aralığına daha yakın olan ve oldukça konsantre bir gDNA elde edilmiştir (Tablo 4.2 ve Şekil 4.4).

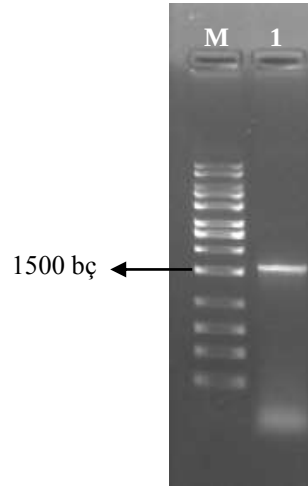
Tablo 4.2. Modifiye edilmiş Pospiech ve Neumann (1995) protokolüyle izole edilen gDNA'nın konsantrasyon ve saflık değeri

| İzolasyon Yöntemi         | Konsantrasyon (ng/ $\mu$ L) | 260/280 Değeri | 260/230 Değeri |
|---------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|
| Pospiech ve Neumann, 1995 | 1156.4                      | 2.11           | 2.02           |



Şekil 4.4. Modifiye edilmiş Pospiech ve Neumann (1995), yöntemi ile izole edilen AC-gDNA'sının görünümü. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder, 1: AC-gDNA.

Şekil 4.4'teki AC-gDNA'nın kalıp olarak kullanıldığı ve universal primerlerle gerçekleştirilen PZR sonucunda yaklaşık 1500 bp büyüklüğünde amplikon elde edilmiştir (Şekil 4.5). Söz konusu amplikon jelden kesilerek saflaştırılmış ve nükleotit dizisi belirlenmiştir.



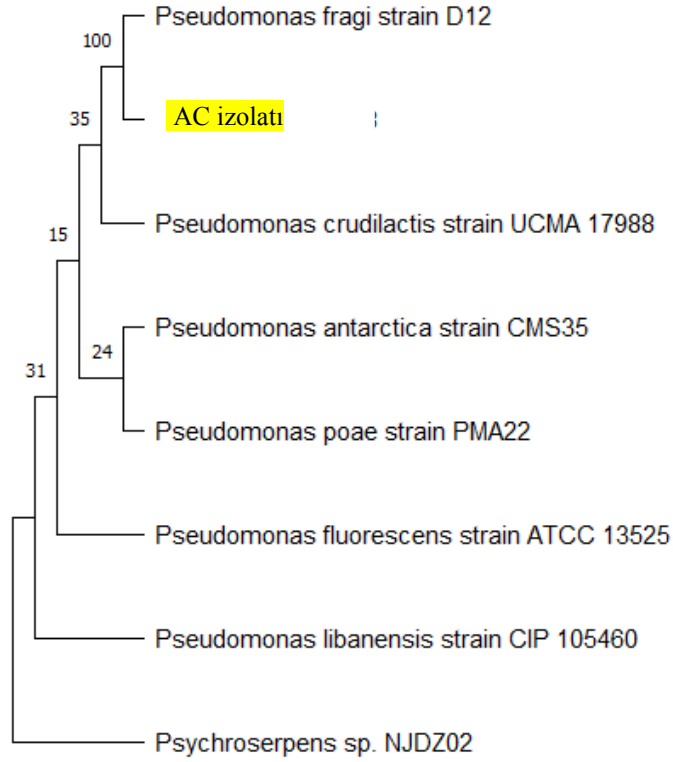
Şekil 4.5. AC suşuna ait 16S rRNA geninin PZR amplifikasyonu. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder (Ek-G), 1: AC suşuna ait 16S rRNA amplikonu.

#### 4.3. Sanger Dizileme ve Filogenetik Dendogramın Oluşturulması

Sanger dizileme yöntemi kullanılarak elde edilen AC suşuna ait 16S rRNA bölgesinin nükleotit dizisi BLAST programı aracılığı ile veri tabanındaki dizilerle karşılaştırılmıştır (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tablo 4.3). BLAST uygulaması ve tüm genomu çıkarılmış benzer şuşlarla yapılan karşılaştırma ile oluşturulan filogenetik ağaçta (Şekil 4.6) AC suşunun 16S rRNA kısmi nükleotit dizisinin *Pseudomonas fragi* D12 suşununki ile %100 dizi özdeşliği gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nedenle AC suşu *Pseudomonas fragi* AC suşu şeklinde isimlendirilmiştir. İlgili nükleotit dizisi NCBI-GenBank veritabanına OR150484 numarası ile kaydedilmiştir.

Tablo 4.3. AC suşunun 16S rRNA dizi analizi ve hizalama sonuçlarına göre benzerlik yüzdeleri

| Benzerlik Gösterilen Suş                                   | Erişim Numarası            | Benzerlik Oranı |                |
|------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------|
|                                                            |                            | Sorgu           | Yüzde Özdeşlik |
| <i>P. fragi</i> CP BD19 16S rRNA, partial sequence         | <a href="#">MH304254.1</a> | 100%            | 99.86%         |
| <i>P. fragi</i> Sneb811 16S rRNA, partial sequence         | <a href="#">MF351558.1</a> | 100%            | 99.86%         |
| <i>Pseudomonas</i> sp. PCH24 16S rRNA, partial sequence    | <a href="#">KY628842.1</a> | 100%            | 99.86%         |
| <i>Pseudomonas</i> sp. N5(2012) 16S rRNA, partial sequence | <a href="#">JQ782495.1</a> | 100%            | 99.86%         |
| <i>P. fragi</i> D12 chromosome, complete genome            | <a href="#">CP104861.1</a> | 99%             | 99.78%         |



Şekil 4.6. 16S rRNA baz dizisine göre oluşturulan filogenetik ağaç.

#### 4.4. *P. fragi* csp Genlerinin *in silico* Tespiti

NCBI veritabanında genom/kromozom dizilemesi tamamlanmış *P. fragi* suşlarına ait sekanslar (Tablo 4.4) taranmış ve 10 adet soğuk ilişkili genler (8 adet soğuk şok protein (*csp*) geni, 2 adet soğuk şok DNA-bağlanma protein ailesi geni) tespit edilmiştir. CSP'ler "Csp1, 2, 3...,8" şeklinde ve soğuk şok DNA-bağlanma proteinleri CsDbp1 ve 2 şeklinde isimlendirilmiştir.

Tablo 4.4. NCBI veri tabanında genom dizileri bulunan *P. fragi* suşları

| Belirlenen Suş                                   | Erişim Numarası                      | Sekanslanma Durumu |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| <i>P. fragi</i> NL20W ( <i>Refereans genom</i> ) | <a href="#">ASM1547627v1</a>         | Tam genom          |
| <i>P. fragi</i> P121                             | <a href="#">ASM154326v1</a>          | Tam genom          |
| <i>P. fragi</i> NMC25                            | <a href="#">ASM212832v1</a>          | Tam genom          |
| <i>P. fragi</i> A13BB                            | <a href="#">ASM1576751v1</a>         | Tam genom          |
| <i>P. fragi</i> DBC                              | <a href="#">ASM220545v1</a>          | Kromozom           |
| <i>P. fragi</i> NRRL B-727                       | <a href="#">IMG-taxon 2667527431</a> | Kromozom           |

İlgili genlerin suşların genomlarında bulunma durumu Tablo 4.5'te gösterilmektedir. 10 adet genin nükleotit dizileri BLAST analizi ile karşılaştırıldıklarında *csp4-5-6-7-8-cspDbp2* ve *csp1-2-3-cspDbp1* genlerinin aynı/özdeş oldukları belirlenmiştir.

Tablo 4.5. NCBI BLAST uygulaması kullanılarak oluşturulan gen benzerlik tablosu\*

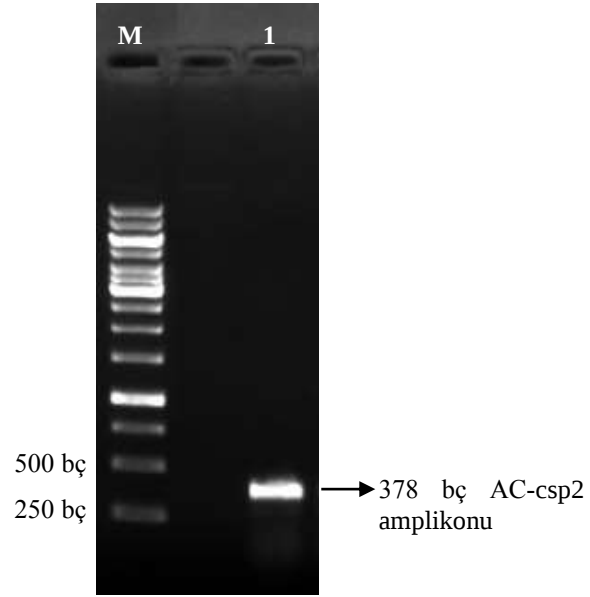
| <i>P. fragi</i> | NL20W                          | P121                           | NMC25                          | DBC                            | A13BB                          | NRRL B-727                       |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1               | <i>csp4</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csp5</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csp6</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csp2</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csp8</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csDbp1</i><br>213 bç<br>70 aa |
| 2               | <i>csp1</i><br>213 bç<br>70 aa |                                |                                | <i>csp7</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csp3</i><br>213 bç<br>70 aa | <i>csDbp2</i><br>213 bç<br>70 aa |

\* Arkaplan renkleri BLAST sonucuna göre aynı olan genleri belirtmektedir.

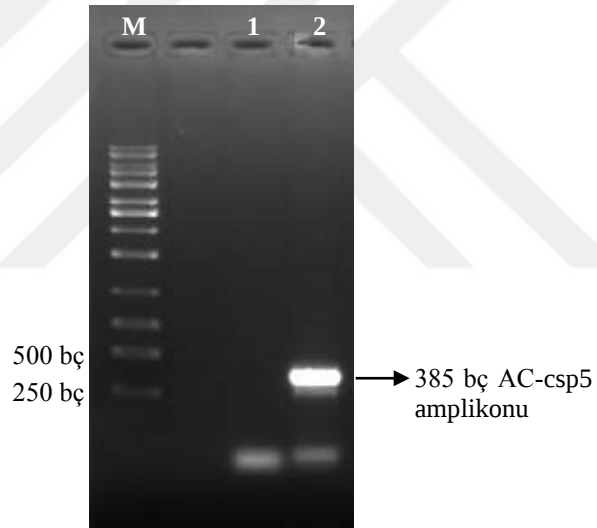
Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızda *csp2* ve *csp5* genleri çalışmaya devam etmek üzere seçilmiştir.

#### 4.5. *P. fragi* AC'e ait *csp2* ve *csp5* Genlerinin Nükleotit Dizilerinin Belirlenmesi

*P. fragi* AC'ye ait gDNA kalıp olarak ve *csp2*FR ile *csp5*FR primerleri kullanılarak yapılan PZR sonucunda AC-*csp2* (Şekil 4.7) ve AC-*csp5* (Şekil 4.8) amplikonları elde edilmiştir. İlgili amplikonlar jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Kalite ve konsantrasyonları nanodrop cihazında ölçülmüştür (Tablo 4.6). İlgili DNA fragmentlerin Sanger dizileme ile nükleotit dizileri belirlenmiş ve ardından bu dizilere karşılık gelen amino asit dizileri EXPASY ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) ile belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.7. csp2FR primer çifti ile gerçekleştirilen PZR'a ait jel görüntüsü. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder (Ek-G), 1: AC-csp2 fragmentine ait PZR amplikonu.



Şekil 4.8. csp5FR primer çifti ile gerçekleştirilen PZR'a ait jel görüntüsü. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder, 1: Kalıp DNA yerine distile su kullanılarak yapılan negatif kontrol PZR, 2) AC-csp5 fragmentine ait PZR amplikonu.

Tablo 4.6. Sekansa gönderilecek AC suşuna ait AC-csp2 ve AC-csp5 amplikonlarının konsantrasyonları ve saflık değerleri

| Amplikon | Konsantrasyon (ng/μL) | 260/280 Değeri |
|----------|-----------------------|----------------|
| AC-csp2  | 63.51                 | 1.95           |
| AC-csp5  | 39.8                  | 2.01           |

**> P. fragi AC'ye ait csp2 geninin tüm nükleotit dizisi**

ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTCATCACTCC  
TCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAAGCGACGGTTTCAAAGCCTGA  
AAGAAGGCCAAACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAAGGCCAAAAGGGTATGCAAGCTGCACAGGTTTCGT  
CCGGAGTAA

**> P. fragi AC'ye ait CSP2 proteininin tüm amino asit dizisi**

MSNRQTGTVKWFNDEKGFGFITPQGGGDDLFFVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKQKGMQAAQVR  
PE

**> P. fragi AC'ye ait csp5 geninin tüm nükleotit dizisi**

ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTCATCACCCC  
TGAAAGTGGTCCAGATCTGTTTGTGCACTTTCGTGCCATTCAAGGGCAACGGCTTCAAAGCCTGAAAG  
AAGGCCAAAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAAGGCCAAAAAGGCCTGCAGGCTGACGAAGTTCAACCA  
GAAGCCTGA

**> P. fragi AC'ye ait CSP5 proteininin tüm amino asit dizisi**

MSQRQSGTVKWFNDEKGFGFITPESGPDLEFVHFRAIQNGFSLKEGQKVTFIAVQGQKGLQADEVQP  
EA

Şekil 4.9. *P. fragi* AC suşunun AC-csp2 ve AC-csp5 genlerine ait nükleotit ve karşılık gelen amino asit dizileri.

*P. fragi* AC'ye ait csp2 geni 213 nükleotit uzunluğunda olup ATG başlangıç kodu ile başlayıp TAA bitiş kodu ile sonlanmaktadır. Bu ORF 70 amino asitlik CSP2 proteinini kodlamaktadır. pI değeri 5.33 ve molekül ağırlığı 17.39 kDa'dur. csp5 geni ise ATG başlangıç kodu ile başlayıp TGA bitiş kodu ile sonlanan 213 nükleotit uzunluğunda bir ORF'dir. 70 amino asitten oluşan CSP5 proteininin pI değeri 5.32 ve molekül ağırlığı 17.4 kDa'dur. Her iki gene/proteine ait nükleotit/amino asit dizileri NCBI/GenBank'a sunulmuş, *P. fragi* AC suşuna ait csp2 geni OR166999 ve csp5 geni ise OR167000 erişim numaraları ile kayıtlanmıştır.

#### **4.6. *P. fragi* AC Suşuna ait csp Genlerinin BLAST Analizleri**

*P. fragi* AC'ye ait csp2 geninin nükleotit dizisi csp1, csp3 ve cspDbp1 genlerine ait nükleotit/amino asit dizileri ile karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık görülmeyp %100 oranında özdeşirler. Öte yandan csp5 gen sekansı csp4, csp6, csp7, csp8 ve cspDbp2 genlerine ait nükleotit dizileri ile karşılaştırıldığında nükleotit dizilerinde 17 baz farklılığı olmakla birlikte, amino asit dizileri kıyaslandığında sadece 54. amino asit pozisyonunda alanin-serin ve 68. amino asit pozisyonunda prolin-alanin değişikliğinin olduğu tespit edilmiştir (Ek-F).

*P. fragi* AC'nin *csp2* ve *csp5* genleri ile ilgili amino asit dizileri blastn ve blastp ile karşılaştırıldıklarında elde edilen sonuçlar Şekil 4.10'da verilmektedir. CSP2 ve CSP5 proteinleri %73 oranında amino asit özdeşliği göstermektedir. Her iki proteinin amino asit dizilerinin BLAST ile karşılaştırılması sonucu en yüksek benzerlik gösterdiği protein, erişim numaraları, bu proteinlerin bulunduğu organizma ve benzerlik oranları Tablo 4.7'de verilmiştir.

Sequence ID: Query\_125655 Length: 213 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 190 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect                                                        | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|---------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 117 bits(129) | 3e-31                                                         | 142/193(74%) | 3/193(1%) | Plus/Plus |
| Query 1       | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC   | 60           |           |           |
| Sbjct 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTC  | 60           |           |           |
| Query 61      | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 120          |           |           |
| Sbjct 61      | ATCACCCCTGAAAGT---GGTCCAGATCTGTTTGTGCACTTTCGTGCCATTAGGGCAAC   | 117          |           |           |
| Query 121     | GGTTTCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAAACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG  | 180          |           |           |
| Sbjct 118     | GGCTTCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAAAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAAGGCCAAAAA  | 177          |           |           |
| Query 181     | GGTATGCAAGCTG                                                 | 193          |           |           |
| Sbjct 178     | GGCCTGCAGGCTG                                                 | 190          |           |           |

Qurey (sorgu): *csp2*, Subject (konu): *csp5*

Sequence ID: Query\_18769 Length: 70 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

| Score         | Expect                                                      | Method                       | Identities | Positives  | Gaps     |
|---------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|------------|----------|
| 106 bits(265) | 9e-38                                                       | Compositional matrix adjust. | 51/70(73%) | 62/70(88%) | 1/70(1%) |
| Query 1       | MSNRQTGTVKWFNDEKGFGFITPQGGGDDLFVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKQK | 60                           |            |            |          |
| Sbjct 1       | MSRQ+GTVKWFNDEKGFGFITP+ G DLFVHF+AI+ +GFKSLKEGQ V+F+A +GQK  | 59                           |            |            |          |
| Query 61      | GMQAAQVRPE                                                  | 70                           |            |            |          |
| Sbjct 60      | GLQADEVQPE                                                  | 69                           |            |            |          |

Qurey (sorgu): CSP2, Subject (konu): CSP5

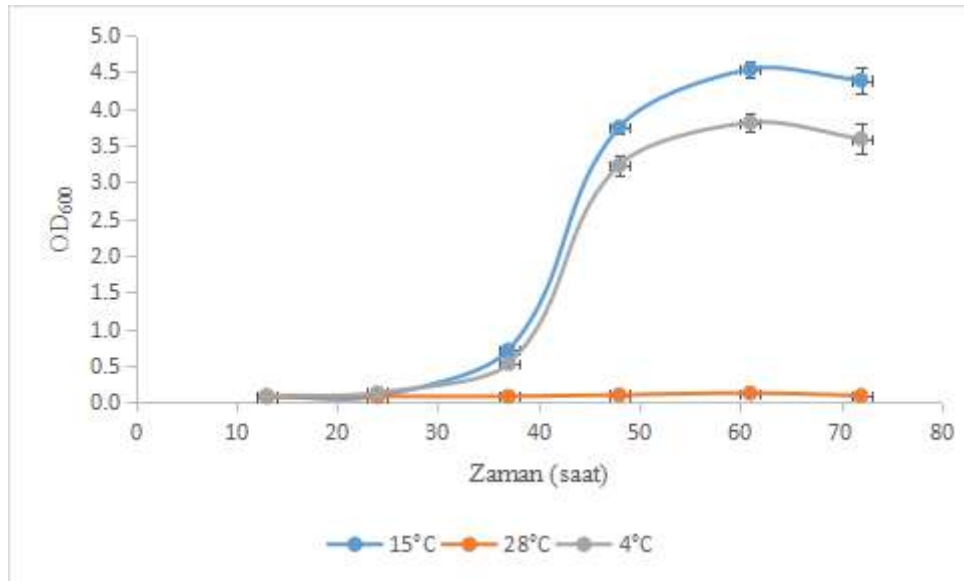
Şekil 4.10. *csp2-csp5* genleri ve CSP2-CSP5 proteinleri dizi benzerliklerinin blastn ve blastp ile karşılaştırılması.

Tablo 4.7. CSP2 ve CSP5 proteinlerinin benzerlik verileri

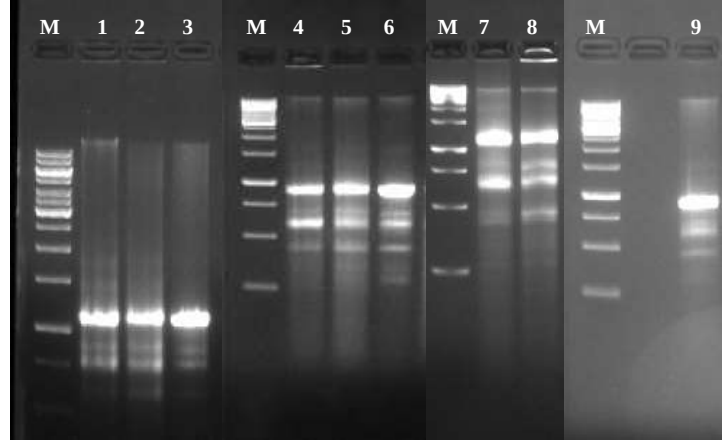
| Protein | Benzerlik Gösterilen Protein                  | Erişim Numarası                | Protein Kaynağı<br>Organizma    | Benzerlik Oranı |                |
|---------|-----------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------|
|         |                                               |                                |                                 | Sorgu           | Yüzde Özdeşlik |
| CSP2    | cold shock protein (beta-ribbon, CspA family) | <a href="#">EFQ62339.1</a>     | <i>P. fluorescens</i> WH6       | 100%            | 100%           |
|         | cold shock protein CspA                       | <a href="#">AFY20585.1</a>     | <i>Pseudomonas</i> sp. UW4      | 100%            | 100%           |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_003179963.1</a> | <i>Pseudomonas</i>              | 100%            | 100%           |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_042126302.1</a> | <i>Pseudomonas</i>              | 100%            | 98.6%          |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_012273095.1</a> | Bacteria                        | 100%            | 98.6%          |
| CSP5    | cold shock protein                            | <a href="#">WP_261739387.1</a> | <i>P. fragi</i>                 | 100%            | 100%           |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_056841579.1</a> | <i>Pseudomonas</i>              | 100%            | 97.1%          |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_219060944.1</a> | <i>Pseudomonas</i> sp. UMAB-08  | 100%            | 97.1%          |
|         | cold shock domain-containing protein          | <a href="#">WP_003175786.1</a> | <i>Pseudomonas</i>              | 100%            | 95.7%          |
|         | cold shock protein                            | <a href="#">WP_186657096.1</a> | unclassified <i>Pseudomonas</i> | 100%            | 94.30%         |

#### 4.7. *P. fragi* AC'deki *csp2* ve *csp5* Genlerinin Farklı Sıcaklıklardaki İfade Değişimleri

*P. fragi* AC suşunun üç farklı sıcaklıktaki üreme profilleri Şekil 4.11'de verilmektedir. Buna göre, *P. fragi* AC suşu optimum 15 °C'de üreme göstermiştir. En düşük üreme profili 28 °C'de gözlenmiştir. Bir psikrotolerant olan *P. fragi* AC suşunda farklı sıcaklıklarda *csp2* ve *csp5* genlerindeki ifade değişimlerini incelemek için 4, 15 ve 28 °C'lerde 48 saat süresince inkübe edilen kültürlerden RNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.12). İzole edilen RNA'lara ait konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.11. *P. fragi* AC'nin üç farklı sıcaklıkta zamana bağlı üreme profili.

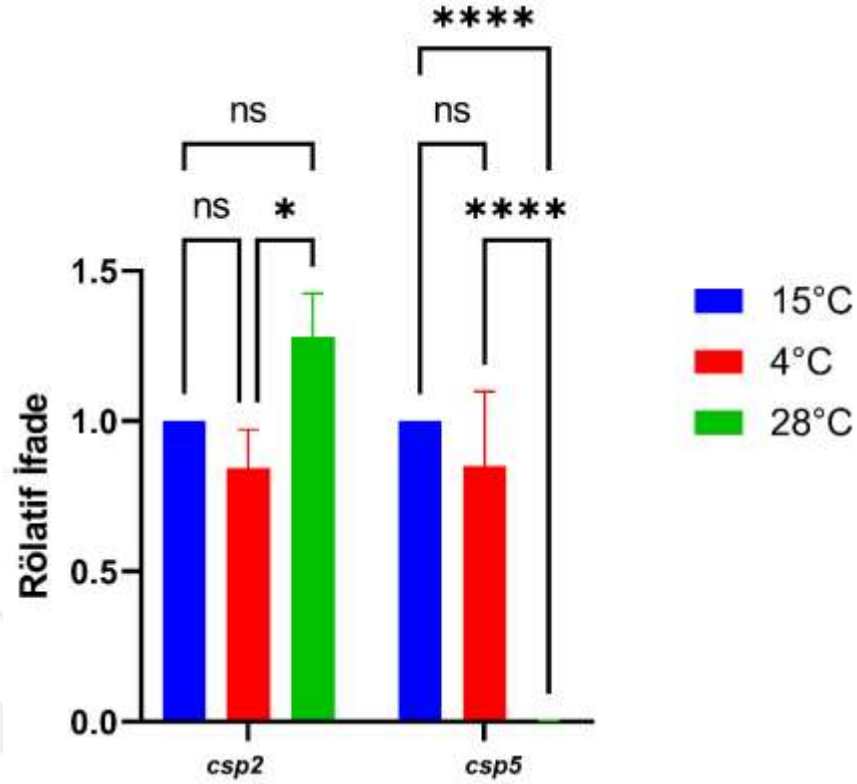


Şekil 4.12. *P. fragi* AC'den izole edilen RNA'lara ait jel fotoğrafları. M: Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder (Ek-G), 1-4-7: 4°C'de inkübe edilen *P. fragi* AC kültürlerinden izole edilen RNA'lar. 2-5-8: 15°C'de inkübe edilen *P. fragi* AC kültürlerinden izole edilen RNA'lar. 3- 6-9: 28°C'de inkübe edilen *P. fragi* AC kültürlerinden izole edilen RNA'lar.

Tablo 4.8. *P. fragi* AC'ye ait farklı sıcaklıklarda inkübe edilen kültürlerden izole edilen RNA'ların kalite ve saflık dereceleri

|                  | 4 °C           | 15 °C          | 28 °C          |
|------------------|----------------|----------------|----------------|
| <b>1.</b>        | 992.4 ng/μL    | 1025.9 ng/μL   | 492.5 ng/μL    |
| <b>Biyolojik</b> | 260/280 : 2.14 | 260/280 : 2.18 | 260/280 : 2.09 |
| <b>Replika</b>   | 260/230 : 1.79 | 260/230 : 2.11 | 260/230 : 2.10 |
| <b>2.</b>        | 613.3 ng/μL    | 765.2 ng/μL    | 817.7 ng/μL    |
| <b>Biyolojik</b> | 260/280 : 2.15 | 260/280 : 2.15 | 260/280 : 2.18 |
| <b>Replika</b>   | 260/230 : 2.23 | 260/230 : 2.11 | 260/230 : 2.37 |
| <b>3.</b>        | 549.9 ng/μL    | 830.8 ng/μL    | 427.6 ng/μL    |
| <b>Biyolojik</b> | 260/280 : 2.15 | 260/280 : 2.14 | 260/280 : 2.09 |
| <b>Replika</b>   | 260/230 : 2.28 | 260/230 : 2.17 | 260/230 : 1.97 |

Farklı sıcaklıklarda gelişen *P. fragi* AC suşunda *csp2* ve *csp5* genlerinin ifade değişimleri qPCR ile belirlenmiştir. Her bir genin 15 °C'deki ifade değeri 1 olarak kabul edilerek, 4 ve 28 °C'lerdeki ifade farklılıkları Şekil 4.13 ve Tablo 4.9'da verilmektedir.



Şekil 4.13. *P. fragi* AC’de *csp2* ve *csp5* genlerinin farklı sıcaklıklardaki rölatif ifade değişimleri. ns:  $p<0.05$  \*,  $p<0.01$  \*\*,  $p<0.0001$  \*\*\*\*.

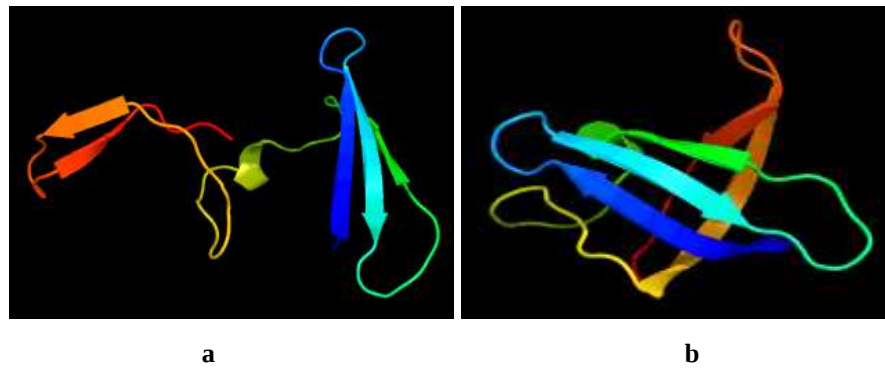
Tablo 4.9. *csp2* ve *csp5* genlerinin rölatif ifade değerleri

| Genler      | Sıcaklık | Rölatif ifade değerleri |             |             |
|-------------|----------|-------------------------|-------------|-------------|
|             |          | 15 °C                   | 4 °C        | 28 °C       |
| <i>csp2</i> |          | 1.000±0.000             | 0.843±0.130 | 1.283±0.140 |
| <i>csp5</i> |          | 1.000±0.000             | 0.852±0.070 | 0.004±0.001 |

Sonuçlar incelendiğinde, *csp2* geninin ifadesinin 4 °C’dekine kıyasla 28 °C’de istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) ve 1.28 değerinde artış gösterdiği tespit edilmiştir. Öte yandan *csp5* geninin ifadesi 15 °C’dekine kıyasla 28 °C’de istatistiksel açıdan anlamlı azalış göstermiştir. *csp5* geninin kontrole kıyasla rölatif ifade değeri, 28 °C’de 0.004’tür ( $p<0.0001$ ).

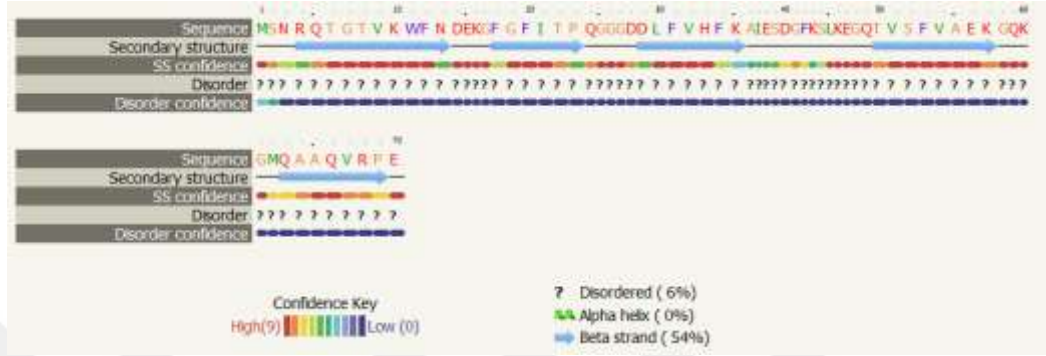
#### 4.8. *P. fragi* AC Suşunda *in silico* CSP Karakterizasyonu

CSP2 ve CSP5' nin moleküler yapısı, I-TASSER ve Phyre2 sunucusu kullanılarak analiz edilmiştir. I-TASSER, şablonları çoklu iş parçacığıyla seçer, güven puanına (C puanı), şablon modelleme puanına (TM puanı) ve kök-ortalama kare sapmasına (RMSD) dayalı olarak tam uzunlukta modele yaklaşır ve tahmin eder. Phyre2 sunucusu ise gelişmiş bir uzaktan homoloji algılama yöntemi kullanarak 3B modeller oluşturma, ligand bağlanma bölgelerini tahmin etme ve amino asit varyantlarının etkisini analiz etme konusunda rehberlik eder (Şafak vd., 2020). Phyre2 analizine göre CSP2 proteininin amino asit dizisinin 3B modeli insan patojeni *Neisseria meningitidis* suşunda gen düzenlemesinde rol oynayan soğuk şok domaini (CSD) proteini olan C3camB ile %99.9'luk güven derecesinde %91 oranında benzerlik sergilediği görülmektedir. Fragmentin domain içeriğinin belirlenmesi için uygulama kapsamında yapılan BLAST analizi sonucu ilgili fragmentin UniProt Q4KEW6 erişim numaralı *P. fluorescens*'e ait soğuk alıştırma proteini CapA ile %100 aynı domaine sahip olduğu görülmektedir. CSP5 proteininin amino asit dizisinin 3B modeli ise *Bacillus caldolyticus*'ta transkripsiyonda DNA bağlanma rolü oynayan soğuk şok DNA bağlanma domaini benzeri protein ailesine dahil olan D1c9oa ile %99.9'luk güven derecesinde %93 oranında benzerlik göstermektedir. BLAST analizi sonucu fragmentin *P. fragi*'de *tapB* geninin ürünü olan UniProt P72192 erişim numaralı sıcaklık alıştırma proteini ile %98.4 oranında aynı domaini içerdiği görülmektedir. Phyre2'de oluşturulan CSP2 ve CSP5 proteinlerine ait tahmini 3B yapıları Şekil 4.14'te verilmektedir.

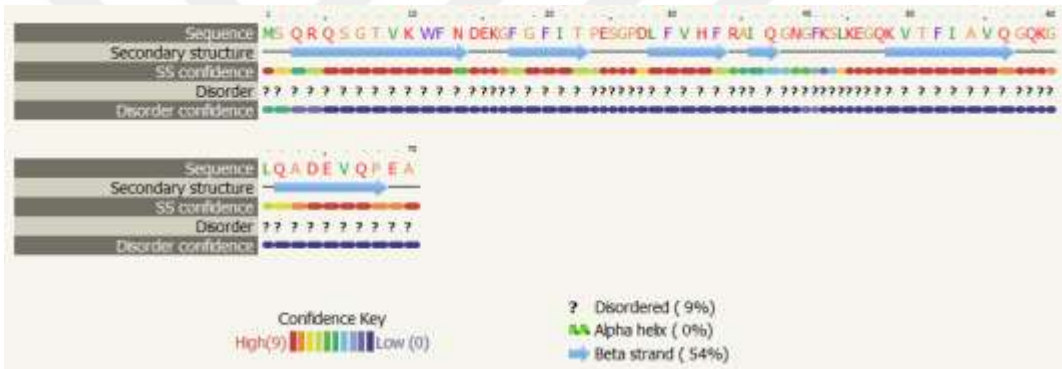


Şekil 4.14. *P. fragi* AC'ye ait CSP2 ve CSP5 proteinlerinin Phyre2 tarafından c3camB şablonu baz alınarak oluşturulan tahmini 3B yapıları. a) Putatif CSP2 3B yapısı, b) Putatif CSP5 3B yapısı.

Phyre2 analizleri sonucunda, CSP2 ve CSP5 proteinlerinin tahmini 3B modelindeki sekonder yapılar incelendiğinde,  $\beta$  iplikçik oluşumunun %54 olduğu ve  $\alpha$  sarmalı oluşumunun bulunmadığı görülmektedir. İkincil yapıların bozukluk (disorder) tahmin sonuçlarına bakıldığında tahmini ikincil yapıların yüksek güvenilirlikli çıktığı görülmektedir (Şekil 4.15 a,b).



a



b

Şekil 4.15. Phyre2 bazında CSP2 (a) ve CSP5 (b)'e ait sekonder yapı ve hata tahmin güvenilirliği sonuçları.

I-Thasser programı aracılığı ile oluşturulan, CSP2 ve CSP5 proteinlerinin protein veri tabanı (PDB)'nda yer alan yapısal analogları Tablo 4.10 ve Tablo 4.11'de verilmektedir.

Tablo 4.10. PDB'deki CSP2 yapısal analogları

| Sıra | PDB Hit               | TM-skoru | RMSD <sup>a</sup> | IDEN <sup>a</sup> | Cov   |
|------|-----------------------|----------|-------------------|-------------------|-------|
| 1    | <a href="#">2l15A</a> | 0.925    | 0.83              | 0.580             | 0.986 |
| 2    | <a href="#">3i2zA</a> | 0.905    | 1.41              | 0.529             | 0.986 |
| 3    | <a href="#">5vtsA</a> | 0.885    | 1.36              | 0.400             | 0.986 |
| 4    | <a href="#">3trzA</a> | 0.878    | 1.21              | 0.377             | 0.986 |
| 5    | <a href="#">3aqqA</a> | 0.874    | 1.26              | 0.324             | 0.971 |
| 6    | <a href="#">1hzaA</a> | 0.864    | 1.02              | 0.591             | 0.943 |
| 7    | <a href="#">1cspA</a> | 0.862    | 1.05              | 0.591             | 0.943 |
| 8    | <a href="#">5o6fA</a> | 0.851    | 1.23              | 0.522             | 0.957 |
| 9    | <a href="#">3a0jA</a> | 0.843    | 1.36              | 0.500             | 0.943 |
| 10   | <a href="#">2lssA</a> | 0.828    | 1.64              | 0.426             | 0.971 |

(a) Sorgu yapısı çizgilerle gösterilirken, yapısal analog omurga izi kullanılarak görüntülenir.

(b) Proteinlerin sıralaması, sorgu yapısı ile PDB kitaplığındaki bilinen yapılar arasındaki yapısal hizalamanın TM-skoruyla dayalıdır.

(c) RMSD<sup>a</sup>, TM-align ile yapısal olarak hizalanan kalıntılar arasındaki RMSD'dir.

(d) IDEN<sup>a</sup>, yapısal olarak hizalanmış bölgedeki yüzde sekans özdeşliğidir.

(e) Cov, TM-align ile hizalama kapsamını temsil eder ve sorgu proteininin uzunluğuna bölünen yapısal olarak hizalanmış kalıntıların sayısına eşittir.

Tablo 4.11. PDB'deki CSP5 yapısal analogları

| Sıra | PDB Hit               | TM-skoru | RMSD <sup>a</sup> | IDEN <sup>a</sup> | Cov   |
|------|-----------------------|----------|-------------------|-------------------|-------|
| 1    | <a href="#">1cspA</a> | 0.903    | 0.80              | 0.597             | 0.957 |
| 2    | <a href="#">1hzaA</a> | 0.901    | 0.85              | 0.627             | 0.957 |
| 3    | <a href="#">1mjca</a> | 0.889    | 1.19              | 0.559             | 0.971 |
| 4    | <a href="#">3i2zA</a> | 0.886    | 1.47              | 0.551             | 0.971 |
| 5    | <a href="#">5vtsA</a> | 0.862    | 1.49              | 0.386             | 0.971 |
| 6    | <a href="#">3aqqA</a> | 0.852    | 1.48              | 0.368             | 0.971 |
| 7    | <a href="#">3trzA</a> | 0.847    | 1.56              | 0.371             | 1.000 |
| 8    | <a href="#">3a0jA</a> | 0.845    | 1.42              | 0.493             | 0.957 |
| 9    | <a href="#">5o6fA</a> | 0.836    | 1.42              | 0.552             | 0.957 |
| 10   | <a href="#">1wfgA</a> | 0.807    | 1.52              | 0.227             | 0.943 |

(a) Sorgu yapısı çizgilerle gösterilirken, yapısal analog omurga izi kullanılarak görüntülenir.

(b) Proteinlerin sıralaması, sorgu yapısı ile PDB kitaplığındaki bilinen yapılar arasındaki yapısal hizalamanın TM-skoruyla dayalıdır.

(c) RMSD<sup>a</sup>, TM-align ile yapısal olarak hizalanan kalıntılar arasındaki RMSD'dir.

(d) IDEN<sup>a</sup>, yapısal olarak hizalanmış bölgedeki yüzde sekans özdeşliğidir.

(e) Cov, TM-align ile hizalama kapsamını temsil eder ve sorgu proteininin uzunluğuna bölünen yapısal olarak hizalanmış kalıntıların sayısına eşittir.

*P. fragi* AC suşunun CSP proteinlerin protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi için STRING veri tabanı analizi sonucunda her iki proteinin de ATP bağımlı helikaz ile yakından ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. *P. fragi* AC soğuk şok proteinlerinin yakın interaksiyon içinde olduğu diğer proteinlerin ise DnaK şaperon ve DEAD-box helikaz olduğu görülmüştür.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda Antarktika Ardley Adası göl suyu örneklerinden izole edilen AC suşuna ait 16S rRNA bölgesinin PZR ampikonu dizilenmiş ve yapılan BLAST analizi ve filogeni çalışmasıyla AC suşunun *P. fragi* D12 suşunun kısmi 16S rRNA dizisi ile %100 oranında özdeş olduğu gösterilmiştir. AC izolatu *P. fragi* AC olarak isimlendirilmiştir ve NCBI-GenBank veritabanına OR150484 erişim numarası ile kaydı sağlanmıştır. Çalışmanın devamında gen bankası verileri taranarak *P. fragi*'de soğuk şoku ile alakalı genler belirlenmiş ve uygulanan blastn ve blastp analizleri sonucu tespit edilen 10 adet genin temelde 2 farklı gen olduğunu ortaya koyulmuştur. Bunlardan *csp2* geni ham petrol kontamine bir topraktan izole edilen ve yüksek molekül ağırlıklı polihidrokarbonları parçalama yeteneğine sahip *Pseudomonas fragi* DBC suşuna ait genom dizisinde yer alan bir soğuk şok protein kodlayan genidir (Singha vd., 2017). *csp5* geni ise esasında Kuzey Kutup Dairesi'nden alınan bir toprak örneğinden izole edilen ve trehaloz üretebilme özelliği rapor edilen (Wei vd., 2016) *Pseudomonas fragi* P121 suşuna ait genom dizisinde yer almaktadır. Henüz literatürde her iki gene ait herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *csp2* ve *csp5* baz dizilerinden tasarlanan primerler ile uygulanan PCR amplifikasyonu ile elde edilen fragmentler Sanger dizileme yöntemi ile sekanslanmıştır. *P. fragi* AC suşundan klonlanan AC-*csp2* fragmentine ait baz dizisinin, hedeflenen *csp2* baz dizisi ile %100 özdeş olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan AC-*csp5* fragmentinin baz dizisinin *csp5* nükleotit dizisine kıyasla 17 baz farklılık göstermesine rağmen, amino asit dizisinde 54. (Ala → Ser değişimi) ve 68. (Pro → Ala değişimi) amino asit pozisyonunda iki amino asitlik bir farklılık olduğu görülmüştür. Ayrıca AC-*csp2*, *csp2* ile aynı stop kodonunu (TAA) kullanırken, AC-*csp5* ile *csp5*'in farklı stop kodonları içerdiği tespit edilmiştir (AC-*csp5*: TAA ve *csp5*: TGA). Klonlanan her iki fragmentin amino asit dizileri ise %73 oranında özdeşliğe sahipler. Bu özdeşliğin temelinde muhtemelen, bakteri kaynaklı CSP dizilerinin genel olarak oldukça korunmuş tek bir CSD'den meydana gelmesi yatmaktadır ve hepsi olmasa da bazıları soğuk şoku tarafından indüklenmektedir (Heinemann ve Roske, 2021). *P. fragi* AC suşuna ait *csp2* ve *csp5* genlerine ait nükleotit dizileri NCBI/GenBank veri tabanında OR166999 (AC-*csp2* için) ve OR167000 (AC-*csp5* için) erişim numaraları ile kayıt altına alınmıştır.

Çalışmamızda *P. fragi* AC suşunda tespit edilen *csp2* ve *csp5* genlerinin soğuk şoku ile indüklenip indüklenmediğinin belirlenmesi için öncelikle üç farklı sıcaklık seçilerek (4, 15 ve 28 °C) *P. fragi* suşunun üreme profili ortaya çıkarılmıştır. AC suşunun en iyi üremeyi 15 °C’de gerçekleştirebildiği, 28 °C’nin ise bu suşun üremesini olumsuz etkilediği sonucuna varılmıştır. Dolayısı ile, üç farklı inkübasyon sıcaklığında gelişen kültürlerden izole edilen RNA’ların, 28 °C’de en düşük konsantrasyona sahip olması bu sıcaklıktaki üremenin zayıf olması ile ilişkilidir. *csp2* ve *csp5* genlerinin farklı sıcaklıklarda üreyen *P. fragi* AC suşundaki gen ifade farklılıkları değerlendirildiğinde, her iki gen için de 15 ile 4 °C arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ifade farkı tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). *csp2* geni 4 °C’ye kıyasla 28 °C’de istatistiksel açıdan anlamlı bir ifade artışı sağlamıştır ( $p<0.05$ ). *csp5* geni ise kontrol grubuna (15 °C) kıyasla ve 28 °C’de  $p<0.0001$  önem seviyesinde azalış sergilemektedir. CSP’lerin soğuk şokuna ani tepki olarak sentezlendikçe, CAP’lerin uzun süre soğuk sıcaklık derecelerinde üreme sırasında sentezlendiği literatürde bildirilmiştir (Phadtare vd., 1999). Çalışma kapsamında AC-*csp5* geninin 15 ve 4°C’lerdeki ifadesine kıyasla 28 °C’de bazal seviyede kalması ve bu değişimin istatistiksel anlamda önemli bulunması, literatürdeki bu verileri ilgili gen için doğrulamaktadır. Bununla birlikte, yapılan bir çalışmada (Zhou vd., 2021) bir soğuk şok şaperonunu kodlayan *cspL* geninin bakteri ve mayada normal ve yüksek sıcaklıklarda ifadesinin artması ve bakteri/maya gelişimini indüklemesi bazı CSP’lerin yüksek sıcaklığa dirençte önemli rol oynadıkları sonucunu göstermektedir. Bağlantılı olarak *P. fragi* AC’deki CSP2 proteininin CSPL’dekine benzer bir fonksiyonu olabilir.

*in silico* karakterizasyon sonuçları değerlendirildiğinde, *P. fragi* AC suşunun CSP2 proteininin 3B modeli gen düzenlemesinde rol oynayan soğuk domain ailesi proteini c3camB ile %99.9 güven derecesinde %91’lik benzerlik gösterdiği ve *P. fluorescens*’e ait soğuk şok proteini CapA ile %100 aynı domaini içerdiği görülmektedir. Panicker vd. (2002), CapB gibi CSD kodlayan genleri soğukta hayatta kalma destekleyicisi olarak önermiş, ardından bu öneri Antarktika’dan izole edilen tüm *Pseudomonas* spp.’deki varlığı nedeniyle kanıtlanmıştır (Panicker vd., 2010; Chauhan vd., 2023).

AC suşunun CSP5 proteini ise 3B modeline göre *B. caldolyticus*'ta transkripsiyonda DNA bağlanma rolü oynayan soğuk şok DNA bağlanma domaini benzeri protein ailesine dahil olan d1c9oa proteini ile %99.9'luk güven derecesinde %93'lük bir benzerlik sergilediği ve *P. fragi*'de *tapB* geninin ürünü olan sıcaklık alıştırma proteini ile %98.4 oranında aynı domaini içerdiği görülmektedir. Klonlanan her iki soğuk şoku proteinin protein-protein etkileşimlerine bakıldığında ikisinin de ATP bağımlı helikaz, DnaK şaperon ve DEAD-box helikaz ile ilişkili olduğu görülmüştür.

CSP'ler ve CSD'ler, beş sarmallı, tamamen antiparalel bir  $\beta$ -varil yapısını ve tek sarmallı nükleik asitleri bağlayan korunmuş bir yüzeyi paylaşırlar. Bu korunmuş bağlanma modu, CSD'lerin hem DNA hem de RNA iplikçikleri ile birleşme yeteneğini ve bunların sınırlı dizi seçiciliğini açıklamaktadır. Genellikle, CSP ve CSD'lerde dizi korunumu  $\beta$ -ipliklerinde döngü bölgelerine göre daha yüksektir (Heinemann ve Roske, 2021). 3B yapı tahmini sonucuna göre *P. fragi* AC suşuna ait CSP2 ve CSP5 proteinlerinin CSP'lerin karakteristik özellikleri olan  $\beta$ -iplikçik oluşumunu yüksek oranda içerdikleri görülmektedir. Xu vd. (2021), *P. fluorescens*'te çalıştıkları beş CSP'nin  $\beta$ -iplikçik yapısının %42 ila 47 arasında olduğunu ve tahmini 3B modellerinin (PSIPRED ve SWISS-MODEL ile oluşturulan) düşük güven modeli verdiğini bildirmişlerdir. Öte yandan, çalışmamızda Phyre2 kullanılarak yapılan 3B modelleme çalışmasında, AC-CSP2 ve AC-CSP5 proteinleri ise %54  $\beta$ -iplikçik yapısı ile yüksek güven derecesinde tahmini model sunmaktadırlar. Güven skorları sırasıyla, AC-CSP2'de dizinin %91'i (64 aa) için %99,9 ve AC-CSP5'de dizinin %93'ü (65 aa) için %99,9 olarak belirlenmiştir.

Soğuğa toleranslı mikroorganizmaların soğuk adaptasyonları membran akışkanlığı, CSP ve helikazlar, psikrofilik enzimler, ekstraselüler polimerler, uyumlu (kompatibl) çözünenler ve rekatif oksijen türleri (ROS) dengesi gözetilerek sağlanmaktadır (Bao vd., 2023). Elde edilen bulgular ışığında klonlanan fragmentlerin soğuk indüklenabilir genler olduğu fakat daha ayrıntılı analiz için interaksiyon gösterdiği ATP bağımlı helikaz, DnaK şaperon ve DEAD-box helikaz gen ifadelerinin soğuk etkisi altındaki ekspresyonlarının da dikkate alınması gerektiği kanaatine varılmıştır. Genlerin işlevlerinin tam olarak aydınlatılabilmesi için ileriki çalışmalarda fonksiyonel genomik ve gen ontolojisi analizleri yapılması planlanmaktadır.

Çalışmamız kutup izolatu psiktotolerant bakteriler ile yapılan ilk qPCR ifade analizini içeriği ile de literatüre katkıda bulunacaktır. Çalışmaya konu olan genlerin soğuk ilişkili genler olduğu bulgusu, söz konusu genlerin farklı organizmalarda heterolog ifadesi sonucu soğuk zararının etkilerinin önlenmesi/azaltılması çalışmalarında kullanılabilme potansiyelini göstermektedir.



## KAYNAKLAR

- Abanoz, B. (2016). “Halofilik bakterilerde tuz direnci sağlayan moleküler mekanizmaların ve endüstriyel enzim üretimlerinin belirlenmesi”, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Samsun, s. 95.
- Abd-Manan, F., Ibrahim, Z. & Shahir, S. (2014). “Plants in Antarctica: current and future phytoremediation potential”, *Journal Teknologi*, 69(1).
- Abraham, W. P., Raghunandanan, S., Gopinath, V., Suryaaletha, K. & Thomas, S. (2020). “Deciphering the cold adaptive mechanisms in *Pseudomonas psychrophila* MTCC12324 isolated from the Arctic at 79 N”, *Current Microbiology*, 77, 2345-2355.
- Adams, B. J., Bardgett, R. D., Ayres, E., Wall, D. H., Aislabie, J., Bamforth, S., ... & Stevens, M. I. (2006). “Diversity and distribution of Victoria Land biota”, *Soil Biology and Biochemistry*, 38(10), 3003-3018.
- Anonim (2023). “British Antarctic Survey Antarctic Wildlife”, Retrieved from [http://www.antarctica.ac.uk/about\\_antarctica/wildlife/plants/index.php](http://www.antarctica.ac.uk/about_antarctica/wildlife/plants/index.php) (Erişim tarihi: 12.06.2023).
- Awasthi, S., Sharma, A., Saxena, P., Yadav, J., Pandiyan, K., Kumar, M., ... & Saxena, A. K. (2019). “Molecular detection and in silico characterization of cold shock protein coding gene (csp A) from cold adaptive *Pseudomonas koreensis*”, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28, 405-413.
- Bai, B., Ren, J., Bai, F. & Hao, L. (2020). “Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Pseudomonas brassicacearum* GS20 using real-time quantitative reverse transcription PCR”, *PLoS One*, 27;15(1):e0227927. doi: 10.1371/journal.pone.0227927.
- Baş, L., Otur, Ç. & Kurt-Kızıldoğan, A. (2020). “Enhanced tunicamycin biosynthesis in *bldG* overexpressed *Streptomyces clavuligerus*”, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 56(4), 412–419.
- Bao, C., Shi, J., Liu, Y., Zhang, N., Zhou, Y., Ma, J., ... & Chen, H. “Mining of key genes for cold adaptation from *Pseudomonas fragi* D12 and analysis of its cold-adaptation mechanism”, *Frontiers in Microbiology*, 14, 1215837.
- Bockheim, J. G., Lupachev, A. V., Blume, H. P., Bölter, M., Simas, F. N. B. & McLeod, M. (2015). “Distribution of soil taxa in Antarctica: a preliminary analysis”, *Geoderma*, 245, 104-111.
- Cary, S., McDonald, I., Barrett, J. et al. (2010). “On the rocks: the microbiology of Antarctic Dry Valley soils”, *Nat Rev Microbiol* 8, 129–138. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2281>

- Centurion, V. B., Delforno, T. P., Lacerda-Júnior, G. V., Duarte, A. W. F., Silva, L. J., Bellini, G. B., ... & Oliveira, V. M. (2019). "Unveiling resistome profiles in the sediments of an Antarctic volcanic island", *Environmental Pollution*, 255, 113240.
- Chauhan, M., Kimothi, A., Sharma, A. & Pandey, A. (2023). "Cold adapted *Pseudomonas*: ecology to biotechnology", *Front. Microbiol.* 14:1218708. doi: 10.3389/fmicb.2023.1218708
- Chu, W. L., Dang, N. L., Kok, Y. Y., Yap, K. S. I., Phang, S. M. & Convey, P. (2019). "Heavy metal pollution in Antarctica and its potential impacts on algae", *Polar Science*, 20, 75-83.
- Colesie, C., Walshaw, C. V., Sancho, L. G., Davey, M. P. & Gray, A. (2022). "Antarctica's vegetation in a changing climate", *WIREs Climate Change*, Madrid, 14-1, 28pp.
- Convey, P. & Stevens, M. I. (2007) "Antarctic biodiversity", *Science*, 317 (5846). 1877-1878. <https://doi.org/10.1126/science.1147261>
- Cutting, S. & Horn, V. P. B. (1990). "Genetic analysis in molecular biological methods for *Bacillus*". (eds: Colin R. Harwood and Simon M. Cutting) *A Wiley-Interscience Publication. John Wiley and Sons*, Chichester. New York.
- Das, K., Abrol, S., Verma, R., Harika, A., Nalini, K., Senthilkumar M. (2020). "Beneficial Microbes in Agro-Ecology, Chapter 8 – *Pseudomonas*", *Academic Press*, pp. 133-148. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823414-3.00008-3>
- Dopchiz, L. P. & Ansaldo, M. (2022). "Determination of stomatic density, index, and area as exposition biomarkers of pollution in *Deschampsia antarctica* Desv.(Poaceae)", *Ecotoxicology*, 31(8), 1321-1329.
- Duarte, A. W. F., Dos Santos, J. A., Vianna, M. V., Vieira, J. M. F., Mallagutti, V. H., Inforsato, F. J., ... & Durães Sette, L. (2018). "Cold-adapted enzymes produced by fungi from terrestrial and marine Antarctic environments", *Critical reviews in biotechnology*, 38(4), 600-619.
- Eom, S. H., Ahn, M. A., Kim, E., Lee, H. J., Lee, J. H., Wi, S. H., ... & Hyun, T. K. (2022). "Plant response to cold stress: Cold stress changes antioxidant metabolism in heading type Kimchi cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)", *Antioxidants*, 11(4), 700.
- Graumann, P. L., & Marahiel, M. A. (1999). "Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*", *Archives of microbiology*, 171, 135-138.
- Heinemann, U. & Roske, Y. (2021). "Cold-Shock Domains-Abundance, Structure, Properties, and Nucleic-Acid Binding", *Cancers* (Basel). 13(2):190. doi: 10.3390/cancers13020190.

- Hwengwere, K., Paramel-Nair, H., Hughes, K. A., Peck, L. S., Clark, M. S. & Walker, C. A. (2022). "Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment?", *Microbiome*, 10(1), 1-13.
- İnan, B., Akın, B., Ünlü, İ. D., Koçer, A. T., Çelik, A., Vehapi, M., ... & Özçimen, D. (2023). "Interactive effects of cold and temperate conditions on growth and biochemical content of Antarctic microalga *Chlorella variabilis* YTU. ANTARCTIC. 001", *Journal of Applied Phycology*, 1-13.
- Jakosky, B. M., Nealson, K. H., Bakermans, C., Ley, R. E. & Mellon, M. T. (2003). "Subfreezing activity of microorganisms and the potential habitability of Mars' polar regions", *Astrobiology*, 3(2), 343-350.
- Kahlon, R. S. (2016). "Pseudomonas: Molecular and Applied Biology", *Biomedical and Life Sciences, Springer Cham*, XIII, 518.
- Kelley, L. A, Mezulis, S., Yates, C. M., M.N. Wass, M. N. & Sternberg, M. J. E. (2015). "The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis", *Nat. Protoc.* 10 (6) 845–858, <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
- Kırkinci, S. F., Marakli, S., Aksoy, H. M., ÖZÇİMEN, D. & Kaya, Y. (2021a). "Antarktika: Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Araştırmalarının Gözden Geçirilmesi", *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 4(1), 158-177.
- Kırkinci, S. F., Edbeib, M. F., Aksoy, H. M, Marakli, S. & Kaya, Y. (2021b). "Identification of Dalapon degrading bacterial strain, *Psychrobacter* sp. TaeBurcu001 isolated from Antarctica", *Polar Science*.
- Kieser, T., Bibb, M., Buttner, M., Chater, K. & Hopwood, D. (2000). "Practical *Streptomyces* Genetics", *The John Innes Foundation*, John Innes Centre, Norwich Research Park, Colney, Norwich, NR4 7UH, United Kingdom.
- Kobori, H., Sullivan, C. W. & Shizuya, H. (1984). "Bacterial plasmids in Antarctic natural microbial assemblages", *Applied and Environmental Microbiology*, 48(3), 515-518.
- Koerich, G., Fraser, C. I., Lee, C. K., Morgan, F. J. & Tonkin, J. D. (2022). "Forecasting the future of life in Antarctica", *Trends in Ecology & Evolution*.
- Kristoffersen, V., Jenssen, M., Jawad, H. R., Isaksson, J., Hansen, E. H., Rämä, T., Hansen, K. Ø. & Andersen, J. H. (2021). "Two Novel Lyso-Ornithine Lipids Isolated from an Arctic Marine *Lacinutrix* sp. Bacterium. *Molecules*", 31;26(17):5295. doi: 10.3390/molecules26175295.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). "MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms", *Mol. Biol. Evol.* 35 (6) 1547–1549, <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>.
- Kurt, A. (2011). "The regulatory effect of *ccaR* activator on the cephamycin C gene cluster of *streptomyces clavuligerus*", Middle East Technical University, Natural and Applied Sciences, Ankara, s. 162.

- Lane, D.J. (1991). "16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic*, John Wiley and Sons, New York, 115-175.
- Laybourn-Parry, J., Quayle, W. & Henshaw, T. (2002). "The biology and evolution of Antarctic saline lakes in relation to salinity and trophic", *Polar Biology*, 25(7): p. 542-552.
- Li, Z., Chao, B. F., Wang, H. S. & Zhang, Z. Z. (2022). "Antarctica ice-mass variations on interannual timescale: Coastal Dipole and propagating transports", *Earth and Planetary Science Letters*, 595, 117789.
- Lindquist, J.A. & Mertens, P.R. (2018). "Cold shock proteins: from cellular mechanisms to pathophysiology and disease", *Cell Commun Signal*, 16, 63. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0274-6>.
- 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.
- Malard, L. A. & Pearce, D. A. (2018). "Microbial diversity and biogeography in Arctic soils", *Environmental Microbiology Reports*, 10:6, 611-625.
- Marcolefes, E., Leung, T., Okshevsky, M., McKay, G., Hignett, E., Hamel, J., ... & Whyte, L. (2019). "Culture-dependent bioprospecting of bacterial isolates from the Canadian high Arctic displaying antibacterial activity", *Frontiers in microbiology*, 10, 1836.
- McCarthy, J. S., Wallace, S. M., Brown, K. E., King, C. K., Nielsen, U. N., Allinson, G. & Reichman, S. M. (2022). "Preliminary investigation of effects of copper on a terrestrial population of the antarctic rotifer *Philodina* sp", *Chemosphere*, 300, 134413.
- Mechri, S., Berrouina, M. B. E., Benmradi, M. O., Jaouadi, N. Z., Rekik, H., Moujehed, E., ... & Jaouadi, B. (2017). "Characterization of a novel protease from *Aeribacillus pallidus* strain VP3 with potential biotechnological interest", *International journal of biological macromolecules*, 94, 221-232.
- Nemergut, D. R., Costello, E. K., Meyer, A. F., Pescador, M. Y., Weintraub, M. N. & Schmidt, S. K. (2005) "Structure and function of alpine and arctic soil microbial communities", *Res Microbiol* 156: 775– 784.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. & Babalola, O. O. (2017). "Mechanisms of action of plant growth promoting Bacteria", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33, 1-16.
- Oldham, P. & Kindness, J. (2020). "Biodiversity research and innovation in Antarctica and the Southern Ocean" *bioRxiv*, 2020-05.

- Oliveira S. R., Almeida G. V., Souza K. R., Rodrigues D. N., Kuser-Falcão P. R., Yamagishi M. E., Santos E. H., Vieira F. D., Jardine J. G. & Neshich G. (2007). "Sting\_RDB: a relational database of structural parameters for protein analysis with support for data warehousing and data mining", *Genet Mol Res.*, 6(4):911-22.
- Ordóñez-Enireb, E., Cucalón, R. V., Cárdenas, D., Ordóñez, N., Coello, S., Elizalde, P. & Cárdenas, W. B. (2022). "Antarctic fungi with antibiotic potential isolated from Fort William Point, Antarctica", *Scientific Reports*, 12(1), 21477.
- Orellana-Saez, M., Pacheco, N., Costa, J. I., Mendez, K. N., Miossec, M. J., Meneses, C., ... & Poblete-Castro, I. (2019). "In-depth genomic and phenotypic characterization of the antarctic psychrotolerant strain *Pseudomonas* sp. MPC6 reveals unique metabolic features, plasticity, and biotechnological potential", *Frontiers in Microbiology*, 10, 1154.
- Otur, Ç., Okay, S. & Kurt-Kızıldoğan, A. (2023). "Whole genome analysis of *Flavobacterium aziz-sancarii* sp. nov., isolated from Ardley Island (Antarctica), revealed a rich resistome and bioremediation potential", *Chemosphere*, 313, 137511.
- Özaydın, F. (2023). "*Kutup tatlı su ve deniz suyu örneklerinden psikrofil ve psikrotolerant mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu*", Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Samsun, s. 90.
- Panicker, G., Aislabie, J., Saul, D., & Bej, A. K. (2002). "Cold tolerance of *Pseudomonas* sp. 30-3 isolated from oil-contaminated soil, Antarctica", *Polar Biol*, 25, 5–11. doi: 10.1007/s003000100304
- Panicker, G., Mojib, N., Nakatsuji, T., Aislabie, J. & Bej, A. K. (2010). "Occurrence and distribution of capB in Antarctic microorganisms and study of its structure and regulation in the Antarctic biodegradative *Pseudomonas* sp", *Extremophiles*, 14, 171-183.
- Papale, M., Rizzo, C., Caruso, G., La Ferla, R., Maimone, G., Lo Giudice, A., Azzaro, M., et al. (2021). "First Insights into the Microbiology of Three Antarctic Briny Systems of the Northern Victoria Land", *Diversity*, 13(7), 323. <http://dx.doi.org/10.3390/d13070323>
- Pearce, D. A., Bridge, P. D., Hughes, K. A., Sattler, B., Psenner, R. & Russell, N. J. (2009). "Microorganisms in the atmosphere over Antarctica", *FEMS Microbiol Ecol*, 69(2):143-57. doi: 10.1111/j.1574-6941.2009.00706.x. PMID: 19527292.
- Phadtare, S., Alsina, J. & Inouye, M. (1999). "Cold shock response and cold shock proteins". *Current Opinion in Microbiology*. 2;175-180.
- Pospiech, A. & Neumann B. (1995). "A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria", *Trends Genet.*, 11:217-218.

- Quillaguaman, J., Hashim, S., Bento, F., Mattiasson, B. & Hatti-Kaul, R. (2005). "Poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate) production by a moderate halophile, *Halomonas boliviensis* LC1 using starch hydrolysate as substrate", *Journal of applied microbiology*, 99(1), 151-157.
- Rios, P., Bezus, B., Cavalitto, S. & Cavello, I. (2022). "Production and characterization of a new detergent-stable keratinase expressed by *Pedobacter* sp. 3.14. 7, a novel Antarctic psychrotolerant keratin-degrading bacterium", *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-14.
- Rong, J. C., Liu, Y., Yu, S., Xi, L., Chi, N. Y. & Zhang, Q. F. (2020). "Complete genome sequence of *Paenisporosarcina antarctica* CGMCC 1.6503 T, a marine psychrophilic bacterium isolated from Antarctica", *Marine Genomics*, 49, 100690.
- Ruisi, S., Barreca, D., Selbmann, L., Zucconi, L. & Onofri, S. (2007). "Fungi in Antarctica", *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6, 127-141.
- Salwom, L., Raja Abd. Rahman, R. N. Z., Salleh, A. B., Mohd. Shariff, F., Convey, P. & Mohamad Ali, M. S. (2019). "New recombinant cold-adapted and organic solvent tolerant lipase from psychrophilic *Pseudomonas* sp. LSK25, isolated from Signy Island Antarctica", *International journal of molecular sciences*, 20(6), 1264.
- Santiago, I. F., Rosa, C. A. & Rosa, L. H. (2017). "Endophytic symbiont yeasts associated with the Antarctic angiosperms *Deschampsia antarctica* and *Colobanthus quitensis*", *Polar Biology*, 40, 177-183.
- Sasaki, K., Kim, M. H., & Imai, R. (2013). "Arabidopsis COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2 is a negative regulator of cold acclimation", *New Phytologist*, 198(1), 95-102.
- Seckbach, J., Oren, A. & Stan-Lotter, H. (2013). "Polyextremophiles: life under multiple forms of stress", *Springer Science & Business Media*, vol. 27.
- Shivaji, S. (2017). "Bacterial biodiversity, cold adaptation and biotechnological importance of bacteria occurring in Antarctica", *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 83: p. 327-352.
- Silva, T. R., Duarte, A. W., Passarini, M. R., Ruiz, A. L. T., Franco, C. H., Moraes, C. B., ... & Oliveira, V. M. (2018). "Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities". *Polar Biology*, 41, 1505-1519.
- Singha, L. P., Kotoky, R. & Pandey, P. (2017). "Draft Genome Sequence of *Pseudomonas fragi* Strain DBC, Which Has the Ability To Degrade High-Molecular-Weight Polyaromatic Hydrocarbons", *Genome Announcements*, 5(49):e01347-17. DOI: 10.1128/genomea.01347-17
- Stanley, J. (2002). "Biodiversity of Microbial life", *Wiley-Liss*, New York.

- Styczyński, M. (2022). "Analysis of the biochemical properties, biological activity and biotechnological potential of secondary metabolites produced by Antarctic psychrotolerant bacteria", Uniwersytet Warszawski Department of Environmental Microbiology and Biotechnology Doktoraty Wydziału Biologii.
- Styczynski, M., Biegniewski, G., Decewicz, P., Rewerski, B., Debiec-Andrzejewska, K., & Dziewit, L. (2022). "Application of psychrotolerant Antarctic bacteria and their metabolites as efficient plant growth promoting agents", *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10.
- Şafak, H., Otur, Ç. & Kurt-Kızıldoğan, A. (2020). "Molecular and biochemical characterization of a recombinant endoglucanase rCKT3eng, from an extreme halophilic *Haloarcula* sp. strain CKT3", *Int J Biol Macromol*, 15;151:1173-1180. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.161. Epub 2019 PMID: 31751744.
- Tan, I. K. P., Foong, C. P., Tan, H. T., Lim, H., Zain, N. A. A., Tan, Y. C., ... & Sudesh, K. (2020). "Polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase genes and PHA-associated gene clusters in *Pseudomonas* spp. and *Janthinobacterium* spp. isolated from Antarctica", *Journal of biotechnology*, 313, 18-28.
- Tanimura, A., Hoshiai, T. & Fukuchi, M. (1996). "The life cycle strategy of the ice-associated copepod, *Paralabidocera antarctica* (Calanoida, Copepoda), at Syowa Station, Antarctica", *Antarctic Science*, 8(3), 257-266.
- Thompson J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). "Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting positionspecific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 4673–4680.
- Tomova, I., Stoilova-Disheva, M., Lazarkevich, I. & Vasileva-Tonkova, E. (2015). "Antimicrobial activity and resistance to heavy metals and antibiotics of heterotrophic bacteria isolated from sediment and soil samples collected from two Antarctic islands", *Frontiers in Life Science*, 8(4), 348-357.
- Üzümcü, Z. (2009). "Pseudomonas sp. suşlarında cold shock protein izolasyonu ve SDS-PAGE analizi", Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, Adana, s. 69.
- Wang, G. Y., Li, M., Ma, F., Wang, H. H., Xu, X. L. & Zhou, G. H. (2017). "Physicochemical properties of *Pseudomonas fragi* isolates response to modified atmosphere packaging", *FEMS microbiology letters*, 364(11).
- Wei, Y. Z., Huang, P. W., Liu, Y., He, W. & Fang W-W. (2016). "Cold stress promoting a psychrotolerant bacterium *Pseudomonas fragi* P121 producing trehalase", *World J Microbiol Biotechnol* 32(134). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2097-1>
- White, A. & Hughes, J. M. (2019). "Critical importance of a one health approach to antimicrobial resistance". *EcoHealth*, 16, 404-409.

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study", *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Valerie, M., Isabelle, L., Depret, G., Anglade, P., Labadie, J. E. A. N. & Hébraud, M. (1997). "The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid-binding proteins", *Journal of Bacteriology*, 179(23), 7331-7342.
- van den Burg, B. (2003). "Extremophiles as a source for novel enzymes", *Current opinion in microbiology*, 6(3), 213-218.
- Velicogna, I., Mohajerani, Y., Landerer, F., Mouginot, J., Noel, B., Rignot, E. & Wiese, D. (2020). "Continuity of ice sheet mass loss in Greenland and Antarctica from the GRACE and GRACE Follow-On missions", *Geophysical Research Letters*, 47(8).
- Ventosa, A., Nieto, J. J. & Oren, A. (1998). "Biology of moderately halophilic aerobic bacteria". *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(2), 504-544.
- Vincent, W. (2000). "Evolutionary origins of Antarctic microbiota: Invasion, selection and endemism", *Antarctic Science*, 12(3), 374-385. doi:10.1017/S0954102000000420.
- Vyverman, W., Verleyen, E., Wilmotte, A., Hodgson, D. A., Willems, A., Peeters, K., ... & Sabbe, K. (2010). "Evidence for widespread endemism among Antarctic micro-organisms", *Polar Science*, 4(2), 103-113.
- Xu, J., Li, Q., Zhang, J., Li, X. & Sun, T. (2021). "In silico structural and functional analysis of cold shock proteins in *Pseudomonas fluorescens* PF08 from marine fish", *Journal of Food Protection*, 84(8), 1446-1454.
- Yang, J. & Zhang, Y. (2015). "I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions", *Nucleic Acids Res.*, 43.
- Yu, T. F., Xu, Z. S., Guo, J. K., Wang, Y. X., Abernathy, B., Fu, J. D., ... & Ma, Y. Z. (2017). "Improved drought tolerance in wheat plants overexpressing a synthetic bacterial cold shock protein gene *SeCspA*", *Scientific reports*, 7(1), 1-14.
- Zakaria, N. N., Convey, P., Gomez-Fuentes, C., Zulkharnain, A., Sabri, S., Shaharuddin, N. A. & Ahmad, S. A. (2021). "Oil bioremediation in the marine environment of Antarctica: A review and bibliometric keyword cluster analysis", *Microorganisms*, 9(2), 419.
- Zelano, I., Malandrino, M., Giacomino, A., Buoso, S., Conca, E., Sivry, Y., ... & Abollino, O. (2017). "Element variability in lacustrine systems of Terra Nova Bay (Antarctica) and concentration evolution in surface waters", *Chemosphere*, 180, 343-355.

- Zhou, Z., Tang, H., Wang, W., Zhang, L., Su, F., Wu, Y.... & Xu, P. (2021). "A cold shock protein promotes high-temperature microbial growth through binding to diverse RNA species", *Cell Discov*, 7, 15. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00246-5>
- Zhuo, X., Qin, Y., He, P., Wei, P., Zhang, B., Chen, X. & Peng, J. (2021). "Transcriptomic analysis of *Litopenaeus vannamei* hepatopancreas under cold stress in cold-tolerant and cold-sensitive cultivars", *Gene*, 764, 145090.
- Zhang, Y., Burkhardt, D. H., Rouskin, S., Li, G. W., Weissman, J. S., & Gross, C. A. (2018). A stress response that monitors and regulates mRNA structure is central to cold shock adaptation. *Molecular cell*, 70(2), 274-286.



## EKLER

### EK-A: Proje Kapsamında Alınan Örneklerin İzin Belgesi



**Turkish Antarctic Expedition  
2018 - 2019**

**Permit N° 17 - 2019**

**For Collection of Antarctic Scientific Samples**

The Head of the Environmental Section of the Turkish Antarctic Program, according to the Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty, Annex 2 -Conservation of Antarctic Fauna and Flora-, following the Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR) Environmental Guidelines, authorizes the collection of scientific samples for the project below:

- 1. PROJECT:** Genomic analysis of herbicides (Dalapon and Bromoxynil) fragmenting psychophilic and psychrotolerant microorganism studies
- 2. RESEARCHERS:** Ersan Basar
- 3. INSTITUTION:** Karadeniz Technical University
- 4. SAMPLES TO BE COLLECTED:**

| Sample           | Amount |
|------------------|--------|
| Lake Water       | 250 ml |
| Fresh Water      | 250 ml |
| Soil             | 250 ml |
| Salinity Water   | 250 ml |
| Ice              | 250 ml |
| Water with algae | 500 ml |
| Water mix soil   | 250 ml |
- 5. COLLECTION SITES:** Western Antarctic Peninsula
- 6. COLLECTION TIME:** 25<sup>th</sup> of January 2019 – 9<sup>th</sup> of March 2019

ITU Polar Research Center, 34940 Tuzla/IST/Turkey. Phone +90 - 216 - 4462054 (1188). [kutup@itu.edu.tr](mailto:kutup@itu.edu.tr)

## **EK-B: Çalışmada Kullanılan Besiyeri İçerikleri**

### **Nutrient Broth \ Merck (1.05443)**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Peptone from meat | 5 g/L |
| Meat extract      | 3 g/L |
| pH (25°)          | 7.0   |

### **Mueller Hinton Broth \ BD-Difco (275730)**

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Beef extract         | 2 g/L    |
| Casein (Acid digest) | 17.5 g/L |
| Soluble starch       | 1.5 g/L  |
| pH (25°)             | 7.3      |



## **EK-C: Çalışmada Kullanılan Tamponlar ve Çözeltiler**

### **CTAB/NaCl Çözeltisi**

|      |       |
|------|-------|
| CTAB | %10   |
| NaCl | 0.7 M |

80 mL distile su içerisine 10 g CTAB ve 4,1 g NaCl eklenerek 65 °C’de çözdürülür. Son hacim distile su ile 100 mL’ye tamamlanır.

### **Etidyum Bromür Çözeltisi**

|                |          |
|----------------|----------|
| Etidyum bromür | 10 mg/mL |
|----------------|----------|

### **Fenol:Kloroform:Izoamil alkol (25:24:1)**

|                           |        |
|---------------------------|--------|
| Fenol (Saturated, pH 7.5) | 5 mL   |
| Kloroform                 | 4,8 mL |
| Izoamil alkol             | 0,2 mL |

### **SET Tamponu**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| NaCl              | 75 mM |
| EDTA (pH 8,0)     | 25 mM |
| Tris-HCl (pH 7,5) | 20 mM |

### **TAE (50X)**

|               |       |
|---------------|-------|
| Trizma base   | 2 M   |
| EDTA (pH 8,0) | 50 mM |
| Asetik asit   | 1 M   |

### **TE Tamponu**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl (pH 8.0) | 10 mM |
| EDTA (pH 8.0)     | 1 mM  |

## **EK-D: Çalışmada Kullanılan Kimyasallar, Enzimler ve Kitler**

### **a) Kimyasallar**

|                           |                     |
|---------------------------|---------------------|
| 2-propanol (İzopropanol)  | Isolab              |
| 6X Gel Loading Dye Purple | New England BioLabs |
| Agar                      | BD-Bacto            |
| Agaroz                    | BIOMAX              |
| Asetik asit               | Merck               |
| EDTA                      | Sigma               |
| Etanol                    | Isolab              |
| Etidyum bromür            | Sigma               |
| Fenol                     | Ambresco            |
| İzoamil alkol             | Merck               |
| Kloroform                 | Merck               |
| NaCl                      | Isolab              |
| SDS                       | Merck               |
| Trizma base               | Sigma               |

### **b) Enzimler**

|                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Lizozim                             | Sigma                    |
| Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz | Thermo Fisher Scientific |
| Proteinaz K                         | Sigma                    |
| Q5 DNA Polimeraz                    | New England BioLabs      |

### **c) Kitler**

|                                               |                          |
|-----------------------------------------------|--------------------------|
| Nucleospin® Gel and PCR CleanUp               | Macherey-Nagel           |
| Nucleospin® RNA Isolation                     | Macherey-Nagel           |
| TURBO DNA-free™ Kit                           | Invitrogen               |
| High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kiti | Thermo Fisher Scientific |
| GoTaq® qPCR Master Mix                        | Promega                  |

## **EK-E: Klonlanan Amplikonların Nükleotit ve Amino Asit Dizileri**

### **>P. fragi AC'ye ait OR150484 erişim numaralı tüm 16S rRNAnükleotit dizisi**

GGCGGCCTACACATGCAGTCGAGCGGTAGAGAGAAGCTTGCTTCTCTTGAGAGCGGCGGACG  
GGTGAGTAATACCTAGGAATCTGCCTGATAGTGGGGGATAACGTTTCGGAAACGGACGCTAAT  
ACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCT  
AGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTACGATCCGTAACCTGGTCTG  
AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTT  
CGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTTACCTAATACGTGATTGTCTTGAC  
GTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGC  
AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGAATGTGA  
AATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAGTATGGTAGAGGGT  
AGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGG  
CGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT  
ACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTGGGAGTCTTGAACCTCTTAGTG  
GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAAGTCAAATG  
AATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGCCTTGACATCCAATGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACATTG  
AGACAGGTGCTGCATGGCTGTCTGTCACCTCCTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGTAAC  
GAGCGCAACCCTTGTCCTTAGTTACCAGCACGTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGG  
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTAC  
ACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAA  
AACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAA  
TCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC  
ATGGGAGTGGGTTCACCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTACCACGGTTGT

### **>P. fragi AC'ye ait OR166999 erişim numaralı csp2 geninin nükleotit dizisi**

ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTCAT  
CACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTCTGTAAGCTTCAAAGCTATCGAAAGCGACGGTT  
TCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAAACCGTTTCTTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAGGGTATG  
CAAGCTGCACAGGTTCGTCCGGAGTAA

### **>P. fragi AC'ye ait CSP2 proteininin amino asit dizisi**

MSNRQTGTVKWFNDEKGFGFITPQGGDDLFLVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQKGM  
QAAQVRPE

### **>P. fragi AC'ye ait OR167000 erişim numaralı csp5 geninin nükleotit dizisi**

ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTCAT  
CACCCCTGAAAGTGGTCCAGATCTGTTTGTGCACTTTCGTGCCATTTCAGGGCAACGGCTTCA  
AAAGCCTGAAAGAAGGCCAAAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAAGGCCAAAAAGGCCTGCAG  
GCTGACGAAGTTCAACCAGAAGCCTGA

### **>P. fragi AC'ye ait CSP5 proteininin amino asit dizisi**

MSQRQSGTVKWFNDEKGFGFITPESGPDFLVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFIAVQGGQKGLQ  
ADEVQPEA

## EK-F: csp/CSP BLAST Analizi Sonuçları

### Csp1

Sequence ID: **Query\_51749** Length: 213 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 213 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                        | Identities    | Gaps      | Strand     |
|---------------|---------------------------------------------------------------|---------------|-----------|------------|
| 394 bits(213) | 8e-115                                                        | 213/213(100%) | 0/213(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC   | 60            |           |            |
| Sbjct 213     | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC   | 154           |           |            |
| Query 61      | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 120           |           |            |
| Sbjct 153     | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 94            |           |            |
| Query 121     | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG   | 180           |           |            |
| Sbjct 93      | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG   | 34            |           |            |
| Query 181     | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTTCGTCCGGAGTAA                            | 213           |           |            |
| Sbjct 33      | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTTCGTCCGGAGTAA                            | 1             |           |            |

Sequence ID: **Query\_116257** Length: 70 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 70 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Method                       | Identities  | Positives   | Gaps     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-------------|----------|
| 143 bits(360) | 3e-52                                                        | Compositional matrix adjust. | 70/70(100%) | 70/70(100%) | 0/70(0%) |
| Query 1       | MSNRQTGTWKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Sbjct 1       | MSNRQTGTWKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Query 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |
| Sbjct 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |

**Query: csp2/ CSP2**

**Subject: csp1/ CSP1**

### Csp3

Sequence ID: **Query\_35203** Length: **213** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 213 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Identities    | Gaps      | Strand     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|---------------|-----------|------------|
| 394 bits(213) | 8e-115                                                       | 213/213(100%) | 0/213(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC  | 60            |           |            |
| Sbjct 213     | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC  | 154           |           |            |
| Query 61      | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTCTGACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 120           |           |            |
| Sbjct 153     | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTCTGACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 94            |           |            |
| Query 121     | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG  | 180           |           |            |
| Sbjct 93      | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG  | 34            |           |            |
| Query 181     | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTTCGTCCGGAGTAA                           | 213           |           |            |
| Sbjct 33      | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTTCGTCCGGAGTAA                           | 1             |           |            |

Sequence ID: **Query\_14307** Length: **70** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 70 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Method                       | Identities  | Positives   | Gaps     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-------------|----------|
| 143 bits(360) | 3e-52                                                        | Compositional matrix adjust. | 70/70(100%) | 70/70(100%) | 0/70(0%) |
| Query 1       | MSNRQTGTVKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Sbjct 1       | MSNRQTGTVKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Query 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |
| Sbjct 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |

**Query: csp2/ CSP2**

**Subject: csp3/ CSP3**

## CsDbp1

Sequence ID: **Query\_56427** Length: 213 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 213 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                        | Identities    | Gaps      | Strand    |
|---------------|---------------------------------------------------------------|---------------|-----------|-----------|
| 394 bits(213) | 8e-115                                                        | 213/213(100%) | 0/213(0%) | Plus/Plus |
| Query 1       | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC   | 60            |           |           |
| Sbjct 1       | ATGTCTAATCGCCAAACCGGCACCGTAAATGGTTCAACGATGAAAAAGGCTTCGGCTTC   | 60            |           |           |
| Query 61      | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 120           |           |           |
| Sbjct 61      | ATCACTCCTCAAGGTGGCGGTGACGACCTGTTTCGTACACTTCAAAGCTATCGAAAGCGAC | 120           |           |           |
| Query 121     | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG   | 180           |           |           |
| Sbjct 121     | GGTTTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGACCGTTTCCTTCGTGGCTGAGAAAGGCCAAAAG   | 180           |           |           |
| Query 181     | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTCTCCGGAGTAA                              | 213           |           |           |
| Sbjct 181     | GGTATGCAAGCTGCACAGGTTCTCCGGAGTAA                              | 213           |           |           |

Sequence ID: **Query\_56697** Length: 70 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 70 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Method                       | Identities  | Positives   | Gaps     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------|-------------|----------|
| 143 bits(360) | 3e-52                                                        | Compositional matrix adjust. | 70/70(100%) | 70/70(100%) | 0/70(0%) |
| Query 1       | MSNRQTGTVKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Sbjct 1       | MSNRQTGTVKWFNDEKGFGITPQGGGDDL FVHFKAIESDGFKSLKEGQTVSFVAEKGQK | 60                           |             |             |          |
| Query 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |
| Sbjct 61      | GMQAAQVRPE                                                   | 70                           |             |             |          |

**Query: csp2/ CSP2**

**Subject: csDbp1/CSDBP1**

## Csp4

Sequence ID: **Query\_56819** Length: **213** Number of Matches: **1**

Range 1: 6 to 213 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Identities   | Gaps      | Strand     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|--------------|-----------|------------|
| 296 bits(160) | 2e-85                                                        | 192/208(92%) | 0/208(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTTAACGACGAGAAAGGTTTTGGTTTC | 60           |           |            |
| Sbjct 213     | ATGTCACAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTC | 154          |           |            |
| Query 61      | ATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATTCAAGGTAATGGC | 120          |           |            |
| Sbjct 153     | ATCACCCCTGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATCCAGGGCAACGGC | 94           |           |            |
| Query 121     | TTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAAGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |            |
| Sbjct 93      | TTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCTCGGTTCAAGGGCCAAAAAGGC | 34           |           |            |
| Query 181     | CTGCAGGCTGATGAAGTGCAAGCAGAAG                                 | 208          |           |            |
| Sbjct 33      | CTGCAGGCTGACGAAGTTCAAGCAGAAG                                 | 6            |           |            |

Sequence ID: **Query\_17405** Length: **70** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                    | Method                       | Identities | Positives   | Gaps     |
|---------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|----------|
| 139 bits(350) | 9e-51                                                     | Compositional matrix adjust. | 68/69(99%) | 69/69(100%) | 0/69(0%) |
| Query 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Sbjct 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Query 61      | LQADEVQAE                                                 | 69                           |            |             |          |
| Sbjct 61      | LQADEVQAE                                                 | 69                           |            |             |          |

**Query: csp5/CSP5**

**Subject: csp4/CSP4**

## Csp6

Sequence ID: **Query\_29617** Length: **213** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 208 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                        | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|---------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 291 bits(157) | 1e-83                                                         | 191/208(92%) | 0/208(0%) | Plus/Plus |
| Query 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTTAACGACGAGAAAGGTTTTGGTTTC  | 60           |           |           |
| Sbjct 1       | ATGTCACAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTC  | 60           |           |           |
| Query 61      | ATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATTACAGGGAATGGC  | 120          |           |           |
| Sbjct 61      | ATCACCCCTGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATCCAGGGCAACGGC  | 120          |           |           |
| Query 121     | TTCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTACAGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |           |
| Sbjct 121     | TTCAAAAGCCTGAAAGGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCTCGGTACAGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |           |
| Query 181     | CTGCAGGCTGATGAAGTCAAGCAGAAG                                   | 208          |           |           |
| Sbjct 181     | CTGCAGGCTGACGAAGTTCAAGCAGAAG                                  | 208          |           |           |

Sequence ID: **Query\_47599** Length: **70** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                      | Method                       | Identities | Positives   | Gaps     |
|---------------|-------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|----------|
| 139 bits(350) | 9e-51                                                       | Compositional matrix adjust. | 68/69(99%) | 69/69(100%) | 0/69(0%) |
| Query 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDLFVHFRAIQNGGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Sbjct 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDLFVHFRAIQNGGFKSLKEGQKVTFISVQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Query 61      | LQADEVQAE                                                   | 69                           |            |             |          |
| Sbjct 61      | LQADEVQAE                                                   | 69                           |            |             |          |

**Query:** csp5/CSP5

**Subject:** csp6/CSP6

## Csp7

Sequence ID: **Query\_109095** Length: 213 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 208 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                        | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|---------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 291 bits(157) | 1e-83                                                         | 191/208(92%) | 0/208(0%) | Plus/Plus |
| Query 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTTAACGACGAGAAAGGTTTTGGTTTC  | 60           |           |           |
| Sbjct 1       | ATGTCAACAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTC | 60           |           |           |
| Query 61      | ATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATTCAAGGTAATGGC  | 120          |           |           |
| Sbjct 61      | ATCACCCCTGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATCCAGGGCAACGGC  | 120          |           |           |
| Query 121     | TTCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAAGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |           |
| Sbjct 121     | TTCAAAAGCCTGAAAGGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCTCGGTACAGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |           |
| Query 181     | CTGCAGGCTGATGAAGTGCAAGCAGAAG                                  | 208          |           |           |
| Sbjct 181     | CTGCAGGCTGACGAAGTTCAAGCAGAAG                                  | 208          |           |           |

Sequence ID: **Query\_25823** Length: 70 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                    | Method                       | Identities | Positives   | Gaps     |
|---------------|-----------------------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|----------|
| 139 bits(350) | 9e-51                                                     | Compositional matrix adjust. | 68/69(99%) | 69/69(100%) | 0/69(0%) |
| Query 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFIAVQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Sbjct 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKG | 60                           |            |             |          |
| Query 61      | LQADEVQAE                                                 | 69                           |            |             |          |
| Sbjct 61      | LQADEVQAE                                                 | 69                           |            |             |          |

**Query:** csp5/CSP5

**Subject:** csp7/CSP7

## Csp8

Sequence ID: **Query\_48189** Length: **213** Number of Matches: **1**

Range 1: 6 to 213 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                         | Identities   | Gaps      | Strand     |
|---------------|----------------------------------------------------------------|--------------|-----------|------------|
| 296 bits(160) | 2e-85                                                          | 192/208(92%) | 0/208(0%) | Plus/Minus |
| Query 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTTAAACGACGAGAAAGGTTTTGGTTTC  | 60           |           |            |
| Sbjct 213     | ATGTCACAACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAGGGGTTTGGTTTC   | 154          |           |            |
| Query 61      | ATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATTCAAGGGTAATGGC  | 120          |           |            |
| Sbjct 153     | ATCACCCCTGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATCCAGGGCAACGGC   | 94           |           |            |
| Query 121     | TTCAAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTCAGGGCCAAAAAGGC   | 180          |           |            |
| Sbjct 93      | TTCAAAAGCCTGAAAGGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCTCGGTTCAAGGGCCAAAAAGGC | 34           |           |            |
| Query 181     | CTGCAGGCTGATGAAGTGCAAGCAGAAG                                   | 208          |           |            |
| Sbjct 33      | CTGCAGGCTGACGAAGTTCAAGCAGAAG                                   | 6            |           |            |

Sequence ID: **Query\_70463** Length: **70** Number of Matches: **1**

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Method                       | Identities | Positives   | Gaps     |
|---------------|--------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|----------|
| 139 bits(350) | 9e-51                                                        | Compositional matrix adjust. | 68/69(99%) | 69/69(100%) | 0/69(0%) |
| Query 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDLFVHFRAIQNGGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKKG | 60                           |            |             |          |
| Sbjct 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDLFVHFRAIQNGGFKSLKEGQKVTFI+VQGQKKG | 60                           |            |             |          |
| Query 61      | LQADEVQAE                                                    | 69                           |            |             |          |
| Sbjct 61      | LQADEVQAE                                                    | 69                           |            |             |          |

**Query: csp5/CSP5**

**Subject: csp8/CSP8**

## CsDbp2

Sequence ID: **Query\_25791** Length: 213 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 208 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score         | Expect                                                       | Identities   | Gaps      | Strand    |
|---------------|--------------------------------------------------------------|--------------|-----------|-----------|
| 296 bits(160) | 2e-85                                                        | 192/208(92%) | 0/208(0%) | Plus/Plus |
| Query 1       | ATGTCCCAACGTCAGAGCGGTACCGTTAAGTGGTTTAAACGACGAGAAAGGTTTGGTTTC | 60           |           |           |
| Sbjct 1       | ATGTCAACACGTCAGAGCGGTACCGTCAAGTGGTTCAACGACGAGAAAGGGTTTGGTTTC | 60           |           |           |
| Query 61      | ATTACCCCGGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATTAGGGTAATGGC  | 120          |           |           |
| Sbjct 61      | ATCACCCCTGAAAGCGGTCCGGACCTGTTTGTGCACTTCCGTGCCATCCAGGGCAACGGC | 120          |           |           |
| Query 121     | TTCAAAGCCTGAAAGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCGCAGTTAGGGGCCAAAAAGGC  | 180          |           |           |
| Sbjct 121     | TTCAAAGCCTGAAAGGAAGGCCAGAAAGTGACCTTCATCTCGGTTAGGGGCCAAAAAGGC | 180          |           |           |
| Query 181     | CTGCAGGCTGATGAAGTGCAAGCAGAAG                                 | 208          |           |           |
| Sbjct 181     | CTGCAGGCTGACGAAGTTCAAGCAGAAG                                 | 208          |           |           |

Sequence ID: **Query\_23771** Length: 70 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 69 [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

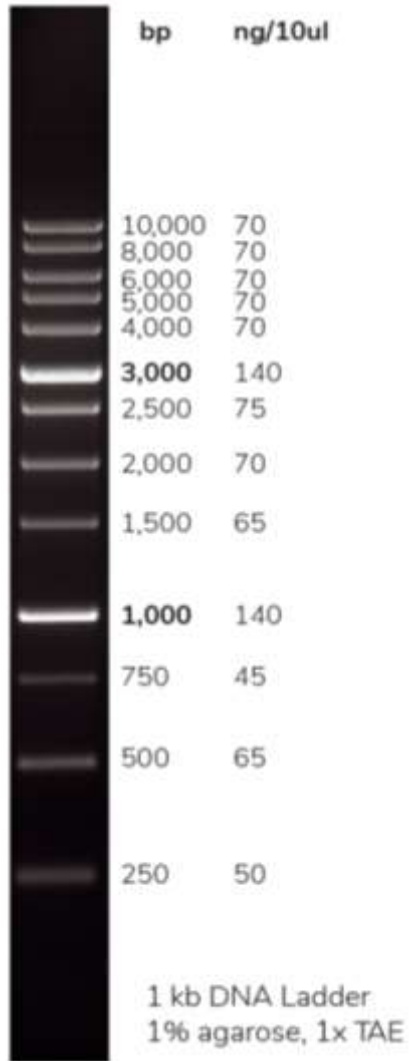
| Score         | Expect                                                     | Method                       | Identities | Positives   | Gaps     |
|---------------|------------------------------------------------------------|------------------------------|------------|-------------|----------|
| 139 bits(350) | 9e-51                                                      | Compositional matrix adjust. | 68/69(99%) | 69/69(100%) | 0/69(0%) |
| Query 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFI+VQGGQKG | 60                           |            |             |          |
| Sbjct 1       | MSQRQSGTVKWFNDEKGFGITPESGPDFVHFRAIQNGFKSLKEGQKVTFI+VQGGQKG | 60                           |            |             |          |
| Query 61      | LQADEVQAE                                                  | 69                           |            |             |          |
| Sbjct 61      | LQADEVQAE                                                  | 69                           |            |             |          |

**Query: csp5/CSP5**

**Subject: csDbp2/CSDBP2**

## EK-G: Çalışmada Kullanılan DNA Markör Büyüklükleri

Solis BioDyne 1 kb DNA Ladder Ready to Load (07-12-00050)



## ÖZ GEÇMİŞ

Ömer KONUKSEVER Samsun 100. Yıl Lisesi’ni bitirdikten sonra Atatürk Üniversitesi Hınıs Meslek Yüksekokulu, Gıda Teknolojisi bölümünden Ocak 2011’de mezun oldu. Daha sonra burada ilgi duymaya başladığı biyoteknoloji alanında eğitim almak üzere Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji bölümünü okumaya başladı ve 01.06.2017 tarihinde buradaki eğitimini tamamladı. 2019 yılında OMÜ LEE Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi.

### İletişim Bilgileri:

ORCID ID : 0000-0001-6613-793X

### Yayınlar:

1. Recombinant Expression Purification of Serine Protease Enzyme of *Haloarcula* sp. TG1 in *Escherichia coli* BL21DE3, 9. International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Kars, 2020.
2. *Psychrobacter* sp. strain TaeBurcu002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence, MN960390.1, NCBI; Genbank. TÜBİTAK, Ulusal Kutup Bilim Programı (2018-2022), 5. İzleme ve Değerlendirme Raporu.

### Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar:

1. 117Z808-TÜBİTAK 1001 “*Streptomyces clavuligerus*’ta AdpA Pleiotropik Regülatörünün Tunikamisin Biyosentezi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi” isimli projede bursiyer. Yürütücü: Aslıhan KURT KIZILDOĞAN 01/08/2018 - 01/08/2020.
2. 121Z821-TÜBİTAK 1001 “TunRS iki bileşenli sistemin *Streptomyces clavuligerus*’ta tunikamisin biyosentezi üzerindeki düzenleyici etkisinin araştırılması” isimli projede bursiyer. Yürütücü: Aslıhan KURT KIZILDOĞAN 15/11/2021 – Devam.

### Staj:

- |                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| 1. Tarbio Biyoteknoloji, Bitki ıslahı | Yaz stajı |
|---------------------------------------|-----------|

### Kurs ve Sertifikalar:

- |                                        |                                  |
|----------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Biyoinformatik Eğitimi              | Erciyes Üniversitesi – GenKök    |
| 2. GLOBALG.A.P Eğitimi                 | NAVİGA                           |
| 3. GLP - İyi Laboratuvar Akreditasyonu | Kırklareli Üniversitesi – KLUSEM |
| 4. ISO 9001 - Kalite Yönetim Sistemi   | CPA Danışmanlık                  |