



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



FARKLI AZOT KAYNAKLARI
KULLANILARAK ÇOĞALTILAN
CEREIBACTER SPHAEROIDES O.U.001'İN
RNA-Seq BAZLI TRANSKRİPTOM PROFİLİ

MERVE BAŞTUTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Nisan-2025
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Merve BAŞTUTAN tarafından hazırlanan “Farklı Azot Kaynakları Kullanılarak Çoğaltılan *Cereibacter sphaeroides* O.U.001'in RNA-Seq Bazlı Transkriptom Profili” adlı tez çalışması 18/04/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

.....

Danışman

Prof. Dr. Gökhan KARS

.....

Üye

Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 23YL15004 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Merve BAŞTUTAN

Tarih: 18.04.2025

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI AZOT KAYNAKLARI KULLANILARAK ÇOĞALTILAN *CEREIBACTER SPHAEROIDES* O.U.001'İN RNA-Seq BAZLI TRANSKRİPTOM PROFİLİ

Merve BAŞTUTAN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2025, 123 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Fotosentetik bakteri grubunda yer alan ve mor kükürt içermeyen (PNS) gram negatif bir bakteri olan *Cereibacter sphaeroides* O.U.001 (*Rhodobacter sphaeroides* O.U.001) çeşitli fizyolojik şartlarda yaşamını devam ettirebilir. Genellikle göllerde ve sulak alanlarda bulunan bu bakteri hidrojen (H₂), B12 vitamini, koenzim Q10, poli-β-hidroksibutirat (PHB) üretimi ve azot (N₂) fiksasyonu gibi çok yönlü metabolizmaya sahiptir. Atmosferin çoğunu oluşturan N₂ gazı birçok organizma tarafından doğrudan kullanılamaz. Diazotroflarda bulunan nitrojenaz enzimi ATP kullanarak N₂'nin erişilebilir olan amonyaka (NH₃) indirgemeyi katalizler. Canlılarda molibden (Mo), vanadyum (V) ve sadece demir (Fe) içeren nitrojenaz olmak üzere üç çeşit nitrojenaz enzimi mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, *C. sphaeroides*'in diazotrofik koşullar altındaki transkriptomik profilini analiz ederek, gen ekspresyon düzeylerindeki farklılıkların karşılaştırmalı olarak belirlenmesidir. Bu kapsamda üç farklı azot kaynağı (glutamat, N₂ ve NH₄) içeren besiyerlerinde çoğaltılan *C. sphaeroides*'ten RNA izolasyonu yapılarak RNA-seq tabanlı karşılaştırmalı transkriptom analizleri yapıldı. Transkriptomik analiz sırasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları ve ardından ilgili transkriptin uzunluğuna göre normalize edilerek "Reads Per Kilobase" (RPK) değerleri elde edildi. Bu değerler ardından toplam okuma sayısına göre tekrar normalize edilerek "Transcripts Per Million" (TPM) değerleri çıkarıldı. Çalışma kapsamında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmek için 3 farklı grup içinde 9 farklı numunenin RNA dizilemesi gerçekleştirildi. Numuneler arasında gen ekspresyon analizine yönelik profil benzerliklerin anlaşılması için temel bileşen analizi (Principal Component Analysis, PCA) ve örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren genlerin ekspresyon profillerini göstermek için ısı grafiği (heatmap) oluşturuldu. Normalize edilmiş okuma sayıları üzerinden, deney grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişikliklerini tespit etmek için üç ayrı test grubu için diferansiyel ekspresyon analizi yapılmıştır. Her bir test grubu için tüm genlerin logFC ve "False Discovery Rate" (FDR) değerlerine göre dağılımları volkan gösterimi ile görselleştirildi. Son analiz olarak en düşük FDR değerine sahip genlerden normalize edilmiş okuma değerlerine göre kutu dağılım grafikleri gösterildi. Ayrıca transkriptomik analizi desteklemesi adına bu üç farklı koşulda çoğaltılan *C. sphaeroides*'teki *nifH* gen ekspresyon seviyesi qPCR ile tespit edildi. qPCR sonuçlarına göre *nifH* geninin ekspresyonu glutamat koşuluna kıyasla N₂ koşulunda 1.5 kat bir artış, glutamat koşuluna kıyasla NH₄ koşulunda 0.01 kat artış ve NH₄ koşuluna kıyasla N₂ koşulunda 150 kat bir artış elde edildi. Transkriptomik ve qPCR sonuçlarına göre özellikle azot fiksasyonundan sorumlu genlerin N₂ fiksasyon koşulunda aşırı ifadesi meydana gelirken NH₄ koşulunda ise bu genlerde baskılanma meydana geldiği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Azot; *Cereibacter sphaeroides*; Nitrojenaz; RNA-Seq; qPCR

ABSTRACT

MS THESIS

RNA-Seq BASED TRANSCRIPTOME PROFILING OF *CEREIBACTER SPHAEROIDES* O.U.001 GROWN USING DIFFERENT NITROGEN SOURCES

Merve BAŞTUTAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS

2025, 123 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ

Assist. Prof. Dr. Merve ÖZCAN TÜRKMEN

Cereibacter sphaeroides O.U.001 (*Rhodobacter sphaeroides* O.U.001), a gram-negative and purple non-sulfur bacteria bacterium classified among photosynthetic bacteria is capable of surviving under various physiological conditions. Commonly found in lakes and wetlands, this bacterium possesses a versatile metabolism, enabling the production of hydrogen (H₂), vitamin B₁₂, coenzyme Q10, poly-β-hydroxybutyrate (PHB), and the fixation of nitrogen (N₂). Although N₂ gas constitutes the majority of the atmosphere, it cannot be directly utilized by most organisms. In diazotrophs, the enzyme nitrogenase catalyzes the ATP-dependent reduction of N₂ to its bioavailable form, ammonia (NH₃). There are three types of nitrogenase enzymes in living organisms, classified based on their metal cofactors: molybdenum (Mo), vanadium (V), or iron (Fe). The aim of this study is to analyze the transcriptomic profile of *C. sphaeroides* under diazotrophic conditions and to comparatively assess differential gene expression levels. To this end, *C. sphaeroides* was cultured in media containing three different nitrogen sources (glutamate, N₂, and NH₄⁺), and total RNA was extracted for RNA-seq-based comparative transcriptomic analysis. During the transcriptomic analysis, the read counts mapped to each transcript were normalized based on transcript length to obtain Reads Per Kilobase (RPK) values. These values were further normalized to the total read count, yielding Transcripts Per Million (TPM) values. To ensure statistically significant results, RNA sequencing was performed on 9 different samples across 3 experimental groups. Principal Component Analysis (PCA) was used to assess the expression profile similarities among samples, and a heatmap was generated to visualize the expression profiles of the most variably expressed genes. Differential expression analysis was conducted for each of the three comparison groups using normalized read counts to identify statistically significant changes in gene expression. For each comparison, volcano plots were generated based on the log fold change (logFC) and False Discovery Rate (FDR) values of all genes. Additionally, boxplot distributions were generated for selected genes with the lowest FDR values based on their normalized read counts. To support the transcriptomic data, the expression level of the *nifH* gene was also quantified using qPCR in *C. sphaeroides* cultured under the three different nitrogen conditions. According to qPCR results, *nifH* expression increased 1.5-fold under N₂ conditions compared to glutamate, 0.01-fold under NH₄⁺ compared to glutamate, and 150-fold under N₂ compared to NH₄⁺ conditions. Both transcriptomic and qPCR analyses revealed that genes responsible for nitrogen fixation were highly upregulated under N₂ conditions, while being repressed under NH₄⁺ conditions.

Keywords: *Cereibacter sphaeroides*; Nitrogen; Nitrogenase; RNA-Seq; qPCR

ÖNSÖZ

Tezime hazırlanma sürecinde desteklerini esirgemeyen her koşulda bize destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Gökhan KARS'a teşekkürü borç bilirim. Tez savunma jüri üyeleri sayın Prof. Dr. Özlem DARCANSOY İŞERİ ve Dr. Öğretim Üyesi Merve ÖZCAN TÜRKMEN'e değerli katkıları için teşekkür ederim. Sevgili laboratuvar arkadaşlarım Tuğba BAŞ, Beyza Nur TAŞÇI, Innocent MANGA, Ayşenur ALTINKAYA, Besna DALMIŞ, Ayşe Nur SERİN, Sıdika ŞENSÖZLÜER, Nur Banu SOYLU ve lisans bölüm arkadaşlarıma bana sağladıkları motivasyon, yardım ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez projeme maddi destek sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, aldığım bütün kararlarımda arkamda duran ve bu günlere gelmeme benle birlikte emek veren sevgili annem Fatma BAŞTUTAN ve babam Musa BAŞTUTAN'a bütün desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Merve BAŞTUTAN
KONYA-2025

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. <i>Cereibacter sphaeroides</i> (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>) O.U.001.....	3
2.2. Nitrojenaz Enzim Sistemleri	5
2.2.1. Mo-Nitrojenaz.....	9
2.2.2. V-Nitrojenez	12
2.2.3. Fe-Nitrojenaz	14
2.3. <i>Cereibacter sphaeroides</i> ile N ₂ Fiksasyonu ve Gen Kontrol Mekanizması	16
2.4. Gen İfade Analiz Yöntemleri.....	19
2.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	20
2.4.2. RT-PCR	20
2.4.3. Mikro dizin (Mikroarray).....	21
2.5. RNA Dizileme (RNA-Seq)	23
2.5.1. Single-cell RNA-Seq	23
2.5.2. Bulk (toplu) RNA-Seq	25
2.5.3. Spatial (Uzamsal) RNA-Seq.....	26
2.5.4. RNA dizileme (RNA-Seq) iş akışı.....	27
2.5.5. RNA-Seq biyoinformatik analiz araçları	28
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	38
3.1. <i>Cereibacter sphaeroides</i> kültür ortamları.....	40
3.2. Büyüme eğrilerinin oluşturulması	43
3.3. pH eğrilerinin oluşturulması	44
3.4. DNA İzolasyonu	44
3.5. Primerlerin Tasarımı ve Tür Validasyonu	45
3.5.1. Primerlerin tasarımı	45
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	46
3.5.3. Agaroz jel elektroforezi	47
3.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyon ve Ekstraksiyonu	48

3.7. Transkriptom analizi için RNA İzolasyonu	50
3.8. <i>NifH</i> Ekspresyon Analizi	52
3.8.1. cDNA sentezi	52
3.8.2. Gerçek zamanlı PCR.....	53
3.9. Numune Kalite Kontrol ve Kütüphane Hazırlığı	54
3.10. Biyoinformatik Analiz	56
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	58
4.1. Büyüme eğrileri (OD) ve pH analizleri	58
4.1.1. Büyüme eğrileri (OD).....	58
4.1.2. pH analizleri.....	60
4.2. DNA İzolasyonu ve Tür Validasyonu	62
4.3. RNA izolasyonunun spektrofotometrik ölçüm sonuçları	64
4.4. Transkriptom analizi için RNA izolasyonu	64
4.5. Transkriptomik analiz sonuçları	65
4.5.1. Filtreleme ve Normalizasyon.....	67
4.5.2. Temel Bileşen Analizi (Principal Component Analysis, PCA).....	68
4.5.3. Isı Grafiği (Heatmap).....	69
4.5.4. Diferansiyel Ekspresyon Analizi	78
4.5.5. Diferansiyel Gen Ekspresyonunun Volkan Grafiği	86
4.5.6. Diferansiyel Ekspresyon	90
4.6. Üç farklı koşulda çoğaltılan <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'ten <i>nifH</i> ekspresyon analizi	96
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	99
5.1 Sonuçlar	99
5.2 Öneriler	100
6. KAYNAKLAR.....	101

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in sınıflandırılması	3
Tablo 2.2 nif, vnf ve anf operonlarından ilgili gen ürünlerinin fonksiyonu.	8
Tablo 3.1 Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyeri içeriği.....	39
Tablo 3.2 Eser element (20X) çözeltisinin içeriği	40
Tablo 3.3 Vitamin (20X) çözeltisinin içeriği	40
Tablo 3.4 N ₂ için tasarlanan B&P besiyeri	41
Tablo 3.5 NH ₄ için tasarlanan B&P besiyeri	42
Tablo 3.6 Tasarlanan primerler	46
Tablo 3.7 PCR içeriği.....	46
Tablo 3.8 16s rRNA PCR döngüsü	47
Tablo 3.9 <i>nifH</i> PCR döngüsü	47
Tablo 3.10 Glutamat için cDNA içeriği.....	53
Tablo 3.11 N ₂ için cDNA içeriği.....	53
Tablo 3.12 NH ₄ için cDNA içeriği.....	53
Tablo 3.13 qPCR içeriği.....	54
Tablo 3.14 qPCR program içeriği	54
Tablo 4.1 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'ten elde edilen DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümleri	62
Tablo 4.2 <i>C. sphaeroides</i> 'ten izole edilen RNA'nın miktar ve kalitesi	64
Tablo 4.3 Çalışılan örneklerle ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri .	66
Tablo 4.4 Azot fiksasyonunda rol alan genler ve görevleri	71
Tablo 4.5 Azot fiksasyonunda rol alan genlerin 3 farklı koşula göre ekspresyon değerleri	72
Tablo 4.6 Gerçekleştirilen karşılaştırma grupları ve anlamlı derece farklılık gösteren genlerin sayıları.....	78
Tablo 4.7 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (Glutamat-N ₂)	79
Tablo 4.8 30S ribozomal proteinler	80
Tablo 4.9 50S ribozomal proteinler	81
Tablo 4.10 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (Glutamat-NH ₄)	83
Tablo 4.11 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (N ₂ -NH ₄)	85

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 <i>Cereibacter sphaeroides</i>	4
Şekil 2.2 Nitrojenaz proteinleri ve kofaktörleri.....	6
Şekil 2.3 Mo-V-Fe nitrojenazın yapısı	7
Şekil 2.4 Molibden nitrojenaz enzim yapısı	10
Şekil 2.5 Moco, FeMoco, FeVco ve FeFeco biyosentezi	11
Şekil 2.6 FeMoco'nun biyosentezi.....	12
Şekil 2.7 V-nitrojenazın katalitik ünitesinin şematik gösterimi	13
Şekil 2.8 Vanadyum nitrojenaz enzim yapısı	14
Şekil 2.9 Fe ve MoFe protein katalitik döngüleri.....	15
Şekil 2.10 Mo-, V- ve Fe-nitrojenazların şematik diyagramları ve aktiviteleri.....	15
Şekil 2.11 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'te AppA/PpsR, PrrB/A ve FnrL tarafından fotosentez genlerinin redoks ve ışık bağımlı düzenlenmelerinin gösterimi	18
Şekil 2.12 Gen kontrol mekanizmaları	19
Şekil 2.13 Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü.....	20
Şekil 2.14 RT-PCR analiz adımları	21
Şekil 2.15 Mikrodizilerle transkripsiyon analizinde ana adımlar.....	22
Şekil 2.16 Single-cell RNA-Seq	24
Şekil 2.17 Tek hücreli RNA dizileme (scRNA-seq) iş akışı	25
Şekil 2.18 İki tür Bulk RNAseq kitaplığının ana hatları	26
Şekil 2.19 10X uzamsal transkriptomiklerin iş akışı.....	26
Şekil 2.20 GeoMx dijital uzamsal profil oluşturucunun iş akışı	27
Şekil 2.21 RNA dizileme (RNA-Seq) analiz basamakları	28
Şekil 2.22 Moleküler biyoloji tarihi boyunca dizileme gelişimi	29
Şekil 2.23 Illumina yöntemi iş akış şeması	31
Şekil 2.24 Roche 454 sistemi iş akışı	32
Şekil 2.25 SOLID sistem iş akış şeması	33
Şekil 2.26 Ion Torrent sisteminin basamakları.....	34
Şekil 2.27 Helicos TM tek molekül dizileme sistemi basamakları	35
Şekil 2.28 Sıfır modlu dalga kılavuzu (ZMW).....	36
Şekil 2.29 Oxford nanopore dizileme sistemi basamakları	37
Şekil 3.1 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in agar besiyerinde görüntüsü.....	38
Şekil 3.2 <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in katıdan sıvıya ekim şeması.....	39
Şekil 3.3 N ₂ gazı ile muamele	41
Şekil 3.4 Argon gazı ile muamele	41
Şekil 3.5 A) Glutamat 24. Saat görseli B) 48. saat görseli.....	42
Şekil 3.6 A) N ₂ 24. Saat görseli B) 48. saat görseli.....	43
Şekil 3.7 A) NH ₄ 24. Saat görseli B) 48. saat görseli.....	43
Şekil 3.8 DNA izolasyon basamaklarının şematik gösterimi	45
Şekil 3.9 RNA izolasyon basamaklarının şematik gösterimi	51
Şekil 3.10 Kütüphane Hazırlığı İş Akışı.....	55
Şekil 3.11 Biyoinformatik Analiz İş Akışı	57
Şekil 4.1 Zamana bağlı Glutamat besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in büyüme eğrisi (n=3).....	58
Şekil 4.2 Zamana bağlı N ₂ besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in büyüme eğrisi (n=3).....	59
Şekil 4.3 Zamana bağlı NH ₄ besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in büyüme eğrisi (n=3).....	59

Şekil 4.4 Zamana bağlı Glutamat besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in pH değerleri (n=3)	60
Şekil 4.5 Zamana bağlı N ₂ besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in pH değerleri (n=3)	61
Şekil 4.6 Zamana bağlı NH ₄ besiyerinde büyütülen <i>Cereibacter sphaeroides</i> 'in pH değerleri (n=3)	61
Şekil 4.7 DNA izolasyon sonrası agaroz jel görüntüsü	62
Şekil 4.8 <i>nifH</i> PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	63
Şekil 4.9 16s rRNA PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	63
Şekil 4.10 N ₂ besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	65
Şekil 4.11 NH ₄ ve Glutamat besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü	65
Şekil 4.12 Ham ve normalize edilmiş verilerdeki tüm transkriptlerin TPM (Transcripts per million) dağılımları	67
Şekil 4.13 Örneklerin PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki dağılımları.....	68
Şekil 4.14 Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren 50 genin ekspresyon profili	70
Şekil 4.15 <i>Paenibacillus polymyxa</i> WLY78'in <i>nif</i> genlerinin genomik konumu ve Fe-S kümesinin oluşumunda rol alan genler	73
Şekil 4.16 <i>A. evenia</i> bitkilerinin büyüme karşılaştırması	75
Şekil 4.17 Diazotrofik büyüme altında <i>Rhodobacter capsulatus</i> 'un N ₂ fiksasyon proteinlerinin up regülasyonu	76
Şekil 4.18 Üre hidrolizi	78
Şekil 4.19 Ribozomal proteinlerin sentez ve modifikasyonundan sorumlu genlerin operon dizisi.....	82
Şekil 4.20 <i>carB</i> geninin döngüsü.....	84
Şekil 4.21 <i>nif</i> genlerinin operon dizisi.....	86
Şekil 4.22 Karşılaştırma 1 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi	87
Şekil 4.23 Karşılaştırma 2 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi	88
Şekil 4.24 Karşılaştırma 3 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi	89
Şekil 4.25 Karşılaştırma 1 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları	91
Şekil 4.26 Karşılaştırma 2 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları	93
Şekil 4.27 Karşılaştırma 3 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları	95
Şekil 4.28 N ₂ ve Glutamat koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması	97
Şekil 4.29 NH ₄ ve Glutamat koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması	98
Şekil 4.30 N ₂ ve NH ₄ koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması	98

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Angström
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
δ	Delta
μg	Mikro gram

Kısaltmalar

ADP	Adenozin Difosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
cDNA	Komplementer DNA
CO ₂	Karbondioksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DTT	Dithiothreitol
Fe	Demir
Mo	Molibden
mRNA	Mesajcı RNA
N ₂	Nitrojen
NH ₃	Amonyak
nifH	Mo- nitroenez geni
NO ₃ ⁻	Nitrat
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNA-Seq	RNA Dizileme
RPKM	Transkriptin kilobazı başına milyon eşleşen okuma sayısı
rRNA	Ribozomal RNA
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCA	Temel bileşen analizi
S	Kükürt
TPM	Milyon başına transkript sayısı
V	Vanadyum

1. GİRİŞ

Cereibacter sphaeroides katı gıda atığı ve gıda işleme atık sularından elde edilen biyohidrojen üretebilen alfa-proteobakterilerin α -3 mor kükürtsüz bakteriler grubunda yer alan gram negatif bir öbakteridir (Jeong vd., 2020; Leidenfrost vd., 2020). *C. sphaeroides*, çeşitli organik bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Metabolik olarak çeşitli çevre koşullarında büyüeyebilen mor kükürtsüz bakterilere bir örnektir (Yu vd., 2023). Ayrıca *C. sphaeroides* çevreden gelen çoğu strese de cevap vermektedir. Bu sayede strese karşı oluşturulan transkriptom tepkileri ve büyüme evresindeki transkriptom karşılaştırılmasına olanak sağlar (Bathke vd., 2019).

C. sphaeroides'in anaerobik çoğalabilmesi için besiyeri ortam pH'nın 6.8-9 aralığında ve sıcaklığın 29-30°C'de olması gerekir. *C. sphaeroides* gibi anaerobik veya aerobik ortamlarda büyüeyebilen bakteriler yapılarında bulunan pigmentlere göre ortamlarda farklı renkte görünürler. *C. sphaeroides*'in anaerobik kültürleri kahverengi renktedir ve açık kirli yeşilimsi yeşilden koyu kahverengiye değişen tonlarda görülür. Oksijen varlığında büyüdüğünde ise organizmalar pembe-kırmızı bir renkte görünürler. Mor kükürtsüz bakteri grubundaki (Purple non-sulfur, PNS) bu bakteri türleri farklı karbon ve nitrojen kaynakları kullanabilir (Basak & Das, 2009).

Azot (N), amino asitlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin bir bileşeni olan ve tüm canlı organizmalar için önemli bir elementtir. Bununla beraber inert N₂'yi çoğu canlı organizma doğrudan metabolize edemez (Ribbe vd., 2022). Bunun yerine çoğu organizma, N₂'yi amonyak (NH₃) veya nitrat (NO₃⁻) gibi sabit formlardan elde etmelidir. N₂'nin NH₃'e dönüştürülmesi N₂ fiksasyonu olarak bilinmektedir ve biyojeokimyasal N döngüsü için önemli bir basamaktır (Hoffman vd., 2014). Azot fiksasyonu sırasında nitrojenaz, katalitik bir protein ve dinitrojen fiksasyonu için gerekli elektronları sağlayan elektron transfer eden bir redüktaz proteini içeren karmaşık bir oksidoredüktaz enzim olarak görev almaktadır (Milton & Minteer, 2019). Şu an tanımlanan üç tip nitrojenaz (*nif*, *vnf*, *anf*) olduğu bilinmektedir. Bunlar molibden (Mo), vanadyum (V) ve sadece demir (Fe) içeren nitrojenazlardır. En çok bulunan ise Mo-nitrojenaz enzimidir. Mo-nitrojenaz, *nifHDK* genleri tarafından kodlanır ve diazotroflarda yaygın olarak bulunur (Kars vd., 2006; Ribbe vd., 2022).

Mor bakterilerde fotosentez (PS) düzenlemesinin moleküler mekanizmalarına açıklık getirilmiştir. (i) RegB/RegA (PrrB/PrrA) iki bileşenli düzenleyici sistem, (ii) aerobik baskılayıcı PpsR ve (iii) anaerobik aktivatör FnrL sistemi olmak üzere 3 önemli

düzenleyici sistemi keşfetmişler ve karakterize etmişlerdir. PpsR proteinleri PS düzenlemesinde önemli rol oynarken küresel düzenleyici proteinler olan RegB/RegA ve FnrL sistemleri daha geri planda kalmaktadır (Elsen vd., 2005). RegB-RegA (PrrB/PrrA) iki bileşenli düzenleyici sistem, *C. sphaeroides* ve *Rhodobacter capsulatus* da karbon fiksasyonu, nitrojen fiksasyonu, hidrojen kullanımı, fotosentez, denitrifikasyon, elektron taşınması, anaerobik solunum gibi enerji üreten ve kullanan işlemlerde yer alan genleri regüle etmektedir (Bauer & Wu, 2008).

RNA-seq, transkriptlerin genom çapında ölçülmesinin yanı sıra tek nükleotid çözünürlüğü sayesinde transkriptlerin doğru şekilde haritalanmasına imkan verir. RNA-seq, haritalanmış okumaları farklı örneklerle kıyaslayarak gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan güçlü bir yöntemdir. Bu sayede çevresel kaynaklı değişikliklere yanıt olarak ya da incelenmekte olan genin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklere yanıt olarak farklı şekilde eksprese olan genlerin tanımlanmasını sağlar (Broglia vd., 2023). RNA-Seq araştırmalarında yapılan ilk adım dizilerin kalitesini kontrol etmektir. RNA seq dizilerinin kalitesi FASTQC programı kullanılarak kontrol edilir. İyileştirilmiş ve kaliteli okumalar elde edildiğinde veri analizi ile yapılacak ilk işlem transkripsiyon ve transkriptom yapısını ortaya çıkarıp kısa RNA-Seq okumaları atamaktır (Jazayeri vd., 2015).

Bu çalışma kapsamında üç farklı azot kaynağı içeren besiyerinde (glutamat, N₂ ve NH₄) çoğaltılan *C. sphaeroides* O.U. 001'in RNA-Seq tabanlı transkriptomik analizi ve transkriptomik analizi destekleyecek nitelikte qPCR analizi yapılmıştır. Protein kodlayan her bir genin üç farklı koşuldaki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Tez çalışmasının hipotezi “Besiyeri ortamına N₂ gazı verildiğinde bakteriler azot fiksasyonu yapacağı için nitrojenaz fiksasyonunda görev alan genlerin transkripsiyon seviyelerinde değişimler olacaktır ve böylece bakteride azot fiksasyonunda görev alan genler tanımlanabilecektir” şeklinde oluşturulmuştur. Çalışma sonunda nitrojenaz enziminin regülasyonu ve nitrojenaz enzim metabolizmasında görev alan genler ortaya çıkarılmış olunacaktır. Azot kaynağı olarak NH₄⁺’ün bulunduğu koşullarda ise, hücre azotlu bileşiğin varlığını algılayarak nitrojenaz gen ekspresyonunu baskılar ve böylece NH₄⁺’ün nitrojenaz enzimi üzerindeki negatif transkripsiyonel regülasyonu ortaya konmuş olur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Cereibacter sphaeroides* (*Rhodobacter sphaeroides*) O.U.001

Rhodobacter sphaeroides'in güncel adı *Cereibacter sphaeroides* olarak önerilir ve NCBI veritabanında bu cins adı ile de yer alır (H. Wang vd., 2021). *C. sphaeroides* katı gıda atığı ve gıda işleme atık sularından elde edilen biyohidrojen üretebilen filogenetik olarak alfaproteobakterilerin α -3 mor kükürtsüz bakteriler grubun da yer alan gram negatif bir öbakteridir (Jeong vd., 2020; Leidenfrost vd., 2020). *C. sphaeroides*'in genomu iki kromozom, kromozom I (CI; ~3.2 Mb) ve kromozom II (CII; ~0.9 Mb) ve beş endojen plazmitten oluşmaktadır (Peters vd., 2012). Tablo 2.1'de *C. sphaeroides*'in sistematik olarak sınıflandırılması gösterilmiştir.

Tablo 2.1 *Cereibacter sphaeroides*'in sınıflandırılması

Alem	<i>Bacteria</i>
Şube	<i>Pseudomonadota</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Rhodobacterales</i>
Aile	<i>Paracoccaceae</i>
Cins	<i>Cereibacter</i>
Tür	<i>Cereibacter sphaeroides</i>

C. sphaeroides, çeşitli organik bileşikleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilmektedir. Metabolik olarak çeşitli çevre koşullarında büyüeyebilen mor kükürtsüz bakterilere bir örnektir (Yu vd., 2023).

Bazı mor kükürtsüz bakteriler anaerobik, aerobik veya fermantatif şekilde büyüeyebilmektedir. Bazı bakteriler anaerobik solunum metabolizmasını kullanarak karanlık ortamda büyüeyebilirken bazı bakteriler ise karanlıkta aerobik şekilde büyüeyebilmektedir. Mor kükürtsüz bakterilerden biri olan *C. sphaeroides*, CO₂'yi indirgemek için sülfidi elektron donörü olarak mor kükürt bakterileri kadar verimli kullanamaz. Bunun nedeni, mor kükürtsüz bakterilerin sülfür bileşiklerini oksitleme kapasitelerinin daha sınırlı olmasıdır. (Dubbs & Tabita, 2004). *C. sphaeroides*'in tüm doğal suşları, en az bir endojen plazmit içerir ve bazı suşların boyutları 42-140 kb arasında değişir (Suwantot & Kaplan, 1992)(Peters vd., 2012).

Hareketli bakteriler ortamın alkali hale gelmesiyle ve yaşla birlikte hareketliliklerini kaybederler. Çubuk şeklinde bulunan *C. sphaeroides* aerobik

büyümeden sonra fotoheterotrofik büyümeye geçtiği zaman çubuk şeklinden kokobasile dönüşmektedir. Hücrelerin boyutları da değişkendir; çapları 0.5 ila 1.5 μm arasındadır. *C. sphaeroides*'in elektron mikroskobu görüntüsü Şekil 2.1.'de gösterilmektedir (Niel, 1944).

Anaerobik koşullar altında solunum, fermantasyon ve fotosentez ile büyüebilir. Fotosentez iki şekilde gerçekleşebilir hem karbon hem de indirgeyici kaynak olarak organik bileşikleri kullanılarak ya da tek karbon kaynağı kullanarak karbondioksit ve indirgeme kaynağı olarak da hidrojen kullanılarak fotoototrofik olabilir (Mackenzie vd., 2001). *C. sphaeroides*, hidrojen üretimi ve terpen biyosentez analizi için kullanılır ve uyumlu metabolizmaya sahip olduğu için endüstriyel uygulamalarda çok yönlü görev alan bir bakteridir. (Mougiakos vd., 2019; Orsi vd., 2021). Ayrıca *C. sphaeroides* çevreden gelen çoğu strese de cevap oluşturabilmektedir. Bu sayede strese karşı oluşturulan transkriptom tepkileri ve büyüme evresindeki transkriptom karşılaştırılmasına olanak sağlar (Bathke vd., 2019).



Şekil 2.1 *Cereibacter sphaeroides* (Seifert vd., 2012)

Genellikle göllerde ve durgun su kütlelerinde bulunan kükürtsüz mor (PNS) fotosentetik bakterilerin katma değerli ürün üretme yeteneği vardır; örneğin, 5-aminolevulinik asit (5-ALA), hidrojen, B12 vitamini, koenzim Q10, poli- β -hidroksibutirat (PHB) ve karotenoidler bunlara örnektir (Camarena & Dreyfus, 2020; Kars & Alparslan, 2014).

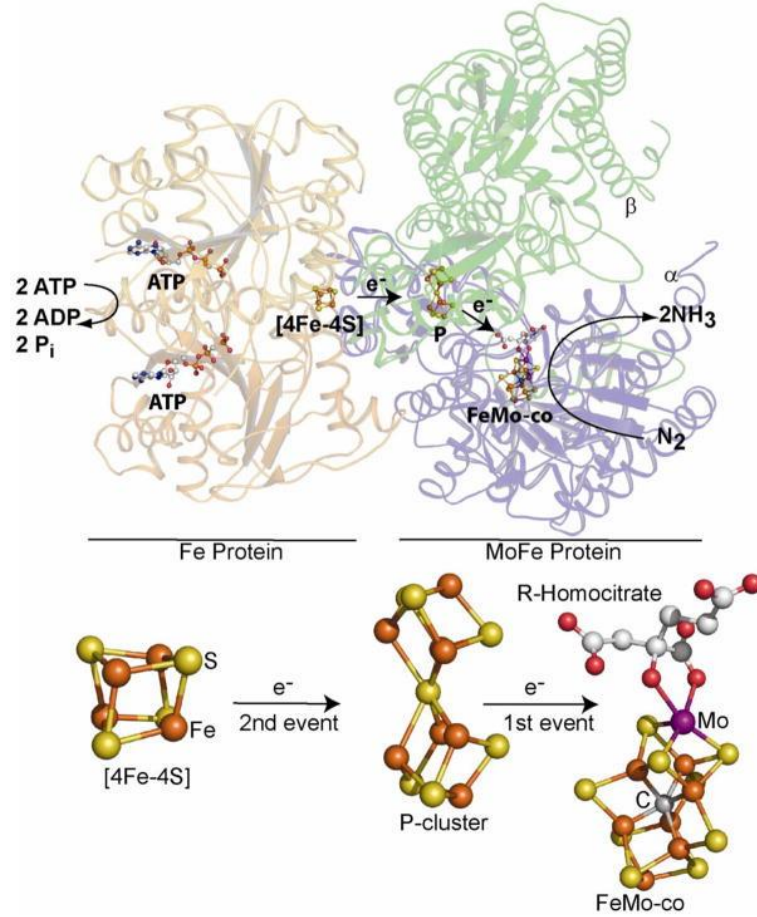
C. sphaeroides'in anaerobik şekilde çoğalabilmesi için sıcaklığın 29-30 °C, besiyeri pH'nın ise yaklaşık 6.8-9 aralığında olması gerekir. *C. sphaeroides* gibi anaerobik veya aerobik ortamlarda büyüeyebilen bakteriler yapılarında bulunan pigmentlere göre ortamlarda farklı renkte görünürler. *C. sphaeroides*'in anaerobik kültürleri kahverengi renktedir ve açık kirli yeşilimsi yeşilden koyu kahverengiye değişen tonlarda görülür. Oksijen varlığında büyüdüğünde ise organizmalar pembe-kırmızı bir renkte görünürler. Bu bakteri türleri farklı karbon ve nitrojen kaynakları kullanabilir (Basak & Das, 2009).

Çeşitli substrat kullanma kabiliyeti sayesinde geniş bir metabolik aralığına sahip prokaryotlar arasında bulunmaktadır ve diğer bir avantajları ise ortamda nitrojen kaynakları eksildiği zaman N₂ fiksasyonu yapabiliyor olmalarıdır (Kars & Alparslan, 2013; Niel, 1944; Porter vd., 2011). *C. sphaeroides* anaerobik ortam koşullarında organik asitlerden nitrojenaz-hidrojenaz enzim sistemini kullanarak hidrojen üretebilen tanımlanmış en iyi mor kükürtsüz bakterilerden birisidir (Genç, N., 2009).

2.2. Nitrojenaz Enzim Sistemleri

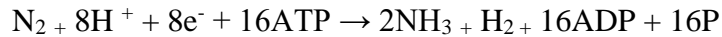
Azot (N), amino asitlerin, nükleik asitlerin ve diğer biyomoleküllerin bir bileşeni olan ve tüm canlı organizmalar için önemli bir elementtir. Atmosferin %78'ini oluşturan azot (dinitrojen, N₂) gazı, atmosferde en çok bulunan nitrojen kaynağıdır. Bununla beraber inert N₂'yi çoğu canlı organizma doğrudan metabolize edemez (Ribbe vd., 2022). Bunun yerine çoğu organizma, N₂'yi amonyak (NH₃) veya nitrat (NO₃⁻) gibi "sabit" formlardan elde etmelidir. N₂'nin NH₃'e dönüştürülmesi N₂ fiksasyonu olarak bilinmektedir ve biyojeokimyasal N döngüsü için önemli bir basamaktır (Hoffman vd., 2014).

Nitrojenaz, katalitik bir protein ve dinitrojen fiksasyonu için gerekli elektronları sağlayan elektron transfer eden bir redüktaz proteini içeren karmaşık bir oksidoredüktaz enzimatik sistemidir (Milton & Minter, 2019). Bu işlem bir [4Fe-4S] kümesi, bir sekiz demir P kümesi ve FeMo-kofaktörü, substrat indirgeme bölgesi dahil olmak üzere üç redoks aktif metal içeren kofaktörü içerir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Nitrojenaz proteinleri ve kofaktörleri. Fe proteini (sol) ve MoFe proteininin bir $\alpha\delta$ -birimi (sağ) ile birlikte iki ATP molekülü, Fe proteininin [4Fe-4S] kümesi ve MoFe proteininin P kümesi ve FeMo-kofaktörü gösterilmektedir (Seefeldt vd., 2012)

Nitrojenazlar hem arkelerde hem de bakterilerde bulunur (Xuan vd., 2023). Diazotroflar olarak adlandırılan mikroorganizmalarda bulunan nitrojenazın en önemli işlevi ise ATP'leri kullanarak mikroorganizmaların doğrudan erişemediği atmosferik dinitrojenin (N₂) biyolojik açıdan erişilebilir amonyağa (NH₃) indirgenmesini katalize etmektir. İndirmek için ATP'lerden hariç Fe-S kümelerini de kullanır. Genel reaksiyon formülü aşağıdaki gibidir.

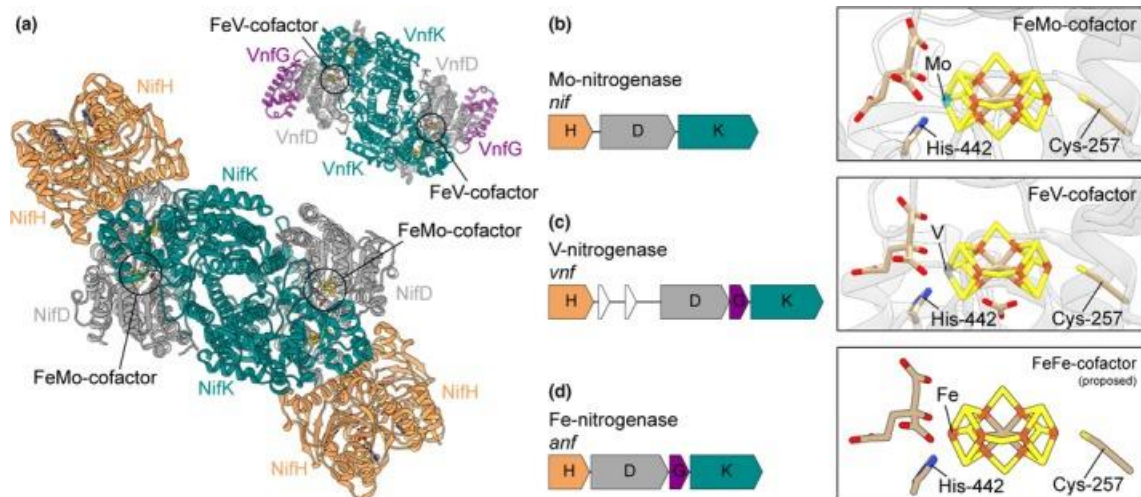


Şu an tanımlanan üç tip nitrojenaz (*nif*, *vnf*, *anf*) olduğu bilinmektedir. Bunlar molibden (Mo), vanadyum (V) ve sadece demir (Fe) içeren nitrojenazlardır. Mikroorganizmaların çoğu yalnızca Mo-nitrojenaz enzimini kodlar iken bazı N₂ sabitleyici mikroorganizmalar ise Mo-nitrojenaz enzimi ile birlikte V-nitrojenaz ve

Fe-nitrojenaz kodlamaktadır. *Methanosarcina acetivorans*, *Azotobacter vinelandii* ve *Rhodospseudomonas palustris* gibi türler ise üç nitrojenazın hepsini kodlar. *C. sphaeroides* sadece Mo- nitrojenazı kodlarken *Anabaena* türleri ise Mo- ve V- nitrojenazları kodlar (Xuan vd., 2023).

Mo- nitrojenaz, *Azotobacter vinelandii*'den izole edilen iki alt birimden oluşan ve bir ATP arasında bir $[Fe_4S_4]$ kümesi ve bir γ -dimer olan Fe proteininden (veya *NifH*) oluşur. Mo-nitrojenaz, *nifHDK* genleri tarafından kodlanır ve diazotroflarda yaygın olarak bulunur (Kars vd., 2006; Ribbe vd., 2022).

Mo-, V- ve Fe-nitrojenaz kodlayan genlerin ifadesinden sorumlu olan ana düzenleyici genler *nifA*, *vnfA* ve *anfA*'dır. Mo varlığında, *nifA* transkripsiyon aktivatörü, *nif* kodlayan genleri eksprese ederken *vnfA* ve *anfA*'nın ikisinin de transkripsiyonel ifadesi baskılanır. Mo'nun yokluğunda ve V'nin varlığında, *vnfA* ifade edilir fakat *nif*- ve *anf*-kodlayan nitrojenaz genlerini baskılanır. Hem Mo hem de V'nin yokluğunda *anfA* geni, Fe-nitrojenaz sentezini aktive eder. Mo-, V- ve Fe-nitrojenaz kodlayan genlerin ifadesinden sorumlu ana düzenleyici genler olan *nif*, *vnf* ve *anf* operonlarından ilgili gen ürünlerinin fonksiyonu Tablo 2.2'de verilmiştir (Jasniewski vd., 2020). Bu üç nitrojenazın formunun yapısı ve genetik şeması ise aşağıda verilen Şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Mo-V-Fe nitrojenazın yapısı. (a) *A. vinelandii* Mo-nitrojenaz enziminin yapısal modeli (*NifHDK*) ve V-nitrojenaz FeV protein bileşeni (*VnfDVGK*), (b) *A. vinelandii* Mo-nitrojenazın, (c) V-nitrojenazın ve (d) Fe-nitrojenazın yapısını göstermektedir (Garcia vd., 2020)

Tablo 2.2 *nif*, *vnf* ve *anf* operonlarından ilgili gen ürünlerinin fonksiyonu (Jasniewski vd., 2020)

GEN	Gen ürünü etiketi	Bilinen fonksiyonu
<i>nifH</i>	<i>nifH</i> , dinitrojenaz redüktaz, bileşen 2, redüktaz bileşeni, γ alt birimi, Fe proteini	Katalitik dönüşüm sırasında ATP'ye bağlı elektron transferinin aracılık etmesi, <i>NifDK</i> üzerinde P-kümesinin oluşumunu kolaylaştırır, Mo ve R- homositratin eklenmesi yoluyla <i>NifEN</i> üzerinde L-kümesinin M-kümesine dönüşümünü kolaylaştırır.
<i>nifD,K</i>	<i>NifDK</i> , dinitrojenaz, bileşen 1, katalitik bileşen, MoFe proteini	Aktif kofaktör bölgesinde N ₂ 'nin NH ₃ 'e kimyasal dönüşümünü kolaylaştırır.
<i>nifL</i>	-	<i>nif</i> genlerinin negatif transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapar.
<i>nifA</i>	-	<i>nif</i> genlerinin pozitif transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapar.
<i>nifF</i>	<i>NifF</i> , flavodoksin	Kataliz ve/veya montaj sırasında elektronların nitrojenaza transferinde rol oynar.
<i>nifS</i>	<i>NifS</i> , sistein desülfüraz	Küçük FeS kümelerinin bir araya getirilmesi için kükürtü <i>NifU</i> 'ya aktarır.
<i>nifU</i>	<i>nifU</i>	Küçük FeS kümelerinin bir araya getirilmesi için bir iskele görevi görür ve daha sonra M ve P kümelerinin bir araya getirilmesi için kullanılabilir.
<i>nifB</i>	<i>nifB</i>	M-kümesinin Mo/homositrat içermeyen öncüsünün oluşumuyla eş zamanlı olarak karbonun radikal SAM'a bağlı eklenmesini aracılık eder.
<i>nifE,N</i>	<i>nifE,N</i>	M kümesinin olgunlaşması için bir iskele görevi görür; <i>NifDK</i> 'nin yapısal/işlevsel bir homoloğu.
<i>nifV</i>	<i>NifV</i> , homositrat sentaz	M-kümeleme montajı için R -homositrat sentezler.
<i>nifZ</i>	<i>nifZ</i>	<i>NifDK</i> 'daki P kümelerinin kademeli olgunlaşmasında, bir şaperon benzeri işlev aracılığıyla önemli bir faktör olarak hizmet eder.
<i>nifM</i>	<i>NifM</i> , peptidil-proil cis-trans izomeraz	Fe proteininin olgunlaşmasında rol oynar.
<i>nifX</i>	<i>nifX</i>	M-kümeleme montajında önerilen ara taşıyıcı.
<i>nifY</i>	<i>nifY</i>	M-kümeleme montajında önerilen ara taşıyıcı.
<i>nanY</i>	<i>nanY</i>	M-kümeleme montajında önerilen ara taşıyıcı.
<i>nifW</i>	<i>nifW</i>	Nitrojenazın oksijen hasarından korunmasında rol oynar.
<i>nifO</i>	<i>nifO</i>	İşlevi bilinmiyor, ancak tiyoredoksin benzeri.
<i>nifT</i>	<i>nifT</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>vnfH</i>	<i>VnfH</i> , dinitrojenaz redüktaz, bileşen 2, redüktaz bileşeni, γ alt birimi, Fe proteini	<i>nif</i> sistemine benzer şekilde <i>vnfDGK</i> kofaktörlerinin biyosentezine katılır ancak bu gösterilmemiştir.
<i>vnfD,G,K</i>	<i>VnfDGK</i> , dinitrojenaz, bileşen 1, katalitik bileşen, VFe proteini	Aktif kofaktör bölgesinde N ₂ 'nin NH ₃ 'e ve CO/CO ₂ 'nin hidrokarbonlara kimyasal dönüşümünü kolaylaştırır.
<i>VnfE,N</i>	<i>VnfE,N</i>	<i>nifEN</i> 'e benzer şekilde V-küme biyosentezinde katılır.
<i>vnfA</i>	-	<i>vnf</i> genlerinin pozitif transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapar , ayrıca <i>anf</i> genlerinin ifadesiyle de ilişkilidir.
<i>vnfX</i>	<i>vnfX</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>vnfY</i>	<i>vnfY</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>vnfO</i>	<i>vnfO</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>vnfU</i>	<i>vnfU</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>anfH</i>	<i>AnfH</i> , dinitrojenaz redüktaz, bileşen 2, redüktaz bileşeni, γ alt birimi, Fe proteini	Katalitik devir sırasında ATP'ye bağlı elektron transferinin aracılık eder, <i>AnfDGK</i> kofaktörlerinin biyosentezine katılabilir ancak gösterilmemiştir.

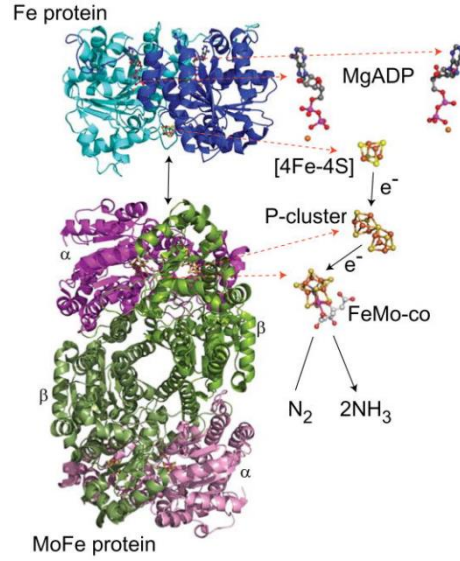
<i>anfD,G,K</i>	<i>AnfDgk</i> , dinitrojenaz, bileşen 1, katalitik bileşen FeFe proteini	Aktif kofaktör bölgesinde N ₂ 'nin NH ₃ 'e kimyasal dönüşümünü kolaylaştırır.
<i>anfA</i>	-	<i>anf</i> genlerinin pozitif transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapar.
<i>anfO</i>	<i>anfO</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>anfR</i>	<i>anfR</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.
<i>anfU</i>	<i>anfU</i>	Fonksiyonu bilinmiyor.

2.2.1. Mo-Nitrojenaz

Amonyak prokaryotlar ve bitkilerde tercih edilen bir azot kaynağıdır. Birinci tip nitrojenaz olan Mo- nitrojenaz tüm diazotrofların *nifHDK* genleri tarafından kodlanır (Einsle & Rees, 2020) ve inert dinitrojenin (N₂) amonyağa (NH₃) indirgenmesini katalizler. Enzim yalnızca N₂ fiksasyonlu (diazotrofik) bakteriler ve arkeler tarafından sentezlenir; ökaryotlar tarafından sentezlenmez (Demtröder vd., 2019).

Azotobacter vinelandii, *Klebsiella pneumoniae* ve *Clostridium pasteurianum*'dan izole edilen Mo- nitrojenaz, bu enzim ailesinin içinde en iyi karakterize edilen üyesidir (Y. Hu & Ribbe, 2015). Mo-nitrojenaz, iki aşamada sentezlenir; bunların ilki *nifH*, *nifB*, *nifN* ve *nifE* genlerini içeren FeMo-co biyosentezi, ikinci aşama ise nitrojenaz enziminin yapısal genleri olan *nifH*, *nifD* ve *nifK* tarafından oluşturulan katalitik birim (Payá-Tormo vd., 2024).

Mo-nitrojenaz enzimi Fe proteini ve MoFe proteini olarak adlandırılan iki alt birimli proteinden oluşur. Bunlar bir redüktaz bileşeni (NifH) ve katalitik bileşen (NifDK)'dır. Mo nitrojenazın bileşen proteinleri, *nifDK* genleri tarafından kodlanan $\alpha_2\beta_2$ tetramer olan MoFe proteini ve *nifH* tarafından kodlanan bir γ_2 dimer olan bir Fe proteindir. *nifH* tarafından kodlanan Fe proteini bir homodimeridir ve ~ 60 kDa'dır. Fe proteini, her alt birim üzerinde bir tane olmak üzere iki ATP bağlama bölgesine ve iki özdeş alt birimi köprüleyen tek bir Fe₄-S₄ kümesine sahip homodimerik bir proteindir (Seefeldt vd., 2013). Tüm kaynaklardan izole edilen MoFe proteinleri ~ 220 kDa'lık bir $\alpha_2\beta_2$ - tetrameridir ve α - ve β -alt birimleri sırasıyla *nifD* ve *nifK* tarafından kodlanır. Şekil 2.4'te Mo-nitrojenaz yapısı gösterilmektedir (Eady, 1991; Hu & Ribbe, 2013, 2015).



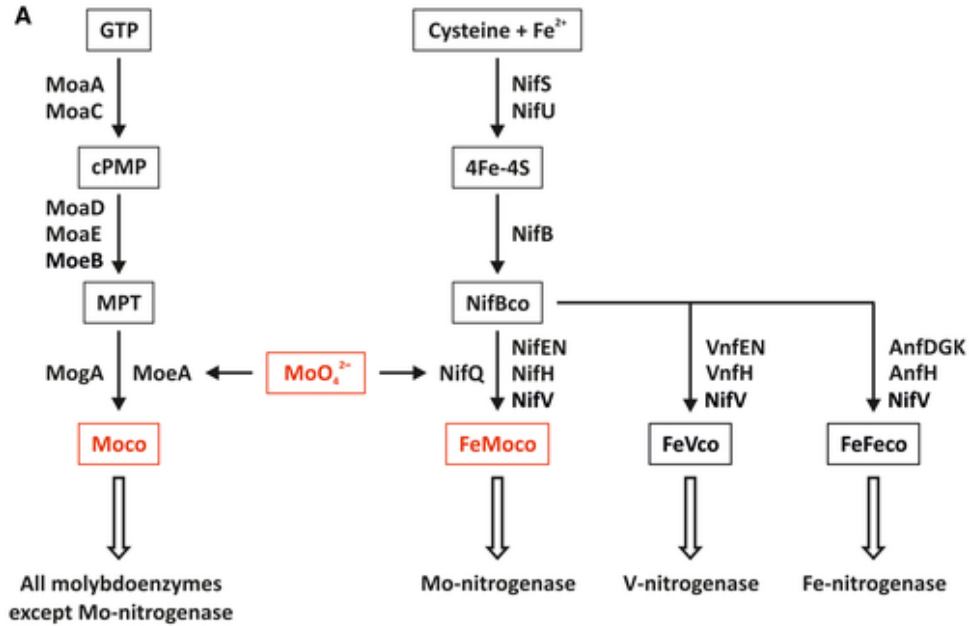
Şekil 2.4 Molibden nitrojenaz enzim yapısı (Seefeldt vd., 2009)

MoFe proteininde koordineli olarak FeMo kofaktörü ve P-kümesi olarak adlandırılan iki metal kümenin her birinin iki kopyası vardır. İşlevsel olarak FeMo kofaktörü, substrat indirgeme bölgesini temsil ederken P-kümesi Fe proteininden gelen elektronların ilk alıcısı olarak hizmet eder (Einsle & Rees, 2020).

Fe-protein, N₂ indirgenmesinin gerçekleştiği MoFe-proteine zorunlu elektron vericisi olarak hizmet eder. Fe-protein elektronları birer birer iletir ve her Fe-protein döngüsü iki MgATP molekülü tüketir. Diğer tüm molibdoenzimlerin aksine, Mo-nitrojenaz benzersiz demir-molibden kofaktörü FeMoco'yu içerir. FeMoco'nun biyosentezi NifS, NifU, NifB, NifE, NifN, NifQ, NifV ve NifH proteinlerinin aktivitesini içerir. İlk adımda, sistein desülfüraz *NifS* ve iskele proteini NifU, S-adenozil-metionin bağımlı protein NifB'ye aktarılan (4Fe-4S) kümeleri üretir. İkinci adımda, NifB, iskele proteini NifEN'e aktarılan bir (8Fe-9S-C) öncüsü oluşturur. Burada, öncü Mo donörü NifQ, homositrat sentaz NifV ve nitrojenaz redüktaz NifH'yi içeren FeMoco'ya son olarak apo-nitrojenaz NifDK eklenir (Demtröder vd., 2019).

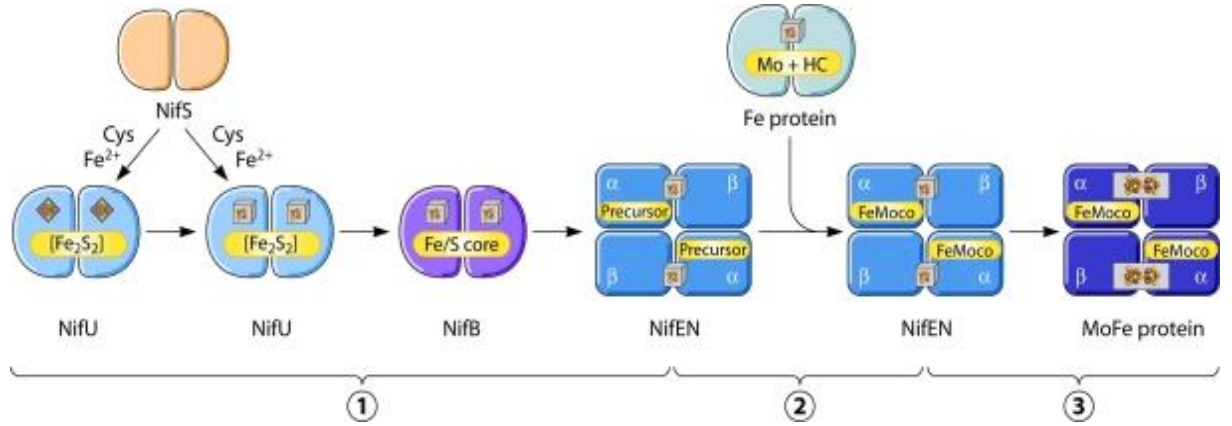
Molibden kofaktörleri Moco ve FeMoco'nun biyosentezi GTP'den (guanozin trifosfat) başlayan Moco biyosentezi, ara maddeler cPMP (siklik piranopterin monofosfat) ve MPT (molibdopterin) üzerinden ilerler. MogA aracılı MPT adenilizasyonundan sonra, Mo, MoeA tarafından eklenir ve böylece Moco oluşumu tamamlanır. Mo-nitrojenaz hariç tüm molibdoenzimler Moco veya bir Moco türevi içerir. FeMoco biyosentezi, FeMoco, FeVco ve FeFeco'nun (8Fe-9S-C) öncüsü olan NifBco'nun NifB aracılı sentezi için temel modüller olarak görev yapan (4Fe-4S) kümelerinin

oluşumuyla başlar. FeMoco montajı için Mo mobilizasyonu NifQ tarafından aracılık edilir. VFeco ve FeFeco yapısal olarak FeMoco'ya benzer ancak birkaç yönden farklıdır. Molibden yerine, VFeco ve FeFeco sırasıyla vanadyum veya demir içerir. Ayrıca, VFeco'da FeMoco'ya kıyasla bir sülfür iyonu yoktur (Demtröder vd., 2019).



Şekil 2.5 Moco, FeMoco, FeVco ve FeFeco biyosentezi (Demtröder vd., 2019)

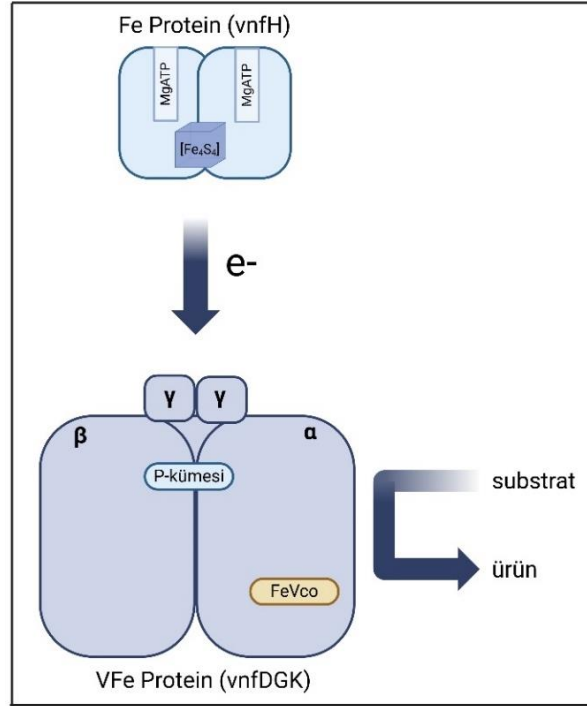
FeMoco'nun biyosentezi hedef MoFe proteininin polipeptitlerinin üretiminden bağımsız olarak gerçekleşir. Bu sentez sırasında *nifS*, *nifU*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV* ve *nifH* gen ürünlerinin katılımı gereklidir. Bu sentezde Fe ve S akışı, NifU ve NifS'den başlar ve sırayla NifB yapısı ardından da NifEN sonrası MoFe protein yapısı oluşumu ile bu sentez devam eder. Bu sentez akışı sırasında NifB'nin yapısında bulunacak Fe/S çekirdek yapısı ([Fe₂S₂] ve [Fe₄S₄]) üretilmiş olur. FeMoco biyosentezi için önemli olan ve katalitik elektron donörü olarak rol alan Fe proteini *nifH* tarafından kodlanır. NifB, Fe/S çekirdek yapısı ile birleşir ve bu birleşim sayesinde yeni oluşan FeMoco NifEN üzerinde dönüşüm için molibden (Mo)- ve homositrat (HC) içermeyen bir öncüye işlenir ve olgunlaşmasını tamamlar. Bu birleşim sonucu FeMoco, NifEN'den MoFe proteinine aktarılır. MoFe proteini ise hedeflenen bağlanma bölgesine bağlanır. Şekil 2.6'da FeMoco'nun biyosentezi gösterilmiştir (Y. Hu & Ribbe, 2011).



Şekil 2.6 FeMoco'nun biyosentezi (Hu & Ribbe, 2011)

2.2.2. V-Nitrojenaz

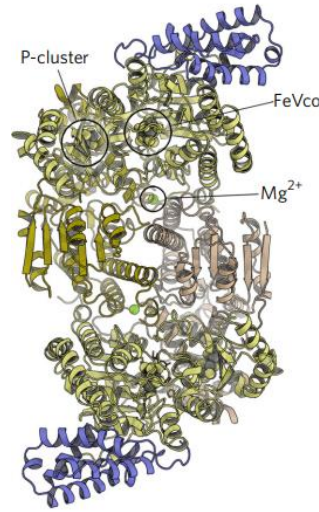
İkinci tip nitrojenaz olan V-nitrojenaz, *Azotobacter chroococcum* ve *Azotobacter vinelandii*'den izole edilmiştir. Enzimin katalitik alt biriminde molibden yerine vanadyum bulunur. Enzim Mo-nitrojenaza benzer fakat V nitrojenazda Fe proteini ve vanadyum-demir (VFe) proteininden oluşan iki bileşenli bir enzim sistemi vardır. Vanadyum nitrojenaz için *vnf* gen kümesi ayrı bir Fe proteini (*VnfH*) ve *vnfG* geni tarafından kodlanan ek bir alt birim içeren bir katalitik VFe proteini içerir (Şekil 2.7) (Sippel & Einsle, 2017). *nifH* veya *vnfH* kodlu Fe-protein katalitik bileşene yani *nifDK* kodlu MoFe-protein veya *vnfDGK* kodlu VFe-protein ATP'ye bağımlı elektron transferini içeren bir katalitik mekanizma kullanır (Lee vd., 2010).



Şekil 2.7 V-nitrogenazın katalitik ünitesinin şematik gösterimi (Y. Hu vd., 2011). Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/v15k887>

Küçük alt birim, γ_2 -dimerik Fe proteini oluşturmak üzere *vnfH* tarafından kodlanır. *vnfDGK* tarafından kodlanan $\alpha_2\beta_2\delta_2$ -heksamerik VFe proteini büyük alt birimi oluşturur. VFe proteini Fe proteini ile kompleks oluşturarak bütün enzimi oluşturur. Kompleks oluşumunda elektronlar P kümesi üzerinden öncelikle [Fe₄S₄] kümesinden FeVco'ya aktarılır ve substrat indirgenmesi oluşmaktadır. (Y. Hu vd., 2011).

Optimal olarak, *A. chroococcum*'den saflaştırılan VFe proteini, bir $\alpha_2\beta_2\delta_2$ -heksamerik bileşim ile tutarlı olan ~240 kDa'lık bir moleküler ağırlığa sahiptir. Fakat *A. vinelandii*'den saflaştırılan $\alpha_2\beta_2\delta_4$ -oktamerik halde bulunan VFe proteini ~ 270 kDa olarak hesaplanmıştır (Y. Hu vd., 2012; Y. Hu & Ribbe, 2015). VFe proteinleri, 250 000 Da'lık heksamerik yapı ($\alpha_2\beta_2\delta_2$) oluşturan MoFe proteininde bulunmayan ekstra δ alt birimine sahip olmalarından dolayı MoFe proteinlerinden farklılık göstermektedir. Enzim *vnfHDGK* genleri tarafından kodlanmaktadır (Eady, 1996). Şekil 2.8'de Vanadyum-nitrogenaz enzim yapısı gösterilmektedir.



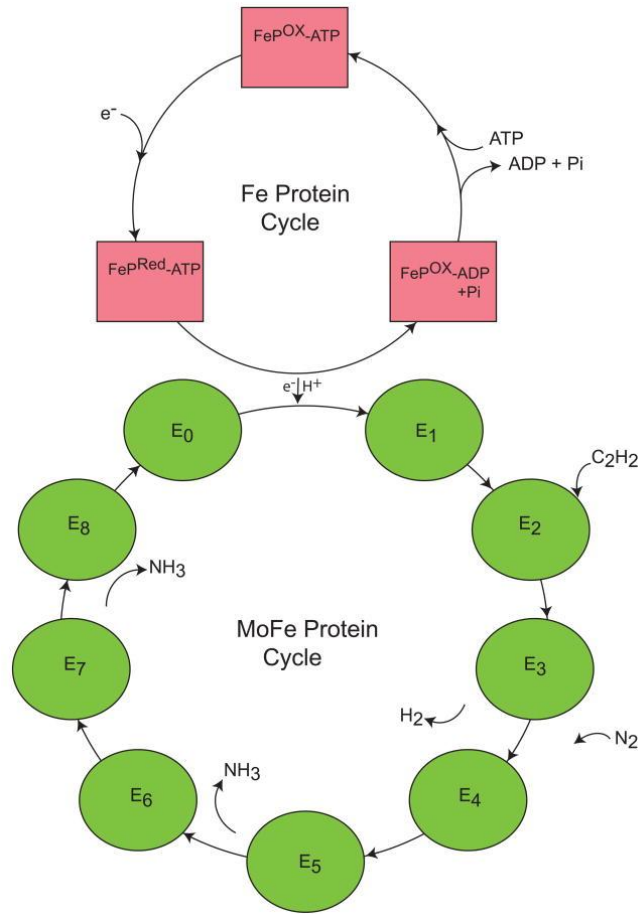
Şekil 2.8 Vanadyum nitrojenaz enzim yapısı (Sippel & Einsle, 2017)

2.2.3. Fe-Nitrojenaz

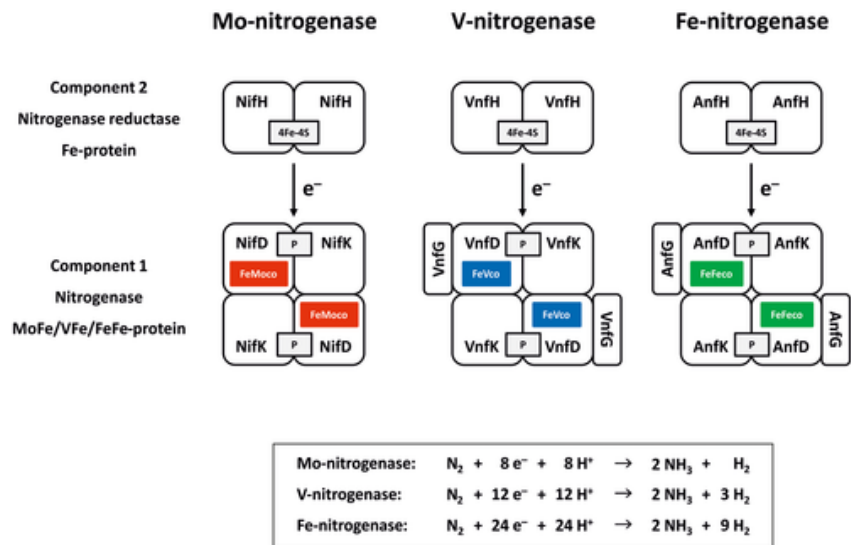
Üçüncü tip nitrojenaz olan Fe-nitrojenaz *A. vinelandii*, *Rhodospirillum rubrum* ve *Rhodobacter capsulatus*'tan izole edilmiştir. Enzim Mo- ve V- enzimleri gibi Fe proteini ve demir-demir (FeFe) içeren iki bileşenli alt birimlerden oluşmaktadır. Yalnızca Fe içeren nitrojenazın FeFe proteini, Mo- veya V- nitrojenazın MoFe veya VFe proteinine benzerlik göstermektedir. Fe ve MoFe protein katalitik döngüleri üstte Fe proteini için 3 durumlu döngü ve altta MoFe proteini için 8 durumlu bir döngü gösterilmektedir (Şekil 2.9). Fe proteini için, 2+ oksitlenmiş durumda (Ox) ya da [4Fe-4S] kümesi +1 indirgenmiş durumda bulunabilir. Fe proteini ya iki Pi'li iki MgADP'ye (ADP+Pi) ya da iki MgATP molekülüne (ATP) sahiptir. Döngünün en altında bulunan MoFe proteiniyle birleşmesiyle bir elektron değişimi meydana gelir. Bu döngüde MoFe proteinin art arda indirgenmesi E_n ile ifade edilir. Burada bulunan n değeri Fe proteini tarafından indirgenen elektron sayısını gösterir. Asetilen (C_2H_2), E_2 'ye bağlanırken N_2 , E_3 ve E_4 'e bağlanır ve N_2 bağlanmasından sonra H_2 yer değiştirir. Döngünün devamında 2 tane NH_3 (amonyak)'ın sırasıyla E durumlarından ayrıldığı gösterilmektedir (Şekil 2.9) (Seefeldt vd., 2009).

Mo-, V- ve Fe-nitrojenazların şematik diyagramları ve aktiviteleri ise Şekil 2.10'da gösterilmiştir. FeFe proteini de sırasıyla *anfD*, *anfK* ve *anfG* tarafından kodlanan α -, β - ve δ -alt birimlerinden oluşur ve $\alpha_2\beta_2\delta_2$ -heksamerik alt birim bileşimine sahiptir. α -, β ve δ alt birimleri sırasıyla 61, 58 ve 15 kDa değerlerine sahiptir (Y. Hu & Ribbe, 2015; López-Torrejón vd., 2021). Dinitrojenaz redüktazın, alt birimleri *anfH* tarafından kodlanırken, dinitrojenazın α - ve β -alt birimleri sırasıyla *anfD* ve *anfK* tarafından

kodlanır. Fe-nitrojenaz enzimi *anfHDGK* tarafından kodlanır (Yang vd., 2014) (Y. Hu vd., 2011).



Şekil 2.9 Fe ve MoFe protein katalitik döngüleri (Seefeldt vd., 2009)



Şekil 2.10 Mo-, V- ve Fe-nitrojenazların şematik diyagramları ve aktiviteleri (Demtröder vd., 2019)

2.3. *Cereibacter sphaeroides* ile N₂ Fiksasyonu ve Gen Kontrol Mekanizması

Azot, yaşamın gereksinimleri için ihtiyaç duyulan ve çoğu biyomolekülde de bulunan temel elementlerden biridir. Azot, atmosferde dinitrojen (N₂) gazı şeklinde bulunmaktadır. Fakat çoğu organizma N₂'yi metabolize edemez. Bunun yerine organizmalar, nitrojen fiksasyonunu kullanır (Hoffman vd., 2014). Nitrojen fiksasyonu, arke ve bakteride bulunan molibden bağımlı nitrojenaz tarafından katalizlenir (Shi vd., 2020). Dinitrojeni amonyağa dönüştüren nitrojenaz enzimi ATP enerjisini de kullanarak azotu (N) amonyağa (NH₃) ya da nitrat (NO₃⁻) gibi formlarına indirgeyebilir. Azotun amonyak ya da nitrat gibi sabit formları çökeltelerde tutulur ve metabolizma için kullanılamaz hale getirir. Hatta sürekli N₂'ye dönüştürdükleri için nitrifikasyon ve denitrifikasyon aracılığıyla yaşamı yalnızca dinitrojenin (N₂) amonyağa (NH₃) dönüşümü ile sürdürülebilir hale getirir (Hoffman vd., 2014).

Mor kükürtsüz (PNS) ve fakültatif anoksijenik fototrof grubu mikroorganizmalar metabolik açıdan çok yönlüdür. Anoksijenik fotosentez, aerobik veya anaerobik solunum ve fermantasyon yoluyla büyüebilirler. Fotoototrofik ve kemoototrofik büyüme sırasında PNS bakterileri, CBB-Benson-Bassham (CBB) döngüsünü kullanarak CO₂ indirgeme sırasında sabitlenmiş karbon elde ederken elektron donörü olarak H₂ kullanarak büyürler. Fotosentez veya organik bileşiklerin oksidasyonu sonucu üretilen bazı indirgeyiciler, elektron taşıyıcıları aracılığıyla sisteme aktarılır. Bu elektronlar, ATP sentezi, CO₂ fiksasyonu ve N₂ fiksasyonu gibi temel biyokimyasal süreçleri destekler. İndirgeme işlemi sonrasında ise CO₂ ve N₂ fiksasyonu sayesinde elektronlar O₂, CO₂ veya N₂'ye yönlendirilir. (Dubbs & Tabita, 2004b).

Mor bakterilerde fotosentez düzenlemesinin moleküler mekanizmaları hakkında çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Elsen vd., 2005). Bu çalışmalarda (i) RegB/RegA (PrrB/PrrA) iki bileşenli düzenleyici sistem, (ii) aerobik baskılayıcı PpsR ve (iii) anaerobik aktivatör FnrL sistemi olmak üzere 3 önemli düzenleyici sistem keşfedilmiş ve karakterize edilmiştir. PpsR proteinleri fotosentez düzenlemesinde önemli rol oynarken küresel düzenleyici proteinler olan RegB/RegA ve FnrL sistemleri daha geri planda kalmaktadır (Elsen vd., 2005).

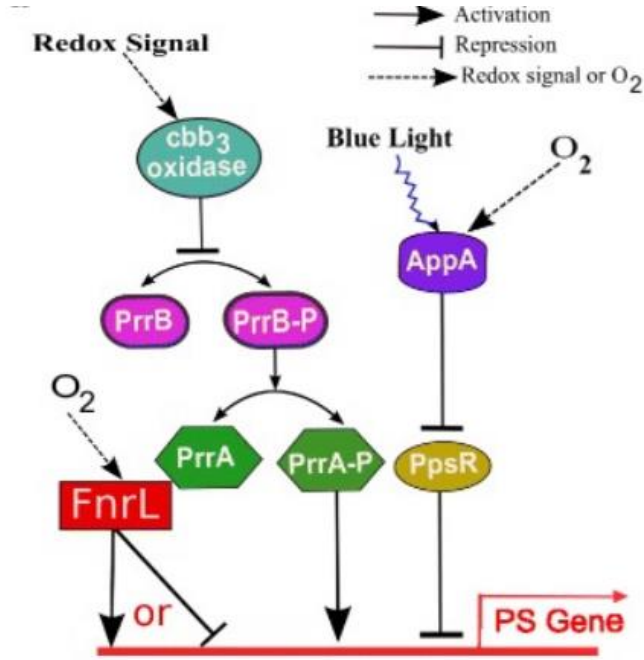
RegB-RegA (PrrB/PrrA) iki bileşenli düzenleyici sistem, *C. sphaeroides* ve *Rhodobacter capsulatus* da karbon fiksasyonu, nitrojen fiksasyonu, hidrojen kullanımı, fotosentez, denitrifikasyon, elektron taşınması, anaerobik solunum gibi enerji üreten ve

kullanan işlemlerde yer alan proteinleri kodlayan genlerin regülasyonunda görev alır (Bauer & Wu, 2008).

RegB/RegA (PrrB/PrrA) iki bileşenli düzenleyici sistem, anaerobik koşullar altında fotosentez genlerinin ifadesini aktive eden küresel düzenleyici bir sistemdir. AppA/PpsR sistemi aerobik koşullar altında fotosentez gen ifadesinin bir baskılamaktayken FnrL sistemi anaerobik koşullar altında PS gen ifadesini indüklemektedir. AppA/PpsR sistemi, AppA ve PpsR olmak üzere iki proteinden oluşmaktadır. Oksijenin yüksek seviyede seyrettiğinde fotosentez genlerinin yukarı bölgesine bağlanan PpsR bu genlerin ifadesini inhibe etmektedir. *C. sphaeroides*'te fotosentez oluşumunda gerekli proteinleri kodlayan fotosentez genlerinin baskılanması ve indüksiyonu ışık ve redoks sinyallerine de bağlıdır (Bauer & Wu, 2008).

Anaerobik koşullar altında FnrL sistemi PrrB/A ile destekli şekilde fotosentez genlerinin ifadesini aktive eder fakat aerobik koşullar altında bu ifadeyi inhibe eder. Diğer bir iki bileşenli düzenleyici sistem PrrB/A, zara bağlı histidin kinaz PrrB ve yanıt düzenleyici PrrA'dan oluşmaktadır. PrrB, anaerobik şartlarda otofosforile olur ve fosforil gruplarını PrrA'ya aktarmaktadır. Fotosentez genlerinin promotörüne fosforile olmuş PrrA bağlanır ve genleri aktive eder. PrrB'nin kinaz aktivitesi aerobik koşullar altında cbb3-oksidad üzerinden geçen elektron ile inhibe olur ve fosfataz aktivitesi artar. Fosfataz ifadesinin artmasıyla fotosentez gen ifadesinin aktivasyonu PrrA tarafından engellenmiş olur. AppA sistemi ise PpsR'nin aktivitesini iki şekilde düzenlemektedir; (1) PpsR'nin oksitlenmiş formunun indirgenmesiyle, (2) indirgenmiş PpsR ile indirgenmiş AppA'nın kompleks oluşturmasıyla (AppA-PpsR2). Bu kompleks ayrıca mavi ışık aydınlatması ile de engellenmektedir (Şekil 2.11) (Pandey vd., 2017).

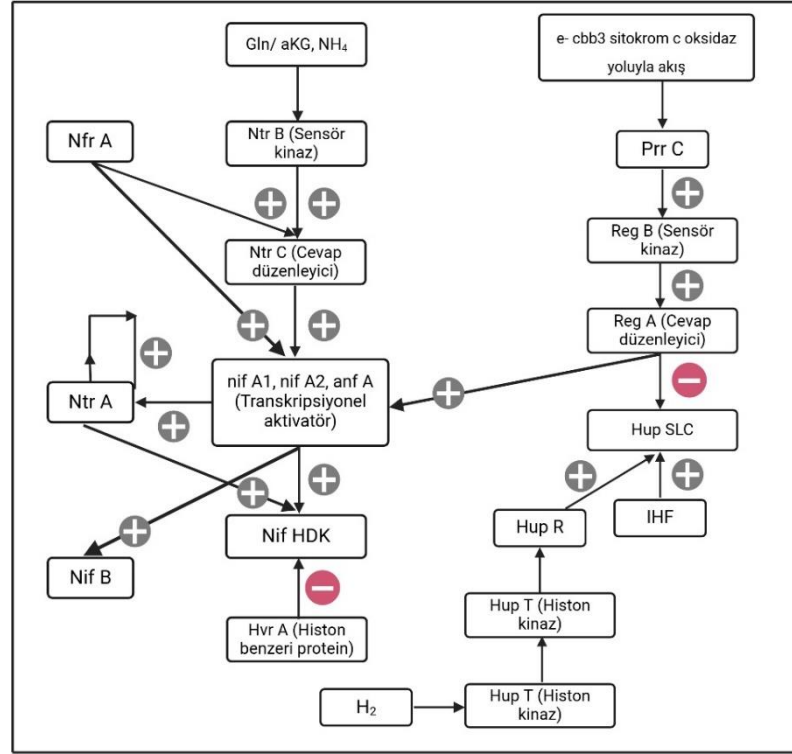
RegB-RegA (PrrB/PrrA) olarak isimlendirilen sistem PrrB/PrrA, zara bağlı histidin kinaz PrrB (RSP1520) ve yanıt düzenleyici PrrA'dan (RSP1518) oluşan iki bileşenli düzenleyici bir sistemden oluşmaktadır. *cbb3* sitokrom *c* oksidad yoluyla PrrB'nin elektron akışına dolaylı olarak katılımını sağlar. Ayrıyeten oksijen gerilimine yanıt oluşturmaktadır. RegB-RegA (PrrB/PrrA), fotosentezle birlikte aynı zamanda CO₂ fiksasyonu, H₂ metabolizması ve N₂ fiksasyonu ve ayrıca birden fazla fonksiyonda görev alarak genlerin ekspresyonunu kontrol eden iki bileşenli düzenleyici bir sistemdir (Arai vd., 2007).



Şekil 2.11 *Cereibacter sphaeroides*'te AppA/PpsR, PrrB/A ve FnrL tarafından fotosentez genlerinin redoks ve ışık bağımlı düzenlenmelerinin gösterimi (Pandey vd., 2017)

Sabitlenmiş azot kaynaklarına yanıt olarak nitrojen fiksasyonu ve bu düzenlemeye ek olarak klasik ntr sistemleri de aracılık eder. Nitrojen sınırlayıcı şartlarda O^N bağımlı aktivatör ailesinin bir üyesi olan *nif* tümü olmasa da çoğu diazotrof bakteride nitrojen fiksasyon (*nif*) genlerinin ekspresyonunu sağlar ve aktivatör protein *NifA* tarafından aktive edilir. Aktive olan *NifA*'nın ifadesi ve aktivitesi hücrel azot durumuna yanıt olarak düzenlenebilir. İfade ve aktivite düzenlemeleri organizmadan organizmaya değişir (Merrick & Edwards, 1995).

nifA'nın düzenlenmesinden sorumlu *ntrBC* genleri bazı bakteri türlerinde keşfedilmiştir. Bunlar arasında *Azotobacter*, *Vibrio*, *Proteus*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Agrobacterium*, *Rhodobacter* ve *Azospirillum* türleri yer alır. Bu bakteriler de *NtrB* tarafından *NtrC* uyarılır (Merrick & Edwards, 1995). *NtrC* ise *nifA1* ve *nifA2* transkripsiyonunu aktive eder (Hoffmann vd., 2014). *NtrC* ayrıca amonyak ve Mo 'ya yanıt olarak Fe-nitrojenaz aktivitesinin kontrol noktalarından biri olan *anfA*'nın transkripsiyonunu aktive eder. Bu sayede *NtrC*'nin arttırıcı bölgeye bağlanması ile *nifA* ve *anfA*'nın (*nif* ve *anf*) gen transkripsiyonu aktive olur (Maeda, 2022). Şekil 2.12'de gen kontrol mekanizmaları gösterilmiştir.



Şekil 2.12 Gen kontrol mekanizmaları. Elektron taşıma zincirinin *cbb₃* dalından geçen elektron akışının hacmi ve kinon havuzunun redoks durumu, *Cereibacter sphaeroides*'te fotosentez gen ekspresyonunu düzenleyen sinyaller üretir. *Cbb₃* sitokrom *c* oksidazın katalitik alt birimi seviyesinde bir inhibitör sinyal üretilir ve membran lokalize PrrC polipeptit yoluyla, tepki olarak fotosentez genlerinin çoğunun ekspresyonunu kontrol eden PrrBA (RegA/RegB) iki bileşenli aktivasyon sistemine iletilir. Hup SLC geninden sonraki basamakalar hidrojenazların hidrojen oksidasyonunun katalize edilmesinden sorumlu genleri içerir (Oh & Kaplan, 2001). Created in BioRender. Baştutan, M. (2025) <https://BioRender.com/i26s301>

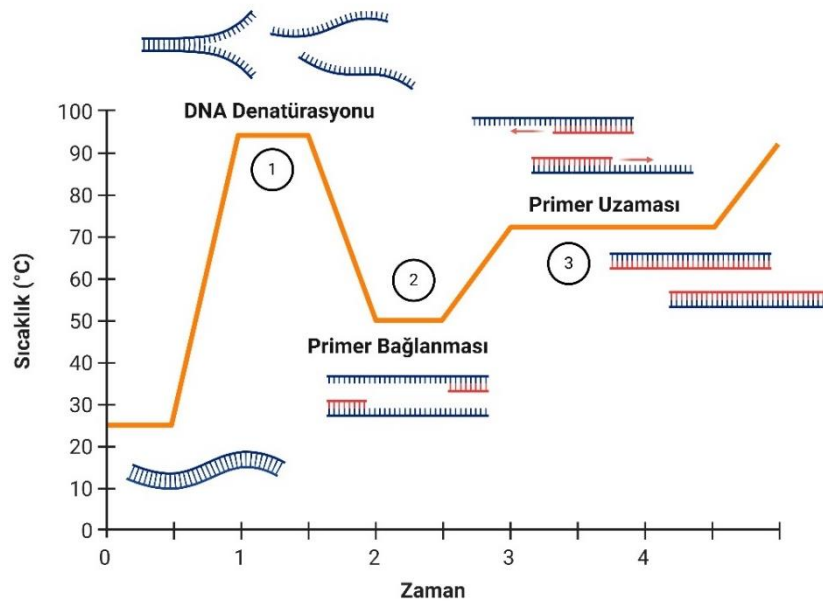
2.4. Gen İfade Analiz Yöntemleri

Gen ifadesi, başta transkripsiyon olmakla birlikte translasyonu ve proteinlerin dönüşümünü içeren bir süreçtir. Transkripsiyon, epigenetik işaretler, transkripsiyon faktörleri ve kromatin topolojisi ile kontrol edilmektedir. mRNA işlenmesi (örneğin; çıkarma, ekleme, modifikasyonlar ve poliadenilasyon), translasyon boyunca taşınması ve bozunması, kodlamayan RNA'lar ve RNA bağlayıcı proteinler ile düzenlenmektedir (Buccitelli & Selbach, 2020). Gen ifadelerinin kontrolü, hücre farklılaşması ve hücrel stres tepkileri, organizma gelişimi, bağışıklık ve doku homeostazını da kapsayan farklı temel biyolojik süreçlerde önemli bir rol alır (Pope & Medzhitov, 2018). Gen ifade çalışmaları belirli bir genin haberci RNA (mRNA) seviyelerini ortaya çıkartmakla rol alır. Günümüzde, RNA'nın kantifikasyonu için çok fazla yeni teknikler geliştirilmiştir ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu yeni tekniklere örnek olarak yaygın şekilde kullanılan teknikler mikrodiziler, qPCR ve transkriptom analizi için RNAseq'tir (Segundo-Val &

Sanz-Lozano, 2016). Araştırmacılar organizmadaki genlerin aynı zamanda farklı koşullar altında, farklı dokularında ve farklı gelişim evrelerindeki transkripsiyon seviyeleri ölçülerek genomdaki her bir genin işleyişi hakkında bilgi edinmeye olanak tanır ve “gen ekspresyon profilleri” oluşturabilir. Gen ifade analizlerinde kullanılan yöntem ve teknikler aşağıda kısaca verilmektedir.

2.4.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, genetik materyallerin belirli bir bölgesi için tasarlanmış primerlerin bağlanıp genetik materyalin logaritmik bir şekilde amplifikasyonunu içerir. Polimeraz zincir reaksiyonu, gerekli sıcaklıklarda ve gerekli döngü sayılarında üç döngüsel basamakta gerçekleşir. Bu basamaklar; denatürasyon, primer hibridizasyonu ve uzamadır. Şekil 2.13'te bu basamakların şematik gösterimi verilmiştir (Kozera & Rapacz, 2013).

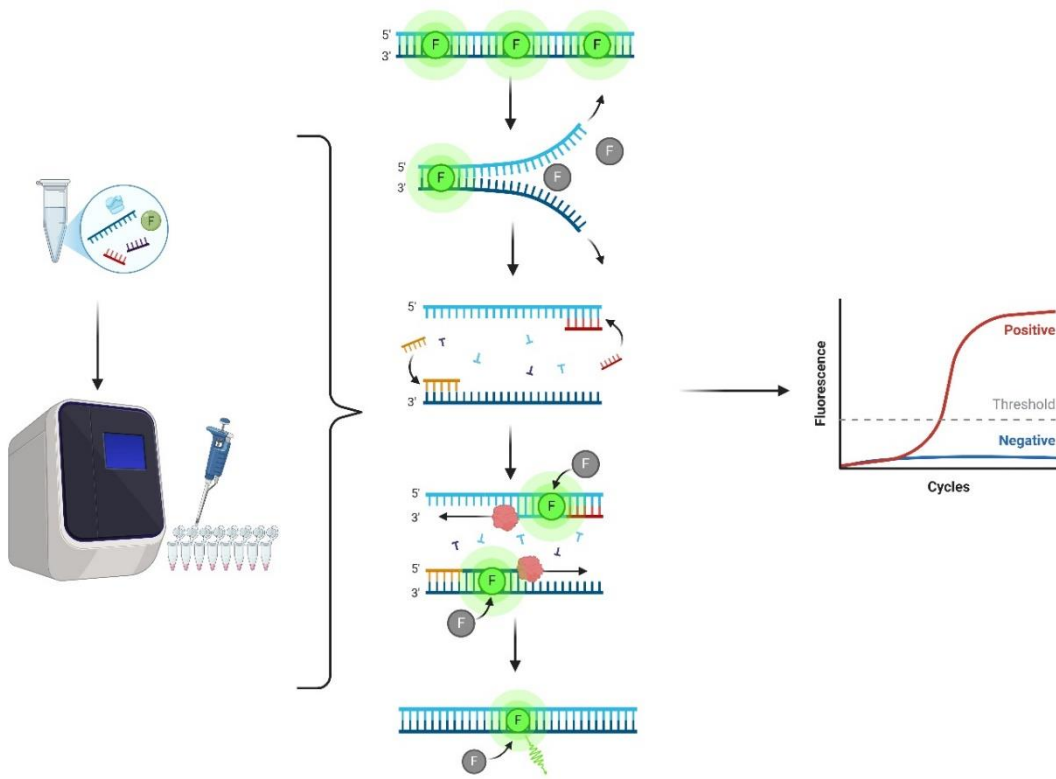


Şekil 2.13 Polimeraz zincir reaksiyon döngüsü. Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/z95h976>

2.4.2. RT-PCR

Gerçek zamanlı revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR), amplifikasyon sonucu oluşan ürünlerinin her amplifikasyon döngüsü sırasında mRNA

miktarının doğrudan izlendiği gen ifade analizini ifade eder. Bu zamana kadar kantitatif gen ifade çalışmalarında dizi teknikleriyle beraber gerçek zamanlı PCR önemli bir yer almaktadır (Tichopad vd., 2003). RT-PCR, nükleik asit miktarının veya kopya sayısının ölçülmesi için, belirli bir floresans değerindeki numunelerin Ct değerlerinin, standarttan elde edilmiş benzer verilerle (housekeeping genlerle) standart bir eğri oluşturularak karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmektedir. Eşiğin üzerinde tespit edilen floresan sinyalinin her bir örnek için eşik döngüsünü (Ct) tanımlamakta kullanılır ve sinyalin gerçek olduğu varsayılmaktadır (Artika vd., 2022). Şekil 2.14'te RT-PCR analiz basamakları gösterilmiştir.



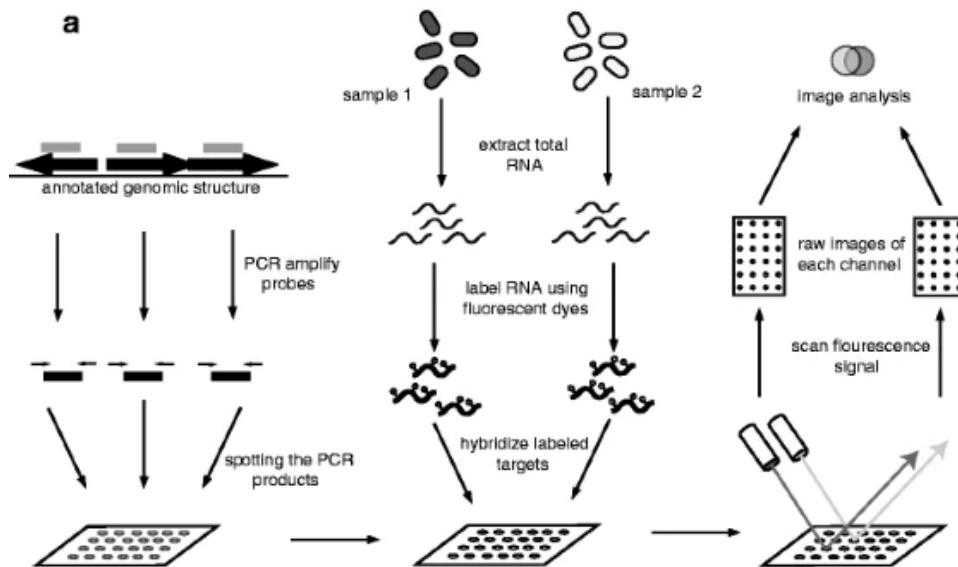
Şekil 2.14 RT-PCR analiz adımları (Engstrom-Melnyk vd., 2015). Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/i42h426>

2.4.3. Mikrodizin (Mikroarray)

Gen ifadesinin transkript düzeyde izlenip, incelenebilmesi DNA mikrodizi teknolojilerinin ortaya çıkması ve gelişimiyle mümkün hale gelmiştir. DNA Mikroarray'i destek malzemelerinden olan plastik, silikon çip veya cam gibi katı olan bir yüzeye tutturulur (DNA Mikroarray Teknolojisi). Bu katı yüzeyler, nükleik asitlerin daha kolay

bağlanmasını sağlamak için spotlama öncesi bazı işlemlerden geçirilerek çeşitli maddeler ile kaplanır ve bu işlem immobilizasyonu sağlamlaştırmaktadır. Problar, yüzeye tutturulan DNA parçalarına (genellikle 20-100 nükleotid uzunluğunda) denir. Çok fazla test bölgelerine sahip mikrodizilerin boyutları 10-500 mikron arasında değişebilir (DNA Mikroarray Teknolojisi; Heller, 2003).

DNA mikroarray analizi, hassasiyet ve seçicilik açısından iyi bir performans sunmasıyla birlikte binlerce genin ifade düzeyini aynı anda analiz etme fırsatı sunar (Abd-Elnaby vd., 2021). Genomik, proteomik, hücresel analiz alanlarında, yeni transkriptlerin haritalanmasında, gen ekspresyon modellerinin profillenmesinde, sekans delesyonlarının ve mutasyonlarının saptanmasında ve transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin bulunmasında kullanılır (Bertone & Snyder, 2005; Kumar vd., 2005). Binlerce genin ifade düzeyini analiz etmesi prokaryotik biyolojisinin de çeşitli yönlerinin araştırılmasına imkân sunar. Çünkü bakterideki tüm genlerin ekspresyonunun eş zamanlı olarak izlenmesine imkân sunar. Birçok kullanım alanı vardır fakat yaygın bir şekilde gen ekspresyon analizlerinde kullanılır (Ehrenreich, 2006; Rashid vd., 2014). Şekil 2.15'te mikroarray analiz basamakları gösterilmiştir. Bu teknikte aynı anda birden fazla DNA fragmanının tanımlanması sağlanır. Analizler hassas, spesifik ve hızlı bir şekilde sonuçlanır (Govindarajan vd., 2012).



Şekil 2.15 Mikrodizilerle transkripsiyon analizinde ana adımlar (Ehrenreich, 2006)

2.5. RNA Dizileme (RNA-Seq)

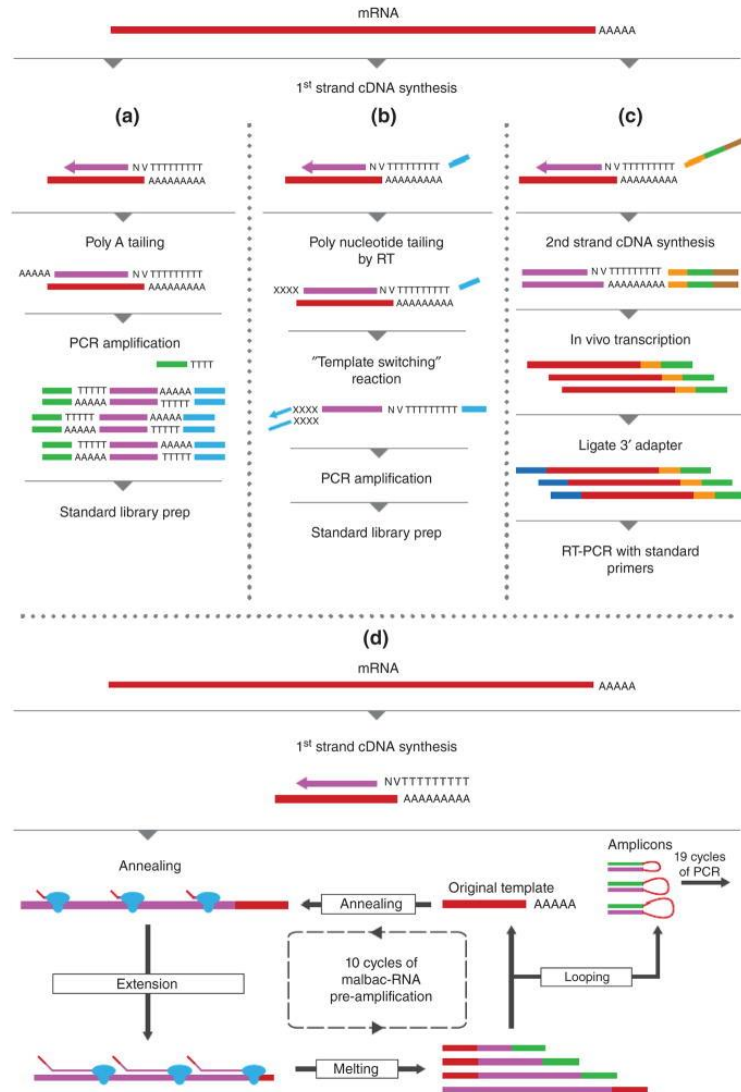
"RNA-Seq" terimi hem tür hem de miktar açısından dokuda, organda, hücrede, toplulukta, ekosistemde ve tüm organizmada RNA'nın tüm transkriptom profillerini elde etmek, miktarını belirlemek ve incelemeler yapmak için kullanılan yöntemlerden bir tanesidir (Jazayeri vd., 2015). Verimi yüksek olan yeni nesil dizilemelerin (NGS) geliştirilmesi, tamamlayıcı DNA'nın (cDNA) dizilenmesi ardından RNA analizinin yapımını sağlayarak transkriptomik analizine izin verir (Kukurba & Montgomery, 2015). Son yıllarda, RNA-Seq gen ifadesini incelemek, yeni RNA türlerini belirlemek ve transkriptom profillemesi için tercih edilen güçlü bir teknolojidir (Hrdlickova vd., 2016).

RNA-seq, transkriptlerin genom çapında ölçülmesinin yanı sıra hemde tek nükleotid çözünürlüğü sayesinde transkriptlerin doğru şekilde haritalanmasına da imkan verir. RNA-seq, haritalanmış okumaları farklı örneklerle kıyaslayarak gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu sayede çevresel kaynaklı değişikliklere yanıt olarak ya da incelenmekte olan genin ekspresyonunda meydana gelen değişikliklere yanıt olarak farklı şekilde eksprese olan genlerin tanımlanmasına imkan sunar (Broglia vd., 2023). RNA-seq teknolojisi mikroarrayden farklı olarak referans transkriptomun önkoşul bilgisine bağlı kalmadan analiz yapma imkanı sunar (Kogenaru vd., 2012). Farklılıklar arasında en önemlisi ve dikkat çeken ise RNA-Seq transkript izoformlarının analizi ve bilinmeyen genlerin dizilerinin sonucunu verir (Hrdlickova vd., 2016). RNA-seq veri analizi bazı adımlardan oluşur. Bunlar, kalite kontrolünün sağlanması, okumaların hizalaması, gen ve transkript ifade düzeylerinin kantifikasyonu, farklı gen ifadesinin analizi ve tespiti, normalizasyon, fonksiyonel analiz, alternatif eklemenin karakterizasyonunun sağlanması ve gen füzyon tespiti gibi durumlarda yer alır (S. Zhao vd., 2020). RNA-Seq'in 3 çeşidi vardır; Single-cell RNA-Seq, Bulk RNA-Seq ve Spatial RNA-Seq (X. Li & Wang, 2021).

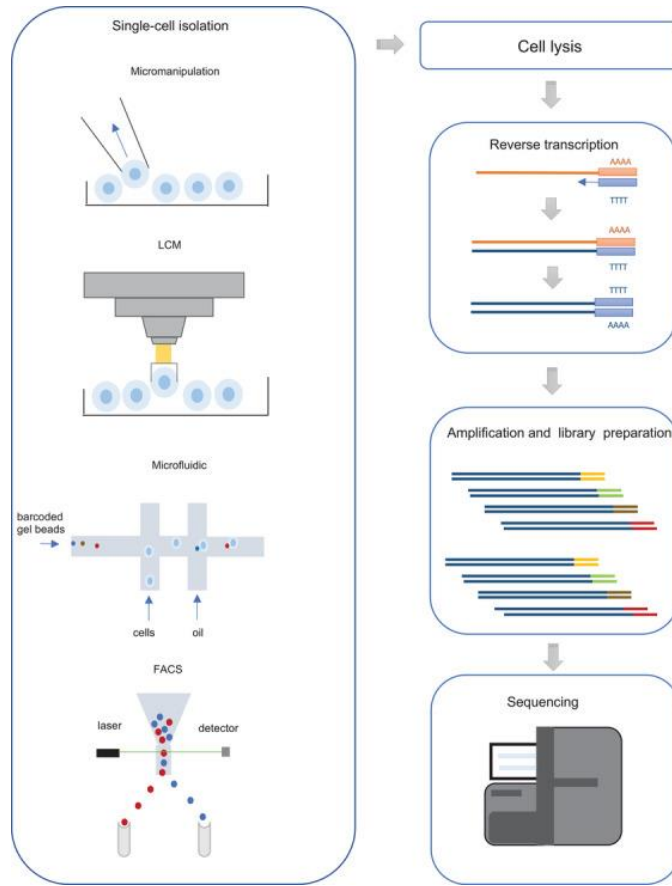
2.5.1. Single-cell RNA-Seq

Transkriptom heterojenitesini ve transkriptomik analizlerini incelemek için 2017'den itibaren tek hücreli RNA dizileme scRNAseq, aktif bir şekilde kullanılan araçlardan biri haline gelmiştir. Bu teknoloji ile RNA biyolojisinde incelemeler, gen ekspresyon seviyelerinde hızlı analizler yapılır ve gen ifadelerinin yüksek bir çözünürlükte incelenmesi sağlanmıştır (X. Li & Wang, 2021). Son yıllarda birçok

scRNA-seq protokolleri geliştirilmiştir. Bunlar Şekil 2.16’da gösterilmektedir (Hrdlickova vd., 2016). Gelişimleri devam eden scRNA-seq protokolleri daha yüksek verimli, daha hassas, otomatik ve maliyeti uygundur. Protokollerin geliştirilmesiyle beraber scRNA-seq verimliliği, doğruluğu ve duyarlılığı artmaktadır. Protokollerin avantaj ve dezavantajları vardır. Her protokolün performansı ve özelliği farklılık gösterir. Her scRNA-seq 3 basamaktan oluşmaktadır: (1) ters transkripsiyon (2) cDNA amplifikasyonu ve (3) dizileme kütüphanesinin hazırlanması (Kolodziejczyk vd., 2015). Şekil 2.17’de iş akış şeması gösterilmiştir. Toplu(bulk), scRNA-seq ile karşılaştırıldığında scRNA-seq değişken ve karmaşık veriler üretir. Bu sebeple, analitik yaklaşım seçerken scRNA-seq verilerinin değişken ve karmaşık veri üretimlerine dikkat edilmelidir (AlJanahi vd., 2018; Chen vd., 2019).



Şekil 2.16 Single-cell RNA-Seq (Hrdlickova vd., 2016)

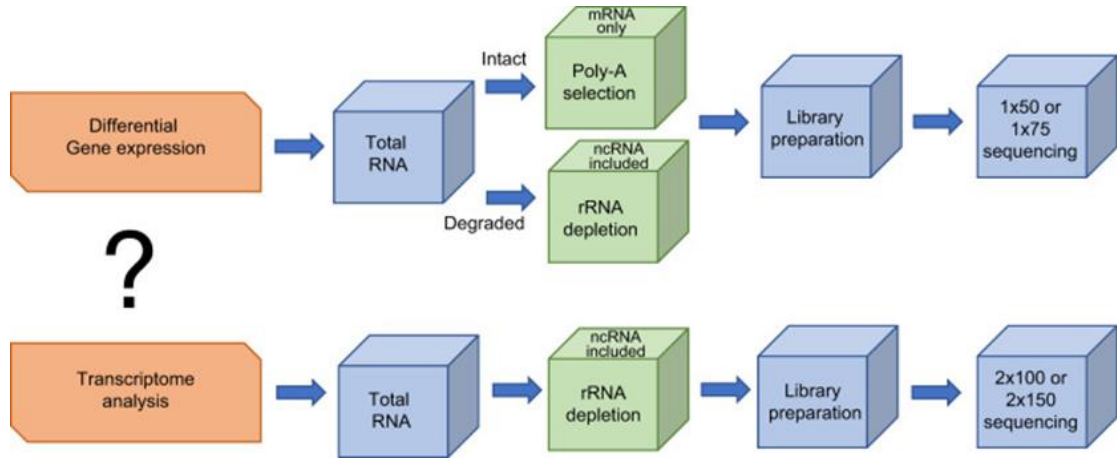


Şekil 2.17 Tek hücreli RNA dizileme (scRNA-seq) iş akışı (Ding vd., 2020)

Tek hücre (single-cell) düzeyinde gen ifadesini anlamak, hücrelerdeki gen düzenlemesini tam anlamıyla elde etmek için önemlidir. Tek hücre analizinde bazı zorluklar yer almaktadır. Bunlar tek hücrelerden izolasyon yapmak, çok düşük RNA sonuçları ile cDNA kütüphaneleri hazırlamak için daha hassas yöntemler kullanmak ve tek hücre analizi için kullanılan hesaplamalı yöntemlerdir (Ziegenhain vd., 2017).

2.5.2. Bulk (toplu) RNA-Seq

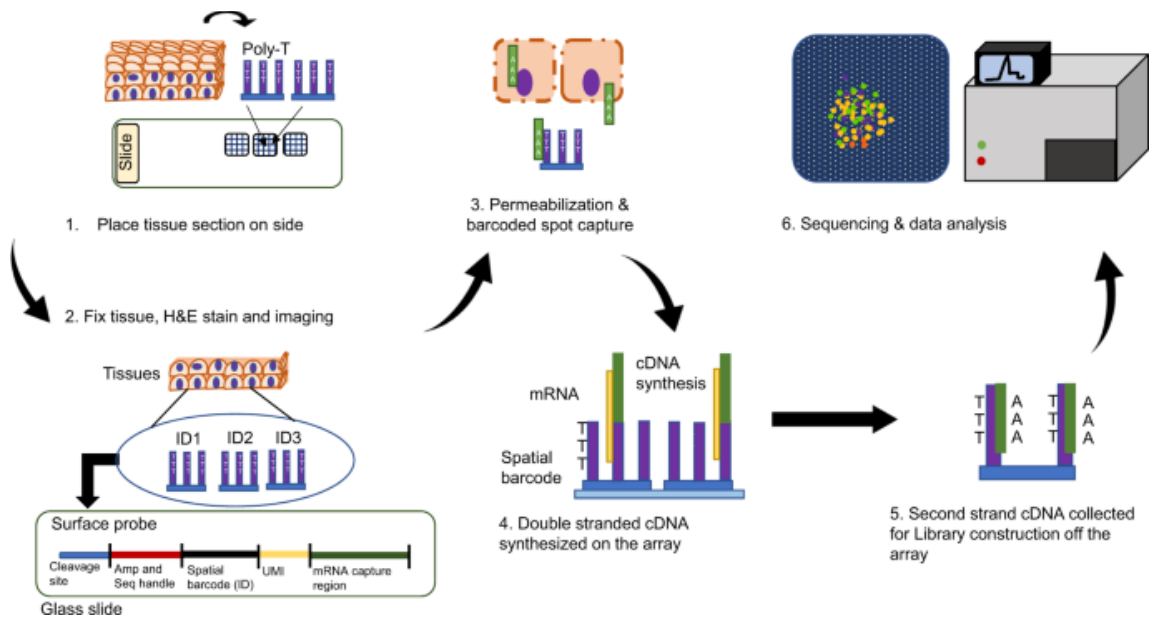
Global gen ekspresyonunu Bulk RNAseq inceler ve RNA türlerine göre bu analiz iki tür kitaplığın dizilenmesini içerir. Bunlar rRNA hariç tüm RNA türlerini içeren kitaplık ve yalnızca mRNA kitaplığını içeren dizilemedir. Şekil 2.18’de kitaplıkların ana hatları gösterilmiştir. Dizileme tipleri arasında en çok kullanılan bulk RNAseq’dir. Bu tür dizileme basit ve uygun maliyetlidir, büyük ölçüde yalnızca mRNA'ya odaklanır. Bulk RNAseq analizinde, başlangıç basamağında bir doku veya hücre popülasyonu kullanılır (Li & Wang, 2021).



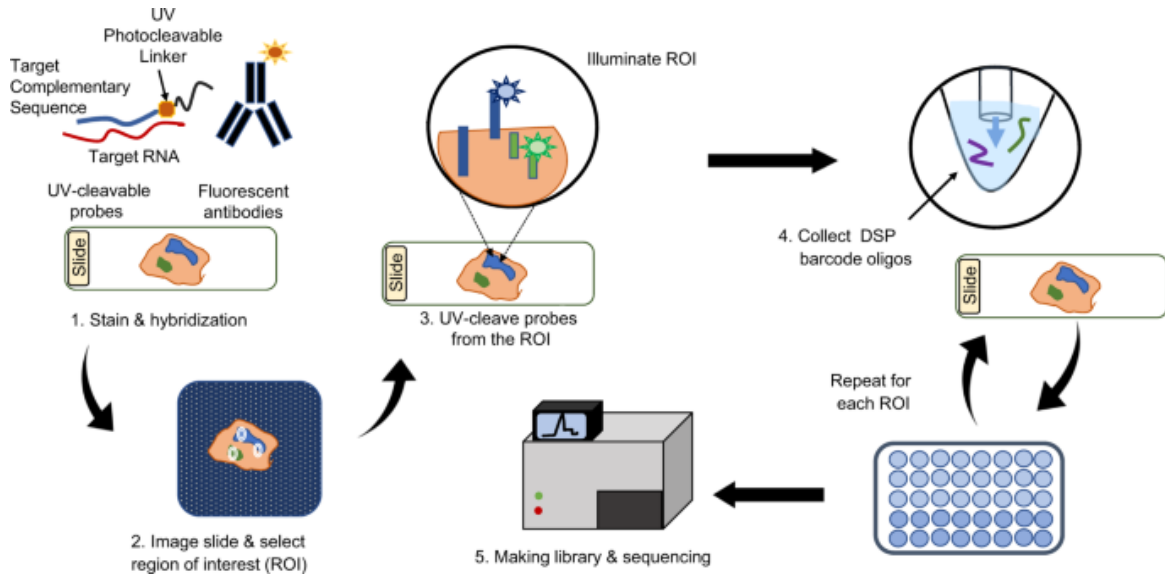
Şekil 2.18 İki tür Bulk RNAseq kitaplığının ana hatları (Li & Wang, 2021)

2.5.3. Spatial (Uzamsal) RNA-Seq

Dönüştürücü olarak işlev gören spRNAseq teknolojisi, RNA aktivitelerini spatial (uzamsal) olarak inceler ve yeni nesil RNA dizilemesini temsil eder. Tüm transkriptom verilerinin uzamsal bilgilerini hibridizasyon ve global transkripsiyonel analizi birleştirerek yapılan transkriptom analiz verileri verir. Uzamsal RNAseq teknolojisi için şu an ticari olarak iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar 10X uzamsal transkriptomik ve GeoMx Dijital uzamsal profil oluşturucudur (X. Li & Wang, 2021). Şekil 2.19 ve 2.20'de iş akış şemaları gösterilmiştir.



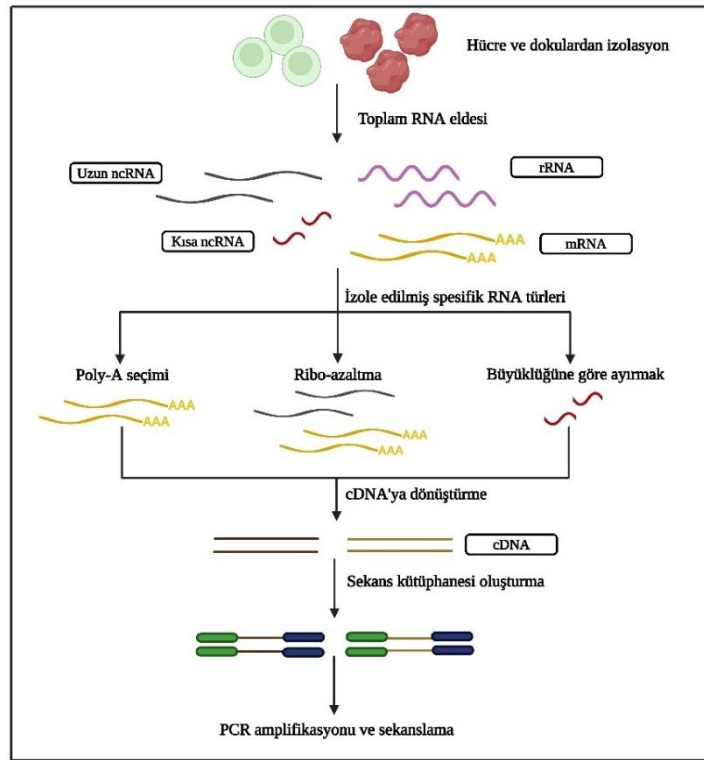
Şekil 2.19 10X uzamsal transkriptomiklerin iş akışı (Li & Wang, 2021)



Şekil 2.20 GeoMx dijital uzamsal profil oluşturucunun iş akışı (Li & Wang, 2021)

2.5.4. RNA dizileme (RNA-Seq) iş akışı

RNA-Seq yönteminde ilk adım, RNA'nın biyolojik bir numuneden (örneğin, hücreler, dokular) izolasyonudur (Total RNA ekstraksiyonu). RNA, dizileme için bir kitaplık oluşturmaya yetecek kalitede olmalıdır. RNA-Seq yöntemi için kaliteli RNA'lar elde etmek önemlidir. İkinci adım, total RNA'dan spesifik RNA türlerinin izolasyonudur. Bunun için iki protokol uygulanır; ilki poliadenilatlanmış transkriptleri zenginleştirmek için poli-A kuyruğu eklemek, ikincisi rRNA'lar hariç tüm RNA türlerini içeren tüm transkriptom kitaplığı için izolasyon gerçekleştirilir. rRNA transkriptleri genel derinliğini azalttığı için kitaplık yapımından önce çıkarılır. Daha sonra ters (reverse) transkripsiyon ile tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya dönüştürülür. Ana mRNA sarmalını ve tamamlayıcısını temsil eden kitaplıklar oluşturulmuş olur. Oluşan cDNA fragmanlarının uçlarına dizileme adaptörleri bağlanır. PCR ile amplifikasyon gerçekleştirildikten sonra RNA-Seq kitaplığı için hazırdır ve hesaplamalar yapıp analizler sonuçlandırılır (Kukurba & Montgomery, 2015). Şekil 2.21'de RNA-Seq analiz adımları verilmiştir.



Şekil 2.21 RNA dizileme (RNA-Seq) analiz basamakları (Kukurba & Montgomery, 2015)

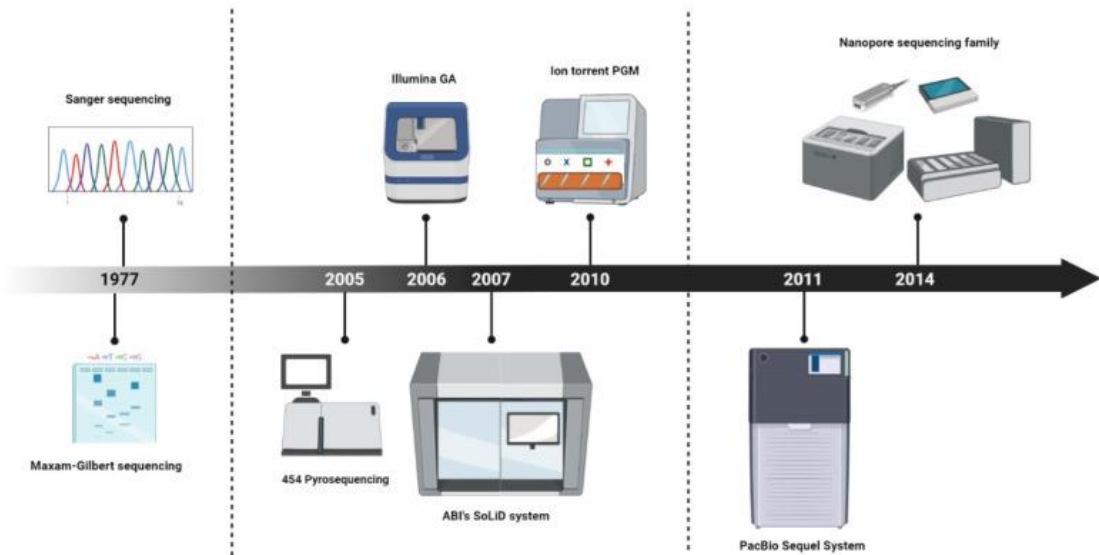
2.5.5. RNA-Seq biyoinformatik analiz araçları

Biyoinformatik, hüresel RNA'nın spesifik analizlerini elde etmek için kullanılan analiz araçlarıdır. RNA-Seq analizleri; okumaları kirleten kontaminantları, kalitesi düşük-küçük ve karmaşık okumaları kesip, düzenleyip ve temizlemek, okumaları genomla veya transkriptomla haritalamak, okumaları hizalayıp birleştirmek, genleri ve ekzonları ölçmek ya da gen ekspresyonları elde edilmiş verilerin analizini yapmak için çalışmanın amacına göre kullanılır. RNA-Seq araştırmalarında yapılan ilk adım dizilerin kalitesini kontrol etmektir. RNA seq dizilerinin kalitesi FASTQC programı kullanılarak kontrol edilir. İyileştirilmiş ve kaliteli okumalar elde edildiğinde veri analizi ile yapılacak ilk işlem transkripsiyon ve transkriptom yapısını ortaya çıkarıp kısa RNA-Seq okumaları atamaktır. RNA-Seq verilerini birleştirmek ve hizalamak için kullanılan iki yaklaşım vardır. İlki De novo assembly (birleştirici) ikincisi referans genomu kullanarak haritalamadır (Jazayeri vd., 2015).

Bir RNA-seq deneyine başlamadan önce kullanılacak en uygun platform seçilmelidir. Uygulanan her RNA dizileme platformlarından gelen veriler değişiklik gösterir ve değişiklikler ise deneylerin yorumlanmasını etkilerler. Bu yüzden numune

hazırlama protokolleri de farklılık gösterir. Deney sonuçlarının başarısı kullanılacak platformun doğru seçimine bağlıdır (Chu & Corey, 2012).

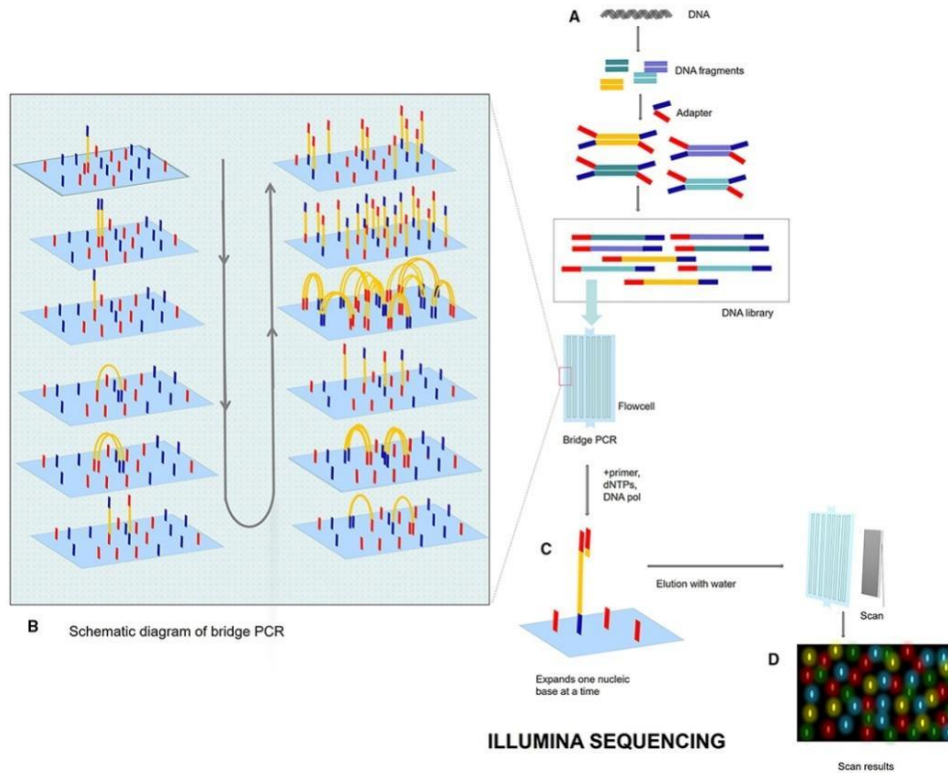
2004-2005'ten bu yana birçok NGS dizileme platformları çalışmalara sunulmuş ve kullanılmıştır. Günümüzde yaygın bir şekilde kullanılan dizileme platformları arasında 2004 yılında piyasaya çıkmış Roche pyrosequencing tabanlı 454 sistemini 2006 yılında Illumina (San Diego, CA) tarafından geliştirilen Solexa GA (Genom Analizörü)/HiSeq/MiSeq/NextSeq baz sentezi ile dizileme yöntemi, 2007 yılında ligasyonla dizileme SOLİD (oligonükleotid ligasyonu ve tespiti) sistemi, 2010 yılında yarı iletken çip tabanlı, şu anda Life Technologies'e (Grand Island, NY) ait olan IonTorrent sistemi, HelicosTM katı faz tabanlı genetik analiz platformu ve tek molekülle gerçek zamanlı dizileme tabanlı yaklaşım Pacific Biosciences (Menlo Park, CA) tarafından yapılan PacBio RSII sistemi ve Oxford Nanopore'un (Eid) izlemiştir (Wolf, 2013). Bu dizileme gelişimleri Şekil 2.22'de gösterilmiştir. Ancak bu platformların neredeyse hiçbiri Sanger dizilemeye dayanmamaktadır. Bu platformların her birinin okuma uzunlukları da değişkenlik göstermektedir. SOLİD sistem 75 bp'ye kadar (eşleştirilmiş uç), Illumina Solexa GA (Genom Analizörü)/HiSeq/MiSeq/NextSeq 300 bp (üst üste binen eşleştirilmiş uç), Ion Torrent 400 bp (çift yönlü), Roche pyrosequencing tabanlı 454 sistemi 700 bp (eşleştirilmiş uç) ve PacBio sistemleri 8500 bp uzunluğuna kadar okuma yapabilmektedir. NGS çalışmalarında çalışma başına okuma sayısı 1 milyon ile 5000 milyon arasında değişmektedir (Jiang vd., 2015).



Şekil 2.22 Moleküler biyoloji tarihi boyunca dizileme gelişimi (Athanasopoulou vd., 2022)

2.5.5.1. Illumina MiSeq/HiSeq/GA baz sentezi ile dizileme yöntemi

Illumina MiSeq/HiSeq/GA teknolojisi, 2006'dan günümüze kadar okuma uzunluğu ve okuma sayısında artışlar göstererek gelmiştir. Illumina sekanslaması, "köprü amplifikasyonu" olarak bilinen bir tekniğe dayanır (McGettigan, 2013; Slatko vd., t.y.); DNA fragmanları köprü PCR tarafından tekrarlanan amplifikasyon reaksiyonları ile gerçekleştirilir. Daha sonra tersinir sonlandırma ile dizileme yapmak için tersinir terminatör (RT) nükleotidi kullanılır. RT nükleotidi, 3'-OH gruplarında (2-siyanoetil) floresanla etiketlenerek korunur. Flow hücrelerine RT nükleotit karışımının eklenmesiyle DNA polimeraz, DNA ipliğine modifiye edilen nükleotitleri ekler (Şekil 2.23). Tersine çevrilebilir sonlandırma ile dizilemedeki her döngü üç basamaktan oluşur, i) flow hücrelerine bağlı DNA sarmalına tamamlayıcı RT nükleotidinin mutant DNA polimeraz tarafından dahil edilmesi, ii) farklı floresans sinyallerinin dört baz için ayrı ayrı saptanması ve iii) son işlem olarak sonlandırıcı parçayı ve raportör molekülü ayırarak 3'OH grubunun iyileştirilmesi. Bu döngünün tekrarları DNA kalıbının dizilenmesini sağlar. RT nükleotidi dahil edilip ve görüntülenmesi sekanslama sırasında meydana gelir. Floroforların ve sonlandırıcı bazların çıkarılması ardından da 3'OH grubundaki korumanın uzaklaştırılması ile aktive edilir ve başka bir nükleotid birleşmesi sağlanır. Bir seferde tek bazın dahil edilmesinden kaynaklı oluşan homopolimer dizileme hatası bu teknik sayesinde giderilebilir. Çünkü başka bir baz sonlandırıcının eklenebilmesi için önce diğerinin çıkartılması gerekir. Dört kanallı sıralama sistemleri Illumina HiSeq ve MiSeq'te kullanılır ve görüntü tarafından her baz ayrı algılanır. Illumina sayesinde dört bazı belirlemek için yalnızca iki görüntü ve iki kanal gerektiren sentez yoluyla dizileme (Sequencing by synthesis, SBS) teknolojisine sahip NextSeq 500 bulunmuştur. Bu yeni teknoloji yüksek doğruluk ve kalite sağlarken döngü sayısında, görüntü yakalama süresinde, sıralama maliyetinde ve veri işleme için gereken süreyi azaltarak farklı avantajlar sunar (Ambardar vd., 2016).

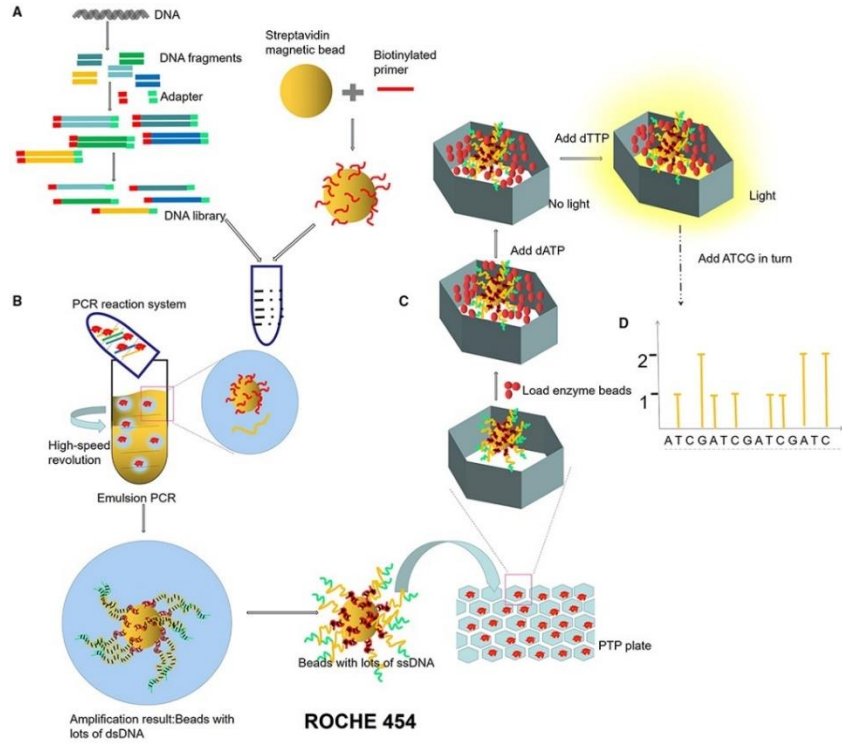


Şekil 2.23 Illumina yöntemi iş akış şeması (Zhang vd., 2021)

2.5.5.2. Roche 454 sistemi

Ticari olarak ilk yeni nesil sistem Roche 454'tür. Bu sistemde pirosequencing sıralama teknolojisi kullanır. Pyrosequencing teknolojisi, zincir amplifikasyonunu sonlandırmak için dideoksinükleotitleri kullanmak yerine nükleotid birleşimi sırasında salınan pirofosfatın tespit edilmesine dayanır. 454'e özgü adaptörlere sahip kütüphane DNA'ları, denatüre edilir ve emülsiyon PCR tarafından izlenen amplifikasyon boncukları ile yakalanır. Daha sonra bir pikotiter plakasında dNTP'den (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) biri, ATP sülfürlaz, lusiferin, lusiferaz, DNA polimeraz ve adenozin 5' fosfosülfat (APS) ile kalıp ipliğın bazlarını tamamlayıp ve dahil edilen nükleotid miktarına eşit olan pirofosfatı (PPi) salgılar. PPi'den dönüştürülen ATP, lusiferini oksilusiferine yönlendirir ve görünür ışık üretir. Ardından pyrosequencing reaksiyonunu tekrarlamak için reaksiyon sistemine başka bir dNTP eklenir. İş akış şeması şekil 2.24'te gösterilmiştir. 2005 yılında Roche 454 sistemi 100–150 bp okuma uzunluğuna sahipti. 2008 yılında 454 GS FLX Titanium sisteminin öne sürülmesiyle okuma uzunluğu, filtreden sonra 700 bp'ye kadar ulaşabilir hale geldi. 2009'un sonlarında ise Roche, GS Junior'ı 454 sisteminde birleştirdi. Bu iki sistemin birleştirilmesi kitaplık hazırlanmasını

ve verilerin işlenmesini basitleştirdi. Bu sistemin en büyük avantajı hızlı olmasıdır. Dizileme başlangıç ve bitiş arası 10 saattir. Okuma uzunluğu da diğer NGS sistemlerine kıyasla daha fazladır. Fakat reaktiflerin maliyeti yüksektir. Eksikliklerinden bir diğeri de 6 bp'den uzun poli-bazlar için yüksek hata oranları vermesidir (Liu vd., 2012).

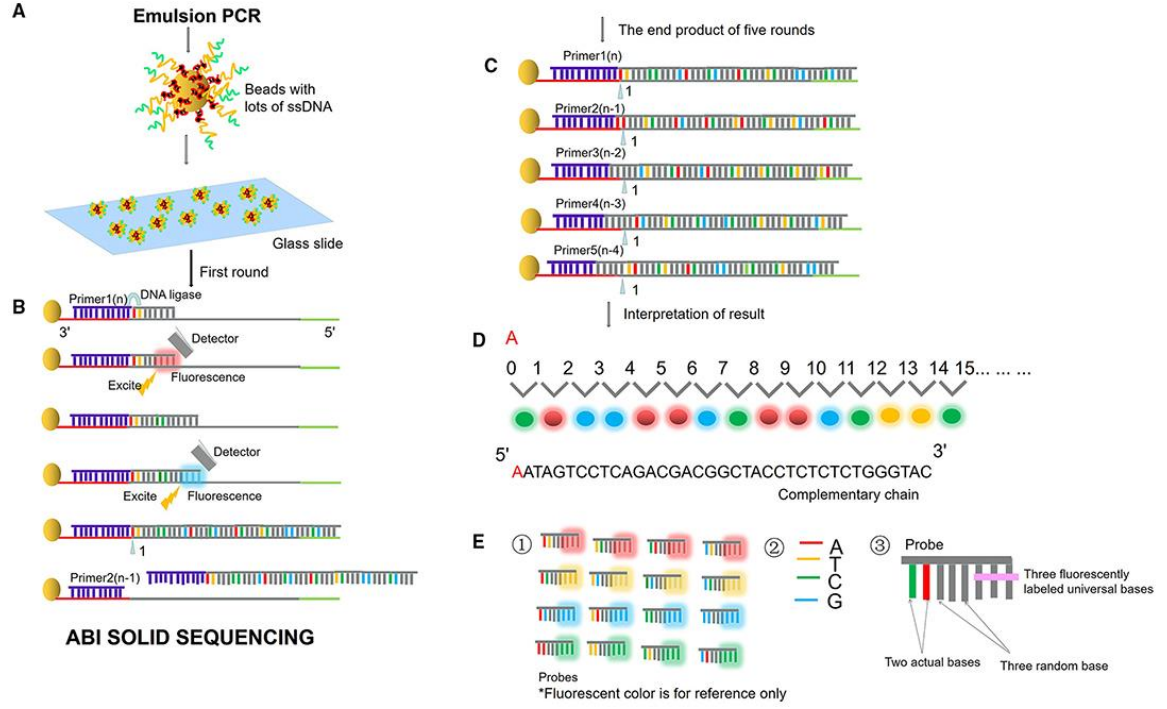


Şekil 2.24 Roche 454 sistemi iş akışı (Zhang vd., 2021)

2.5.5.3. SOLID sistem

Applied Biosystems tarafından SOLID (Oligo Ligation Detection ile Sıralama) sistemi 2006 yılında satın alınmıştır. Sekanslama teknolojisi ligasyon sekanslamaya bağlı iki bazlı sekanslamaya dayanır. Bir SOLID sistemi flow hücrelerinde kitaplıklar; ligasyon bölgesi (birinci baz), bölünme bölgesi (beşinci baz) ve 4 farklı flüoresan boya (son baza bağlı) içeren 8 baz prob ligasyonundan oluşur (Şekil 2.25). Floresans sinyalleri, kalıp ipliği tamamlayan problemlerin varlığında kaydedilir daha sonra problemlerin son 3 bazının ayrılmasıyla sinyaller kaybolur. Ladder primerler kullanılarak 5 tur sekanslamadan sonra fragment dizileri çıkartılabilir. SOLID sistemi ilk başlarda 35 bp okuma uzunluklarına sahipti. Geliştirilen iki tabanlı dizileme yöntemi ile yüksek doğruluk verir. ABI, ilk SOLiD sistemini 2007'nin sonunda piyasaya çıkarmıştır. SOLiD 5500xl dizileme sistemi

ise 2010 yılının sonlarında çıkarılmıştır. SOLiD 5500xl dizileme sistemi, 85 bp okuma uzunluğu sahiptir. Bir çalışma 7 günde tamamlanabilir (Zhang vd., 2021).



Şekil 2.25 SOLiD sistem iş akış şeması (Zhang vd., 2021)

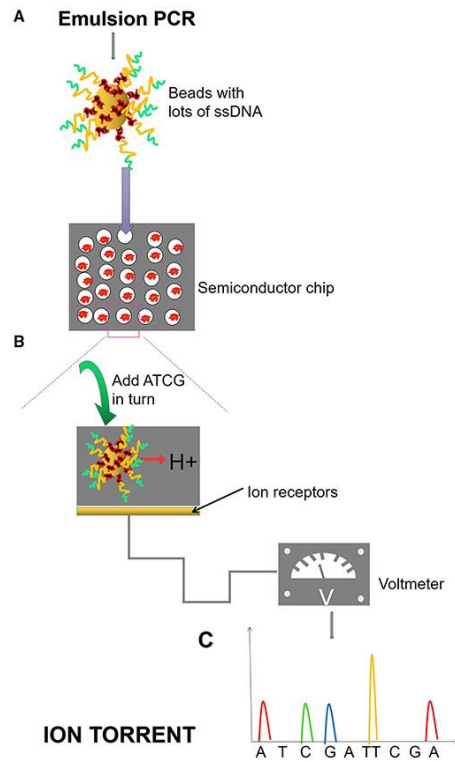
Bu sistemin de okuma uzunluğunun az olması ve yalnızca uygulamalarda yeniden sıralama yapıyor olması ve hesaplamaların pahalı olması gibi eksiklikleri vardır. SOLiD sistemi, hedeflenen bölgeyi yeniden dizileme, tüm genomu yeniden dizileme, epigenom çalışmaları (metilasyon ve ChIP-Seq) ve transkriptom araştırmaları (gen ekspresyon profili oluşturma, küçük RNA analizleri vs.) için kullanılır (Liu vd., 2012).

2.5.5.4. Ion Torrent sistemi

Ion Torrent sistemi, 2011 yılında piyasaya sürülmüştür. SBS tabanlı bir yaklaşımdır ve sentez sırasında dahil edilen nükleotidlerin dizilerini oluşturarak pH ölçümleri kullanılır. Nükleotit dizilerinden oluşan protonları tespit eder ve yarı iletken teknoloji gücünden de yararlanır. Ion Torrent sisteminin sekans okuma uzunlukları değişkenlik gösterir. Ion Torrent cihazı, bir parçanın her iki uç bölgesinden de sekanslama oluşturamaz (Quail vd., 2012).

Ion Torrent sistemi, 3 mikron çaplı iyon küre parçacıklı boncukların yüzeyine özel adaptör sekansları bulunan DNA fragmanları emülsiyon PCR ile bağlanır. Bağlanan

DNA fragmanları bu yüzeyde klonal bir şekilde çoğaltılır. Silikon levhası üzerinde üretilen proton algılayıcı kuyucuklara kalıp boncuklar yüklenir. Adaptör dizisindeki belirli konumlar üzerinden dizileme başlatılır. Sekanslama meydana geldikçe yeni bir baz sırayla eklenir. Bazların eklenmesiyle protonlar salınır ve eklenen baz sayılarına orantılı bir şekilde sinyal algılanır (Pervez vd., 2022). Şekil 2.26’da iş akış şeması gösterilmiştir. Dört farklı Ion Torrent sistemi vardır; GeneXus sistemi, iki temas noktasına sahip iş akışı kullanır ve bir gün içerisinde analiz sonucu verir. Düşük örnek girişleri için maliyeti uygundur. Ion GeneStudio S5 sistemi ölçeklenebilir, düşük maliyetli ve verimli bir şekilde dizileme sistemidir. Kısa zaman içinde tek seferde 2-130 M arasında okuma yapar. Bu sistemin 5 çeşidi vardır. PGM Dx sistemi, in vitro teşhisler ve düzenlenmiş laboratuvarlar için uygundur. Entegre bir sistemden oluşur veri analizi ve dizileme için reaktifler, sarf malzemeleri, NGS cihazları ve yazılım araçlarını kullanır. Ion Chef sistemi, Ion GeneStudio S5 sistemlerinin geliştirilmiş halidir (Quail vd., 2012).

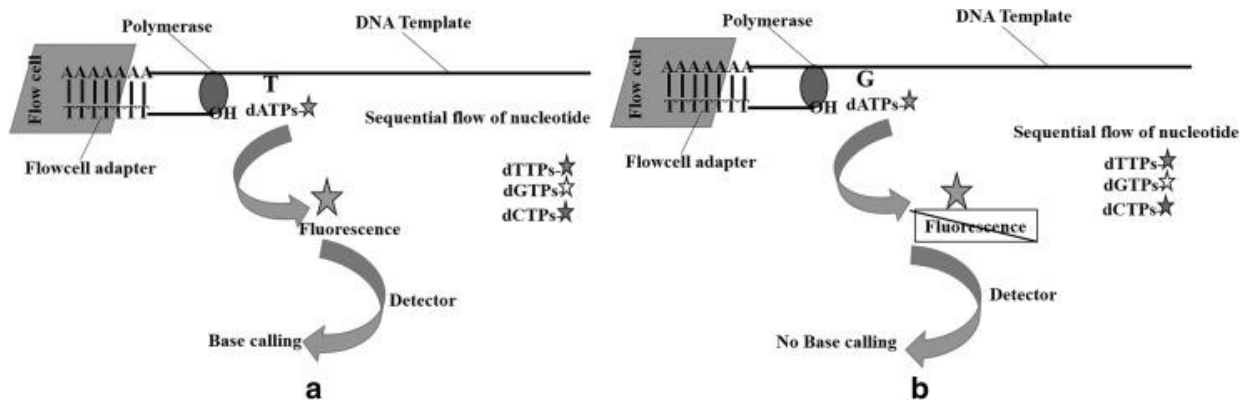


Şekil 2.26 Ion Torrent sisteminin basamakları (Zhang vd., 2021)

2.5.5.5. HelicosTM tek molekül dizileme sistemi

Tek molekül dizilemeye yönelik ilk girişim HelicosTM, 2009 yılında piyasaya sürülmüştür ve SeqLL, LLC tarafından pazarlanan HeliScope Genetic Analysis System

platformunda yapılır. Helicos dizilemede kitaplık hazırlığı için ligasyon ve amplifikasyona ihtiyaç yoktur. Bu yüzden diğer dizileme teknolojilerine göre kolaylık sağlar. Bunun yerine kalıbın kısa DNA fragmanlarına (100-200 nt) kesilmesinin ardından terminal transferaz ve bir dideoksinükleotid kullanılarak DNA uzantısını bloke etmek için 3' OH poli-A ile kuyruklanarak kesilir. Poli-A kuyruklu DNA, sentez ile dizilemenin başlatılması için 25 kanal içeren tek kullanımlık flow-cell yüzeyinde immobilize edilen oligo-dT içeren primerlerine hibridize edilir. Son olarak, HeliScope sıralayıcı poli T kuyrukları aracılığıyla bağlanan DNA dizisinin tanımlanması için floresans etiketli nükleotitler eklenir ve görüntüleme ile tespit edilen ışığın yayılmasıyla dizi belirlenir. Şekil 2.27'de tek molekül dizileme sisteminin basamakları gösterilmiştir. Tek molekül floresan dizileme kullanılarak yapılan ilk ticari araç TGS'dir. Aynı zamanda, flow hücresine doğrudan RNA hibridizasyonu gerçekleştirip RNA moleküllerinin de cDNA'ya dönüştürülmeden dizilişine ve miktarının belirlenmesine izin verir. Bu yöntem kütüphane hazırlama sürecini kolaylaştırmış olsa da PCR amplifikasyon basamaklarının olmaması, maliyetinin yüksek olması, hata oranlarının fazla olması ve kısa okuma uzunluğu (24-70 baz) üretimi olması gibi nedenlerden dolayı dezavantaj gösterir (Ambardar vd., 2016; Athanasopoulou vd., 2022).

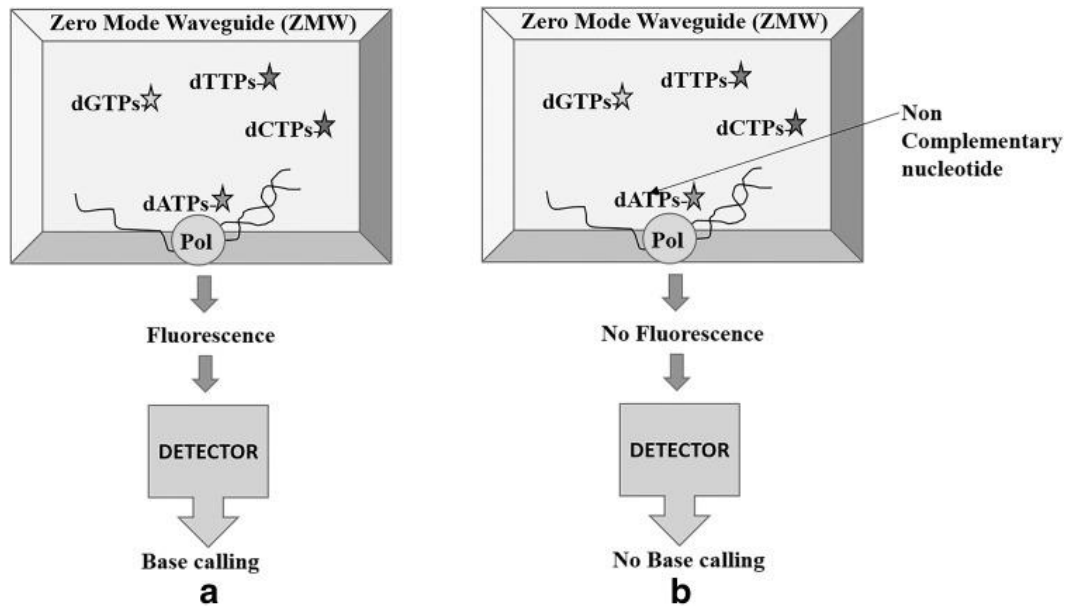


Şekil 2.27 Helicos™ tek molekül dizileme sistemi basamakları (Ambardar vd., 2016)

2.5.5.6. Pasific Biosciences (PacBio) sistemi

2010 yılında Pacific Biosciences, tek molekül sıralaması için nanoteknoloji ile moleküler biyolojiyi birleştiren bir nanosensör tabanlı teknolojidir. Bu teknolojiye DNA kalıbına bağlı DNA polimeraz molekülleri sıfır modlu dalga kılavuzları (ZMW'ler) olarak isimlendirilen hapsetme yapısı içine sabitlenir. Nanofotonik hapsetme yapısına sahip sıfır

modlu dalga kılavuzu (ZMW), şeffaf bir silika substrat üzerinde biriktirilmiş bir alüminyum ile kaplanmış dairesel bir delikten oluşur. Sıfır modlu dalga kılavuzları ~70 nm çapında ve ~100 nm derinliğindedir. Her bir sekanslama sırasında DNA polimeraz floresans etiketli nükleotitleri birleştirir ve γ -fosfat DNA sentezi sıfır mod dalga kılavuzunda (ZMW) izlenilmesine izin verilir. Sıfır mod dalga kılavuzunun (ZMW) genişliği ışığın dalga boyunca ilerleyemeyeceği şekildedir. Fakat enerji nükleotitlere bağlı floroforları uyarabilir. Her bazın eklenmesiyle gerçek zamanlı olacak şekilde floresans ışımlar takip edilir. Şekil 2.28’de Sıfır modlu dalga kılavuzu (ZMW) gösterilmiştir. PacBio sistemi, ~40 Kb okuma uzunluğuna sahiptir. Fakat doğruluğu ikinci nesil dizileycilerden daha düşüktür (Ambardar vd., 2016; Quail vd., 2012).

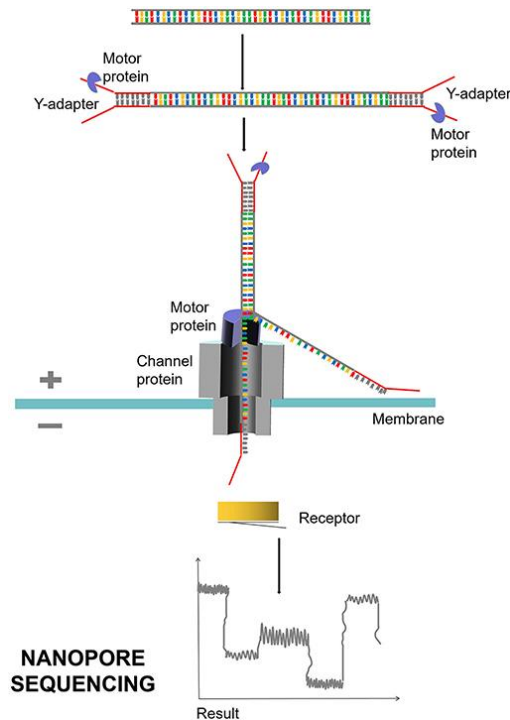


Şekil 2.28 Sıfır modlu dalga kılavuzu (ZMW) (Ambardar vd., 2016)

2.5.5.7. Oxford Nanopore sistemi

Dördüncü nesil gen dizileme teknolojisinin Oxford Nanopore Teknoloji (ONT) başlangıcını işaret eder. Dördüncü nesil gen dizileme teknolojisi, bilgisayar destekli teknoloji ile gen mühendisliği teknolojisinin birleşimidir. Oxford Nanopore dizileme teknolojisi (ONT), DNA nanopordan geçerken temel dizileri bozulmadan belirlemek için nanopore teknolojisini kullandı. Nanopore teknolojisi, nanopordan daha küçük yükü taşıyan biyolojik moleküllerin potansiyel değişikliğini tespit etmek için delikten geçerken ince bir zar yapısına gömülü nano ölçekli delikler anlamına gelir. Nanoporlar DNA veya RNA'nın fragman analizlerini yapabildiği için uzun okuma uzunluğuna sahiptir. Okuma

uzunlukları ise direkt DNA veya RNA fragmanlarının uzunluklarıyla ilişkilidir (Lu vd., 2016). ONT'nin okuma uzunluğu PacBio'nunkine benzerlik gösterir. ONT okumalarının, PacBio okumalarından daha yüksek hata oranları vardır (Lin vd., 2021). Nanopore dizileme, gerçek zamanlı dizileme ile görüntülenebilir. Dizilemenin başlamasıyla birlikte veri ve deneysel analizler elde edilebilir, dizilemenin durumunu gözlemleyebilir ve yeterli veri elde edilince işlemi durdurabilir. ONT nanopore dizileme teknolojisi, uzun okuma uzunlukları, tek molekül dizileme, dizileme verilerinin gerçek zamanlı izlenmesi ve hızlı dizileme hızları dahil olmak üzere birçok avantajı sunar. ONT dizileme teknolojisi, tek zincirli DNA veya RNA moleküllerinin tanımlanması için hassas bir platformdur. ONT nanopore dizileme diğer dizileme teknolojilerinden farklı olarak nükleotitleri optik sinyaller yerine elektrik sinyallerini kullanarak tanımlar. Bu teknoloji bir zar üzerinde kanal (nanogözenek) oluşturabilen bir proteine dayanır. Membranın iki tarafına da farklı voltajlar uygulanır. DNA veya RNA gibi negatif yüklü biyomoleküllere elektronegatif kuvvetlerin uygulanmasıyla biyomoleküller nano gözeneklerden geçerek gözenek boyunca akımın gücünü etkiler. Bazılar geçtikçe farklı elektrik sinyalleri üretilir ve kaydedilir. Son adım olarak tüm DNA/RNA dizilerinin analizinde sinyal hatalarını ve dizileme yanlışlığını ortadan kaldırmak için derin öğrenme kullanılır (Sun vd., 2022). Şekil 2.29'da sistem basamakları gösterilmiştir.

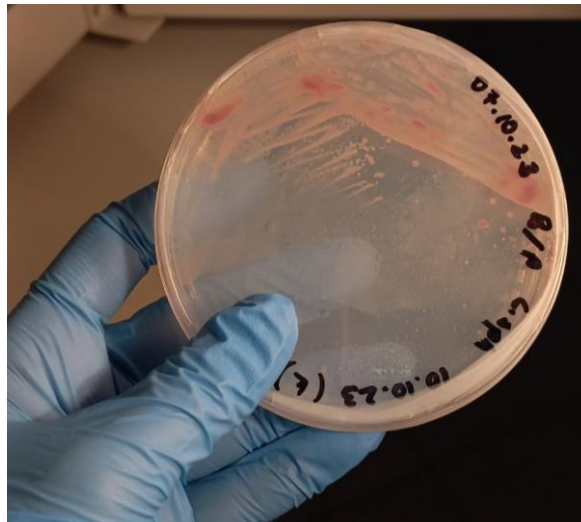


Şekil 2.29 Oxford nanopore dizileme sistemi basamakları (Zhang vd., 2021)

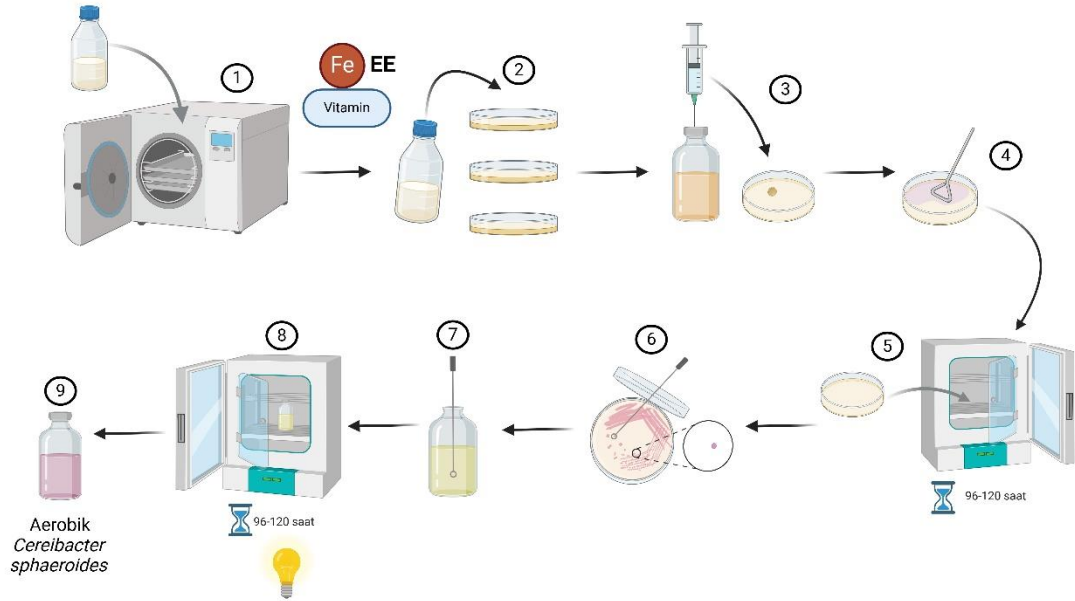
3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada, yabancı tip diazotrofik mor kükürtsüz *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM5864) kullanılmıştır. Çalışmanın amacı, N₂ gazının amonyağa (NH₃) dönüştürüldüğü veya sabitlendiği şartlarda *C. sphaeroides* O.U.001'deki gen ifade düzeylerini araştırmaktır. Çalışma sürecinde *C. sphaeroides* O.U.001 üç farklı azot kaynaklı sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Üç düzenekte de farklı azot kaynakları kullanılırken karbon kaynakları sabit olup malat kullanıldı.

C. sphaeroides O.U.001'in aktifleştirilmesi için öncelikle katı besiyerlerine ekim yapıldı. *C. sphaeroides*'in çoğaltılmasında kullanılacak katı besiyerleri, Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyerine otoklavdan önce agar (%1,5'luk) eklenerek hazırlandı. Otoklavdan sonra katı besiyer içerisine demir sülfat, eser element ve vitamin çözeltileri eklenip karıştırıldı ve homojen bir çözelti hazırlandı. Elde edilen agarlı B&P minimal besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaştırılması bekledi. -80°C'de stoklanmış *C. sphaeroides*'ten ilk önce hazırlanan agar besiyerlerine ekim yapıldı. Agar besiyerlerine ekim yapılan bakteriler aerobik olarak ve ışsız veya ışıklı ortamda 30±1°C (96 saat) etüvde aktifleştirildi. Ardından katı besiyerden tek koloni alınarak hazırlanan B&P minimal sıvı besiyerine aktifleştirmek ve stok için ekim yapıldı. Ekim sonrası inkübatörde bekletilip aktifleştirilen *C. sphaeroides* Şekil 3.1'de gösterilmiştir. -80°C'de stoklanmış *C. sphaeroides*'in katıdan sıvıya ekim şeması ise Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 *Cereibacter sphaeroides*'in agar besiyerinde görüntüsü



Şekil 3.2 *Cereibacter sphaeroides*'in katıdan sıvıya ekim şeması. Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/c68g879>

C. sphaeroides'in çoğalabilmesi için minimal besiyerinde azot kaynağı olarak glutamat ve karbon kaynağı olarak malat içeren besiyeri kullanıldı (Biebl ve Pfenning, 1981). Bu doğrultuda tez kapsamında farklı azot koşulların sağlandığı üç ayrı besiyeri tasarlandı. Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyerinin hazırlanış içeriği Tablo 3.1'de verilmiştir. Besiyeri hazırlandıktan sonra 5M NaOH kullanılarak pH 6.8'e sabitlendi. Tablo 3.1'de belirtilen çözelti hazırlandıktan sonra besiyerinin sterilizasyonu için 121 °C'de 15 dakika otoklavlama işlemi ile sağlandı.

Tablo 3.1 Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyeri içeriği

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
L- Malik Asit	2
Na Glutamat.H ₂ O	0,37
NaCl	0,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

B&P besiyeri otoklavlandıktan sonra soğumaya bırakıldı. Ardından demir sülfat (2X), 500 mg Fe(III) citrate hydrate tartılıp 0,1 L suda çözülerek hazırlandı ve otoklavlandı. Tablo 3.2'de belirtilen şekilde eser element (20X) çözeltisi de hazırlanıp

otoklavlandı. Daha sonra soğutulan B&P besiyeri içerisine bu çözeltiler eklendi. Ardından vitamin çözeltisi (20X) Tablo 3.3'te belirtilen şekilde hazırlandı ve yüksek sıcaklıkta vitaminlerin yapısı zarar göreceği için 0,22 µm çapında filtreden geçirilerek sterilizasyonu yapıp ardından soğuyan besiyeri içerisine vitamin çözeltisi de eklendi.

Tablo 3.2 Eser element (20X) çözeltisinin içeriği

İçerik	mg/L
ZnCl ₂	70
MnCl ₂ .4H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	60
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
CUCl ₂ .2H ₂ O	20
NiCl ₂ .6H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	40
HCl (%37 [v/v])	0,675 mL

Tablo 3.3 Vitamin (20X) çözeltisinin içeriği

Vitaminler	mg/500 mL
Thiamin	250
Nikotinik asit (Niasin)	250
Biotin	7,5

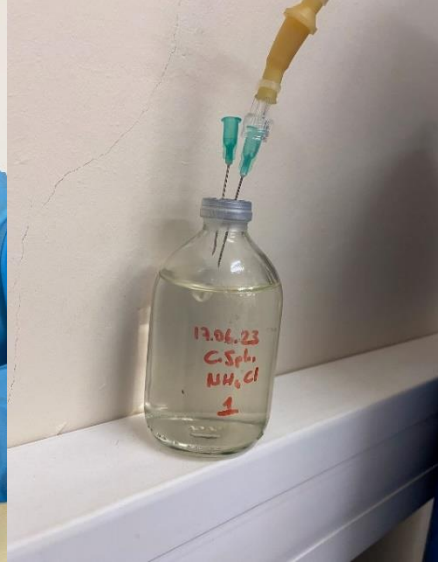
3.1. *Cereibacter sphaeroides* Kültür Ortamları

Azot (N₂) gazı ile büyüme koşulları, bakterinin azot (N₂) gazını amonyuma (NH₄) dönüştürebildiği kültür ortamıdır. N₂ ortamında bakterinin çoğalması için B&P besiyeri içeriğinde bulunan glutamat çıkarılıp onun yerine azot kaynağı olarak N₂ gazı kullanıldı. Diğer tüm çözeltiler içeriği ise aynı kaldı (Tablo 3.4). Besiyeri sıvısı ve kültür ortamının N₂ gazı ile doygunluğa ulaşabilmesi için penisilin şişesinde bulunan kültür ortamı iğne ucu tamamen besiyeri içerisine daldırılarak 5 dakika boyunca N₂ gazı ile muamele edildi. Bu şekilde bakteriler karbon kaynağı olarak malat kullanırken azot kaynağı olarak glutamat ile değiştirilen N₂ gazını kullanıldı (Şekil 3.3). Glutamat ve NH₄ besiyerinde büyütülecek bakteriler ise ilk önce aerobik şekilde büyütüldü. Daha sonra aerobik olarak büyüyen bakteriden %10'luk anaerobik stok elde etmek için; hazırlanan B&P

besiyerinden ve modifiye edilmiş NH_4 besiyerinden penisilin şişesine 90 mL besiyeri alındı ve üzerine 10 mL stok aerobik bakteriden ekim yapıldı. Besiyeri ortamını anaerobik şekilde elde etmek için ise besiyeri 3 dakika argon gazı ile muamele edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 N_2 gazı ile muamele



Şekil 3.4 Argon gazı ile muamele

Tablo 3.4 N_2 için tasarlanan B&P besiyeri

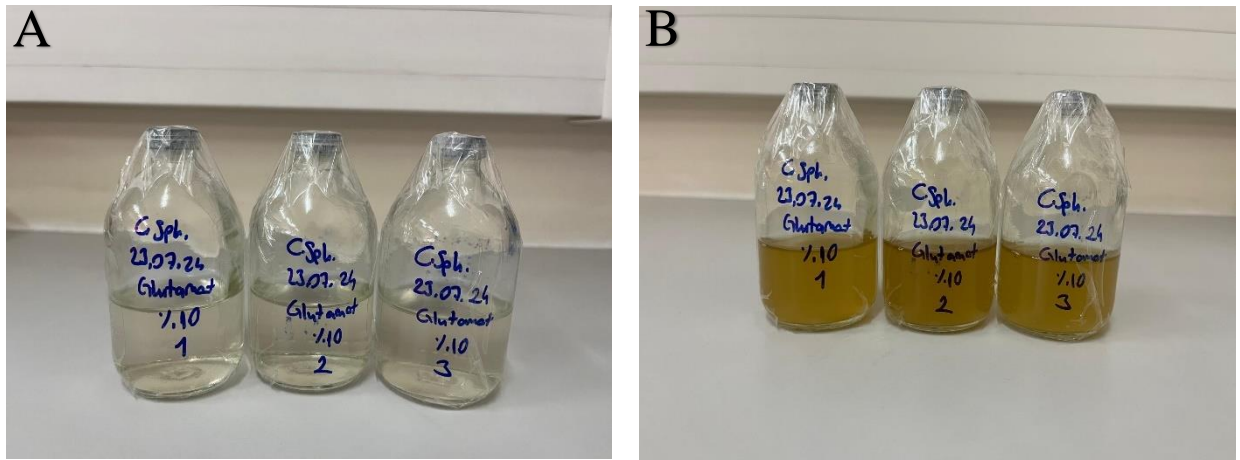
İçerik	g/L
K_2HPO_4	0,5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2
L- Malik Asit	2
N_2	(5 dk boyunca)
NaCl	0,4
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,05
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

NH_4 'un nitrojenaz enzim üzerindeki represyon etkisini ortaya çıkarmak için, azot kaynağı olarak NH_4Cl 'ün kullanılacağı B&P minimal besiyeri hazırlandı. B&P minimal besiyeri içeriğinden glutamat çıkarılıp yerine azot kaynağı olarak NH_4Cl kimyasalı kullanıldı. Diğer tüm çözelti içerikleri ise aynı kaldı (Tablo 3.5).

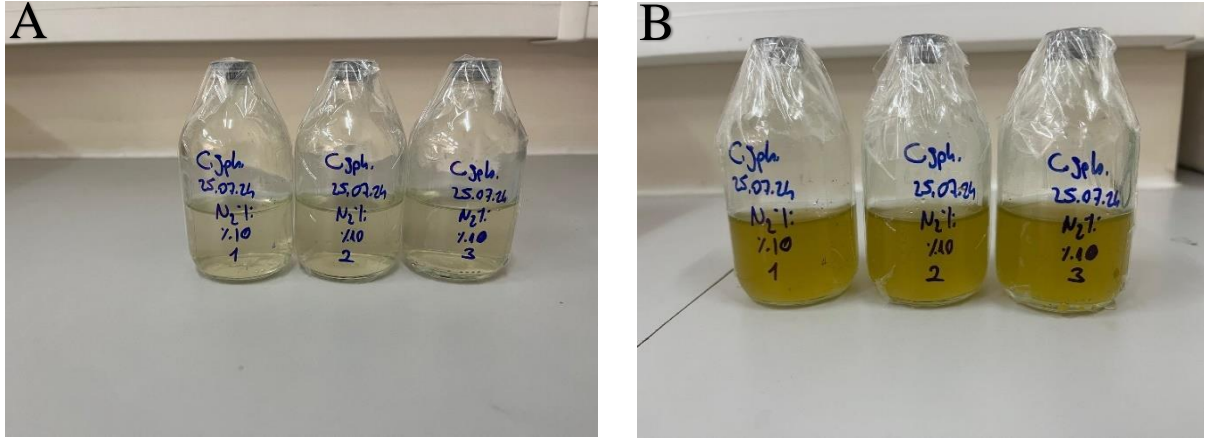
Tablo 3.5 NH₄ için tasarlanan B&P besiyeri

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
L- Malik Asit	2
NH ₄ Cl	3 mM
NaCl	0,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

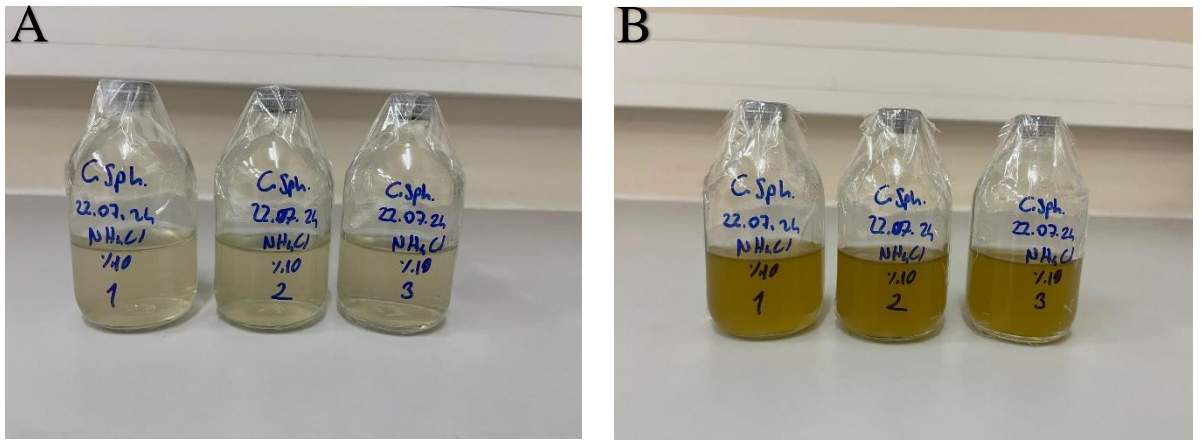
Üç farklı azot kaynağında çoğaltılan bakteriler ışık altında anaerobik koşullarda inkübe edilerek sağlandı. Işık kaynağı 60 Watt veya 100 Watt tungsten filamentli akkor lambalarla sağlandı. Bu şekilde bakterilerin büyümesi ışık altında gerçekleşmiş oldu. Bakteri kültürleri için optimum sıcaklık 30±1°C de etüvde bekletildi. Tez çalışmasındaki deneyler, 100 mL'lik penisilin şişeleri kullanılarak üç tekrar (n=3) halinde gerçekleştirildi. Şekil 3.5, 3.6, ve 3.7'de üç farklı azot kaynağında çoğaltılan bakterilerin 24 ve 48. saat görselleri verilmiştir.



Şekil 3.5 A) Glutamat 24. Saat görseli B) 48. saat görseli



Şekil 3.6 A) N_2 24. Saat görseli B) 48. saat görseli



Şekil 3.7 A) NH_4 24. Saat görseli B) 48. saat görseli

3.2. Büyüme Eğrilerinin Oluşturulması

C. sphaeroides glutamat, N_2 ve NH_4 besiyerlerinden %10'luk ekimler yapılarak bakteriler büyütüldü. Büyüyen bakterilerin hücre yoğunlukları UV-Vis spektrofotometrede (Agilent, Cary 60 UV-Vis) her 24 saatte bir 2000 μ L (2 mL) örnek alınarak OD 660 nm'de hücre yoğunlukları ölçüldü. Hücre büyümesi, ölüm ya da durağan fazlarına kadar takip edilerek ölçüldü. Hatalı OD ölçüm değerlerinin önüne geçmek için hücre kültürleri blankleri ile seyreltilerek ölçümler alındı ve bu şekilde OD okuma değerleri 0,8'in üzerine çıkmadı. Sonuçların istatistiksel açıdan anlamlı olması için ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı.

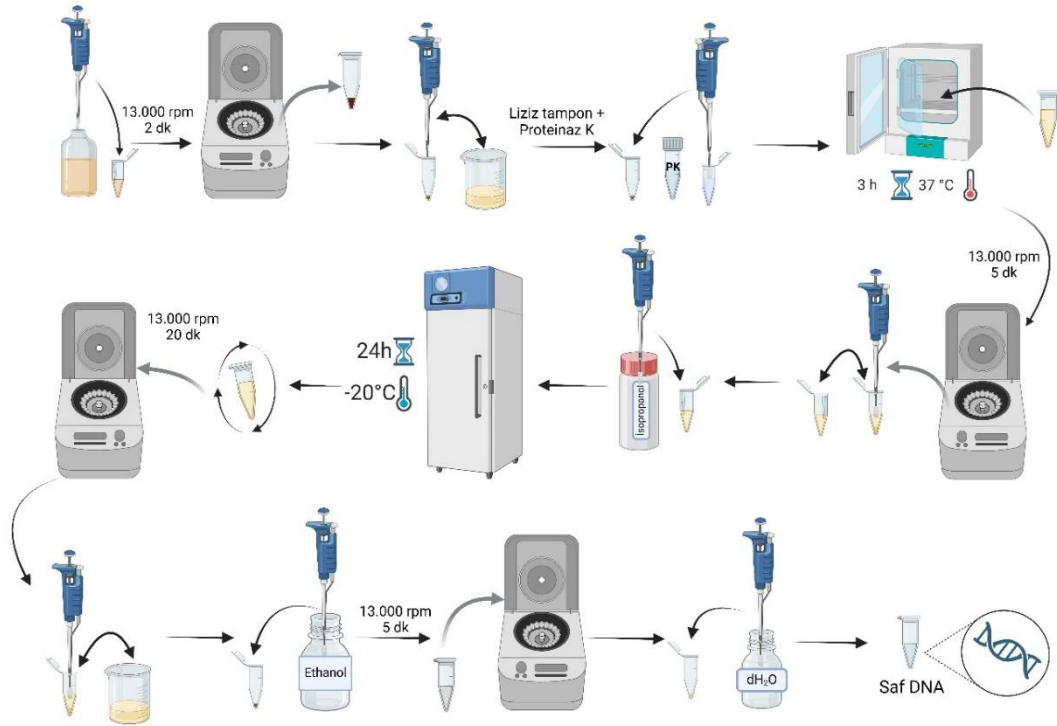
3.3. pH Eğrilerinin Oluşturulması

C. sphaeroides'in glutamat, N₂ ve NH₄ besiyerlerinde büyüyen bakterilerin büyüme sırasında pH değişimleri ölçüldü. Büyüyen bakterilerden her 24 saatte bir 2000 µL (2 mL) örnek alınarak pH metre ile pH değerleri ölçüldü. Tez kapsamında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermesi için ölçümler üç tekrarlı şekilde yapıldı. pH değişiklikleri ölüm ya da durağan fazlarına kadar takip edilerek ölçüldü.

3.4. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu manuel bir şekilde gerçekleştirildi. İzolasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi. Basamakların şematik çizimi şekil 3.8'de gösterildi.

- Steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne 1,5 mL bakteri eklendi ve 2 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı.
- Pelet üzerine 200 µl hazırlanan Liziz Buffer ve 4 µl Proteinaz K eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Karışım 3 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Ardından 5 dakika boyunca 13000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant yeni ependorfa aktarıldı. Üzerine 1:2 oranında saf isopropanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Gece boyu -20 °C'de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası ependorf alt üst edildi ve 20 dakika boyunca 13000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pelet üzerine 300 µl %70'lik etanol eklendi. 5 dakika boyunca 13000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Kurutma kağıdı üzerinde ependorflar ağzı açık ve yan yatırılarak kondu. Pelet kurutuldu.
- Pelet üzerine 50 µl steril su ilave edildi ve pipetaj yapıldı. DNA'nın çözünmesi için 15 dk +4 °C'de inkübe edildi.
- İzole edilen DNA daha sonra jelde görüntülendi ve -20 °C'de saklandı.



Şekil 3.8 DNA izolasyon basamaklarının şematik gösterimi. Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/u08p604>

3.5. Primerlerin Tasarımı ve Tür Validasyonu

3.5.1. Primerlerin tasarımı

Üç farklı azot kaynağında büyütülen bakteriler gen ekspresyon çalışmalarında nitrojenaz enzim sistemlerinde görevli *nifH* geni ve hem hücrede ekspresyonu sağlanan hem de evrensel olarak kabul edilen (housekeeping gen) *16S rRNA* geni kullanıldı. Analiz sırasında referans gen olarak *16S rRNA* geni kullanıldı. *C. sphaeroides*'e ait genler (*nifH* ve *16S rRNA*) NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan gen dizileri elde edilerek primer tasarımı gerçekleştirildi. Tasarlanan primerler firmaya gönderilerek sentez işlemi gerçekleştirildi. Tasarlanan primerler ise PCR ve qPCR işlemlerinde kullanıldı. Primerlerin temel bilgileri ve dizileri Tablo 3.6'da bulunmaktadır.

Tablo 3.6 Tasarlanan primerler

Primer Adları	Nükleotit Dizileri	Tm (°C)	GC Oranları (%)	Uzunluk (bç)
nifH L Primer	5'-GCCAACAACATCGCCAAGG-3'	60,08	57,89	19
nifH R Primer	5'-TCGGTCTTGCGCTCGTTG-3'	60,73	61,11	18
16S rRNA L Primer	5'-GATGGTTCCTTCAGTTCGGC-3'	58,91	55,00	20
16S rRNA R Primer	5'-CAGTTTCCCTAGAGTGCCCA-3'	59,02	55,00	20

3.5.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA Polimeraz enzimi kullanılarak DNA'nın çoğaltılması işlemidir. PCR işlemi 3 ayrı döngü aşamasından oluşur. İlk basamakta DNA'nın yüksek sıcaklıkta denatürasyonu meydana gelir. Denatürasyon, çift sarmallı DNA'nın tamamlayıcı bağlarının ayrılması işlemidir. Bu işlem genellikle 95°C sıcaklıkta gerçekleşir. İkinci basamak bağlanma (annealing) aşamasıdır. Bu basamakta denatüre olmuş bağların yeniden renatüre olması sağlanır. Son basamakta ise DNA polimeraz enzimi kalıp DNA zincirinin karşısına tamamlayıcı bölgeler bağlanır ve yeni zincir sentezlenir.

PCR için izole edilen DNA, tasarlanan *nifH* ve *16S* rRNA primerlerinin çalışıp çalışmadığının kontrol edilmesi için Tablo 3.7'de verilen miktarlarda reaksiyon ürünleri kullanılarak PCR işlemi gerçekleştirildi. 16S rRNA primeri için Tablo 3.8'de verilen döngüler *nifH* primeri için ise Tablo 3.9'da verilen PCR döngüleri kullanıldı.

Tablo 3.7 PCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
10X Tampon	5
dNTP mix	0,5
İleri Primer	1
Geri Primer	1
DNA örneği	1
Pfu polimeraz	0,5
Su	41
Son hacim	50

Tablo 3.8 16s rRNA PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	30
Bağlanma	57	30 sn	30
Sentez	72	60 sn	30
Son sentez	72	10 dk	1

Tablo 3.9 *nifH* PCR döngüsü

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	30
Bağlanma	55	30 sn	30
Sentez	72	30 sn	30
Son sentez	72	5 dk	1

3.5.3. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA'yı ve kalıp olarak izole edilen genomik DNA kullanılarak yapılan PCR deneyi ve sonrası oluşan PCR ürünleri, %1,5'lük (w/v) agaroz jel hazırlanarak agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülendi. 1,5 g agaroz tartılıp 100 ml 1X TAE tamponuna eklenerek %1,5'lük jeli elde edildi. Ardından mikrodalga fırında homojen bir çözelti oluşuna kadar agarozun erimesi beklendi. Hazırlanan agaroz jel çözeltisi bir miktar soğutulduktan sonra 25x20 cm ebatlarında jel tankına dökülüp kuyucukların oluşması için tarak yerleştirildikten sonra jel soğutulmuştur. Jel katılaştıktan sonra tarak çıkartılıp jel bulunan tank örneklerin yüklenmesi için elektroforez cihazına yerleştirildi. PCR ürünlerinin takibini yapabilmek için 3,5 µl GeneDirex Novel Juice yükleme boyası 5 µl PCR ürünleri ile karıştırılıp jelde oluşan kuyulara yüklendi. İstenilen PCR ürünlerinin boyunu anlamak için örneklerden hemen önceki kuyucuğa GeneRuler™, 100 bp -1 kb DNA merdiveni yüklendi. Elektroforez cihazının bir kutbu pozitif bir kutbu negatif yüklüdür. DNA ise negatif yüklü bir yapıya sahip olduğu için negatif kutuptan pozitif kutba doğru ilerler. PCR ürünlerinin boyları ise örneklerle beraber yürütülen DNA merdiveni ile hesaplanır. Örnekler jelde 70 dakika 90V olacak şekilde yürütüldü. Yürütme işlemi sonrasında bantlar görüntüleme cihazı transillüminatör ile görüntülendi.

3.6. PCR Ürünlerinin Pürifikasyon ve Ekstraksiyonu

Elde edilen *16S* rRNA PCR ürünleri için GeneJet PCR pürifikasyon kiti kullanılarak pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Pürifikasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.

- 1,5 mL'lik boş ependorf tüplere PCR ürünleri birleştirildi.
- PCR ürününe 1:1 oranında Binding Buffer eklendi ve pipetaj yaparak tamamen karıştırıldı.
- 16s rRNA primeri 500 bp altında olduğu için (146 bp) karışım üzerine 1:2 oranında isopropanol eklendi.
- Bu karışımın tamamı GeneJet Pürifikasyon kolonuna aktarıldı. 1 dakika 12 000 G'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı kısım döküldü.
- Kolona 700 µl Wash Buffer eklendi. 1 dakika 12 000 G'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı kısım döküldü.
- Wash Buffer kalıntılarında tamamen kurtulmak için aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi.
- Pürifikasyon kolonu temiz steril 1,5 mL'lik yeni bir ependorfa alındı. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 1 dakika 12 000 G'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Pürifikasyon işleminin gerçekleştiğini görmek için ürünün 3 µl'si agaroz jele yüklenerek görüntülenmesi gerçekleştirildi.

Elde edilen *nifH* PCR ürünleri için ilk önce Na-Asetat ile presipitasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından GeneJet Gen ekstraksiyon kiti kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Na-Asetat presipitasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.

- 1,5 mL'lik boş ependorf tüplere PCR ürünleri birleştirildi. PCR ürünlerinin üzerine önceden hazırlanmış 3M pH:5.2 Na-Asetat eklendi.
- Ardından 3 volüm %96'lık EtOH eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı.
- Karışım 1 saat boyunca -20 °C'de bekletildi. Daha sonra 10 dakika 13 000 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Bu basamakta pelet görüldü.
- Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 1,5 mL %70'lik EtOH eklendi ve 3 dakika 13 000

rpm’de oda sıcaklığında santrifüj edildi.

- Süpernatant dikkatli bir şekilde pelete dokunulmadan atıldı.
- Pelet laminer kabin içerisinde 15-20 dakika kurutuldu.
- Pelet 10 µl steril suda çözdürüldü.
- Jelden ekstraksiyon yapmak için presipitasyonu yapılmış ürün agaroz jele yüklenerek görüntülenmesi yapıldı.

Presipitasyon sonrası aşağıdaki basamaklar izlenerek agaroz jelden DNA fragmentinin bulunduğu alan kesilerek ardından GeneJet Ekstraksiyon kiti kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Ekstraksiyon için aşağıdaki basamaklar izlendi.

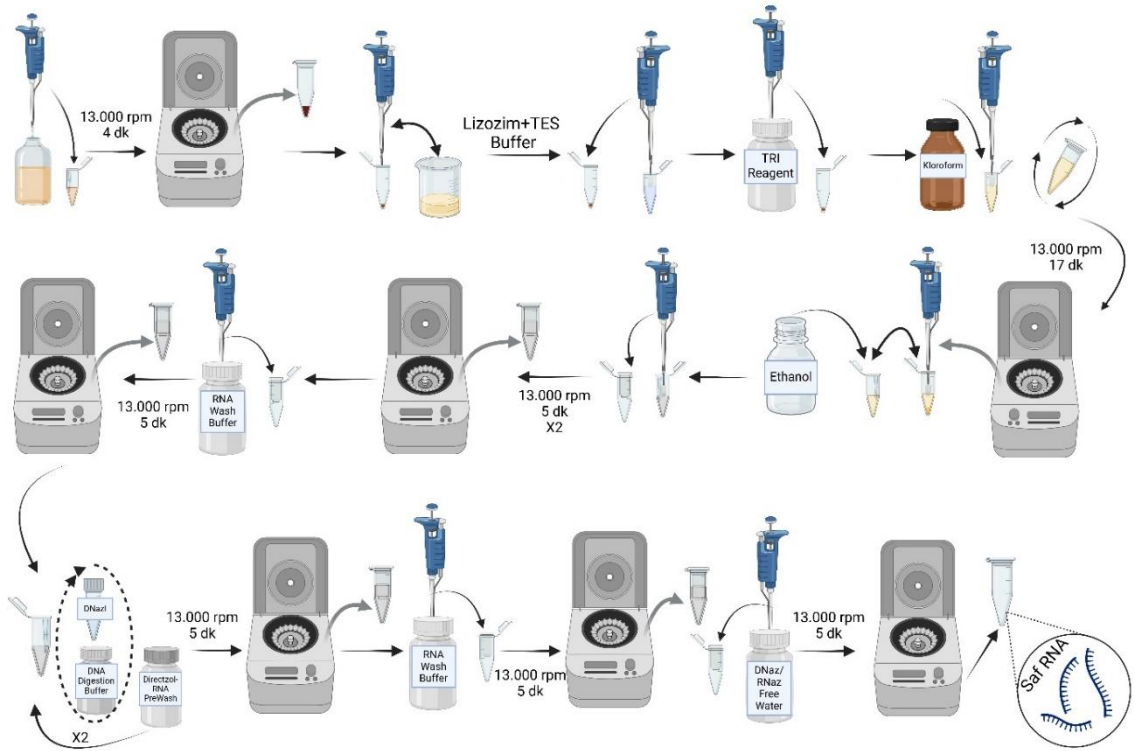
- Presipitasyonu yapılmış örnek jele yüklendi.
- Jelden DNA fragmentinin bulunduğu kısım jel bıçağı ile dikkatli bir şekilde kesildi ve darası alınmış boş 1,5 mL’lik ependorf tüpe koyuldu.
- Jel ağırlığına 1:1 oranında Binding Buffer eklendi.
- Bir behere 50-60 °C’ye gelecek sıcaklıkta su ayarlanıp ependorf, köpüğe yerleştirilip çözdürüldü. Ardından kısa bir süreliğine vorteks yapıldı.
- nifH primeri 500 bp altında olduğu için (90 bp) Binding Buffer ile 1:1 oranında %100’lük isopropanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
- Solüsyonun 800 µl’si kolona yüklendi. 1 dakika 12 000 G’de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı kısım döküldü ve kolon aynı tüpe tekrar konuldu.
- Ürün sekansa gideceği için optimal seçenek uygulandı. Tekrardan 100 µl Binding Buffer eklendi. 1 dakika 12 000 G’de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı kısım döküldü ve kolon aynı tüpe tekrar konuldu.
- 700 µl Wash Buffer eklendi ve 1 dakika 12 000 G’de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Alt tüpte toplanan sıvı kısım döküldü ve kolon aynı tüpe tekrar konuldu.
- Wash Buffer kalıntılarından tamamen kurtulmak için aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi.
- Kolon temiz steril 1,5 mL’lik yeni bir ependorfa alındı. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi ve 1 dakika 12 000 G’de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- Elde edilen ürünün 5 µl’si agaroz jele yüklenerek görüntülenmesi gerçekleştirildi.

3.7. Transkriptom Analizi için RNA İzolasyonu

Transkriptom analizi ve *nifH* qPCR analizlerinde kullanılmak üzere glutamat, N₂ ve NH₄ besiyerlerinde çoğaltılan *C. sphaeroides* 'ten erken log fazında genç hücrelerden toplam RNA izolasyonları yapıldı. RNA izolasyonu için 48. saatte büyütülen glutamatlı örnek ve 24. saatte büyütülen N₂ ve NH₄ örnekleri (OD değerleri 0.5-0.6 olacak şekilde) kullanıldı. 5 mg lizozim içeren TES Buffer- lizozim çözeltisi hazırlandı ve bakterilerin parçalanması için ilk aşamada kullanıldı. İzolasyon için aşağıdaki basamaklar izlendi. Basamakların şematik çizimi 3.9'da gösterilmiştir.

- OD değeri 0.5-0.6 aralığına olan bakteriden steril 1,5 mL'lik ependorf tüpüne 1,5 mL bakteri eklendi ve 13000 rpm +4 °C'de 4 dakika santrifüjlendi ardından pellet hareket ettirilmeden dikkatli bir şekilde süpernatant atıldı.
- Her bir tüpteki pellete hazırlanan Lizozim+TES Buffer karışımından 25 µl eklendi ve karıştırıldı.
- Karışım oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi ve karışıma 5 dakikada bir pipetaj yapıldı.
- Karışım içerisine 1 mL TRI-Reagent eklenip, pipetaj yapıldı ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi.
- Ardından karışım içerisine 200 µl kloroform eklenip 15 saniye hafifçe karıştırıldıktan sonra (alt üst ederek) 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Sonrasında, karışım 13000 rpm +4 °C'de 17 dakika santrifüj yapıldı.
- Süpernatant RNA içermektedir. Süpernatant steril yeni bir 1,5 mL'lik ependorf tüpüne aktarıldı.
- Süpernatanta eşit hacimde etanol (%95-100) eklendi ve iyice karıştırıldı.
- NOT: 7. Basamakta genellikle 700 µl süpernatant toplanıp üzerine 8. basamakta 700 µl etanol eklendiği için total hacim 1400 µl olacağından 9. Basamak 2 kez tekrarlanır.
- ZYMO-spin IICG kolonuna karışımdan 700 µl alındı ve 13000 rpm +4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası flow arasında kalan sıvı döküldü.
- Önerilen: DNaz1
- 1. Kolona 400 µL RNA Wash Buffer eklendi ve 13000 rpm 26 °C'de 5 dakika santrifüjlendi.

- 2. Steril bir ependorf tüpüne 5 μ L DNazI ve 75 μ L DNA Digestion Buffer eklendi ve karıştırıldı. Karışım doğrudan kolon matrixine eklendi (bir örnek için totalde 80 μ L karışım kolon matrixine eklendi).
- 3. Ardından 15 dakika oda sıcaklığında oda sıcaklığında bekletildi.
- Önerilen 3. adımdan sonra kolona 400 μ L Directzol-RNA PreWash eklendi ve 13000 rpm 26 °C’de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası flow arasında kalan sıvı döküldü ve bu adım tekrarlandı.
- Kolona 700 μ L RNA Wash Buffer eklendi ve 13000 rpm 26 °C’de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası kolon dikkatlice steril bir ependorf tüpe aktarıldı.
- RNA’yı saflaştırmak için doğrudan kolon matrixine 50 μ L DNaz/RNaz Free Water eklendi ve 13000 rpm 26 °C’de 5 dakika santrifüjlendi.
- İzole edilen RNA örnekleri -20 °C’de saklandı.



Şekil 3.9 RNA izolasyon basamaklarının şematik gösterimi. Created in BioRender. Başütan, M. (2025) <https://BioRender.com/b20r211>

3.8. *NifH* Ekspresyon Analizi

Çalışmanın bu aşamasında üç farklı azot koşullarında çoğaltılan *C. sphaeroides* O.U.001'den *16S rRNA* geni referans gen olarak kullanılarak *nifH* gen ekspresyon analizi yapıldı. *nifH* geni hem FeMoco biyosentezi için katalitik elektron donörü olan Fe proteinin kodlanmasında hem de atmosferde serbest halde bulunan N₂'nin amonyağa çevrilmesinde çok önemli rol oynamaktadır. İlk aşama olarak qPCR analizini yapabilmek için üç farklı koşuldan izole edilen *C. sphaeroides* O.U.001, *nifH* ve referans gen olarak kullanacağımız *16S rRNA* primerleri kullanılarak cDNA'ya çevrildi. İkinci aşamada ise sentezlenen cDNA'lar kullanılarak qPCR analizi yapıldı. Bu aşamaların detayları diğer bölümlerde anlatılmıştır.

3.8.1. cDNA sentezi

cDNA sentez kiti olarak Jena Bioscience Script Reverse Transcriptase kullanılarak yukarıda bahsedilen gen ekspresyon analizlerinde kullanılacak *nifH* ve *16S rRNA*'dan cDNA'lar elde edildi. Üç farklı koşulda çoğaltılan *C. sphaeroides* O.U.001'ten optik yoğunluk (OD) değeri 0.5-0.6 aralığına geldiğinde total RNA izole edilerek cDNA sentezinde kullanıldı. Üç farklı koşuldan izole edilen RNA'ların 260/280 oranındaki konsantrasyonları farklı olmasından kaynaklı 1 µg RNA miktarları hesaplanarak cDNA basamakları gerçekleştirildi. Her bir cDNA sentez reaksiyonunda housekeeping (referans) gen olarak *16S rRNA* ve hedef gen *nifH* primerleri kullanıldı. Konsantrasyon miktarlarına göre reaksiyon içerikleri Tablo 3.10, 3.11 ve 3.12'de belirtilmiştir. İlk aşamada RNA'nın yapısında bulunan katlanmaların açılıp primerlerin bağlanabilmesi için hesaplanan 1 µg RNA miktarları üzerine 1 µl *nifH* primerleri ve gerekli su miktarları eklendikten sonra örnekler 70°C'de 5 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örnekler üzerine 5X reaksiyon tamponundan 4 µl, 10 mM dNTP (deoksinükleotid trifosfat) karışımından 1 µl, 1 µl DTT (Dithiothreitol) ve Revers transkriptaz enziminden de 1 µl eklendi ve pipetaj yapıldı. Ardından ilk aşamada örnekler 50°C'-60 dakika (1 saat) ve daha sonra 70°C-10 dakika boyunca ısı bloğunda inkübe edildi. Aynı işlemler referans gen olarak kullanılacak *16S rRNA* primerlerine de uygulanarak cDNA'lar hazırlandı.

Tablo 3.10 Glutamat için cDNA içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
RNA örneği	12
nifH/16s rRNA Primerleri	1
5x reaksiyon tamponu	4
10 mM dNTP karışımı	1
DTT	1
Revers transkriptaz enzimi	1
Son hacim	20

Tablo 3.11 N₂ için cDNA içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
RNA örneği	10,5
nifH/16s rRNA Primerleri	1
Su	1,5
5x reaksiyon tamponu	4
10 mM dNTP karışımı	1
DTT	1
Revers transkriptaz enzimi	1
Son hacim	20

Tablo 3.12 NH₄ için cDNA içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
RNA örneği	11
nifH/16s rRNA Primerleri	1
Su	1
5x reaksiyon tamponu	4
10 mM dNTP karışımı	1
DTT	1
Revers transkriptaz enzimi	1
Son hacim	20

3.8.2. Gerçek zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR, SYBR Green I dahil olmak üzere özel floresan boya ların kullanımıyla çift sarmallı DNA'ya bağlanan ve floresan yoğunluğunda yaklaşık 1000 kat

artışla gözlemlenmektedir. SYBR Green I boyası, dsDNA'ya bağlandığında floresans ışımaya yayar ve DNA konsantrasyonları ile orantılı olan floresans sinyalindeki artışın gerçek zamanlı PCR testlerinde ölçülmesine dayanır. Ayrıca tek bir (multipleks) reaksiyonda birden çok hedef genin saptanmasını ve miktarının belirlenmesini sağlayan farklı raportör boylarla etiketlenmiş problemler kullanılır (Nolan vd., 2006; Y. Wang vd., 2006). Uzama aşamasında primerler bağlanmaktadır ve hedef DNA çift zincirli hale gelmektedir. PCR'ın başlaması ile DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarının artmasından dolayı yayılan floresans miktarı da bununla birlikte artar. cDNA'ya çevirme aşamasından sonra tasarlanan primerler kullanılarak *nifH* ve referans gen *16S rRNA* genleri kullanılarak üç farklı koşulda çoğaltılan *C. sphaeroides* için qPCR analizi yapıldı. qPCR içeriği ve qPCR analizindeki program içeriği sırasıyla Tablo 3.13 ve Tablo 3.14'te verilmektedir.

Tablo 3.13 qPCR içeriği

İçindekiler	Hacim (µl)
2X SYBR-Green	10
ROX boya	0,4
R Primer	1
L Primer	1
cDNA örnekleri	2
dH ₂ O	5,6
Son hacim	20

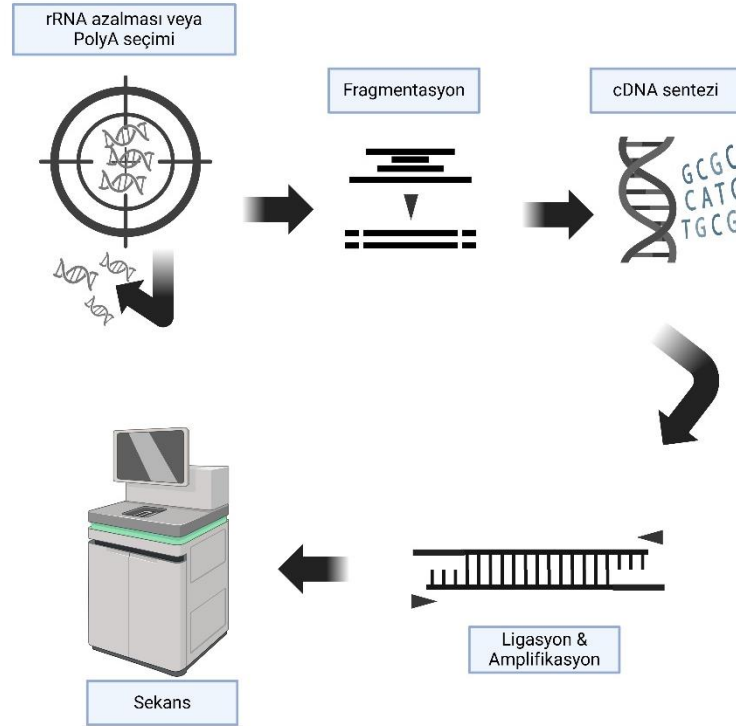
Tablo 3.14 qPCR program içeriği

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	40
Bağlanma	55	15 sn	40
Sentez	72	15 sn	40
Son sentez	72	5 dk	1

3.9. Numune Kalite Kontrol ve Kütüphane Hazırlığı

İzole edilmiş RNA materyaline ait kalite kontrol işlemlerinde florometrik ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılarak, miktar, saflık ve yapısal bütünlük tayini yapıldı. Ölçümlerde Qubit 3 florometresi (Thermo Fisher, ABD, #Q33216) ve 2100

Bioanalyzer (Agilent, ABD, #G2939BA) veya alternatif olarak 4200 TapeStation (Agilent, ABD, #G2991BA) kullanıldı. İzole edilmiş RNA materyalinin kütüphane hazırlığında, Illumina Total RNA Prep kiti (Illumina, ABD, #20040529) kullanıldı. Kütüphane iş akış şeması Şekil 3.10’da verilmiştir. Kit, tüm RNA içindeki ribozomal RNA’ların ortamdan arındırılması, kalan RNA’ların rastgele parçalanması ve ardından birincil ve ikincil cDNA zincirlerinin oluşturulması esasına dayanır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, ribozomal RNA arındırma, parçalama, RNA saflaştırma, cDNA sentezi, index ve barkod dizilerinin eklenmesi ve saflaştırma işlemleri üretici firmanın kit yönergeleri takip edilerek gerçekleştirildi.



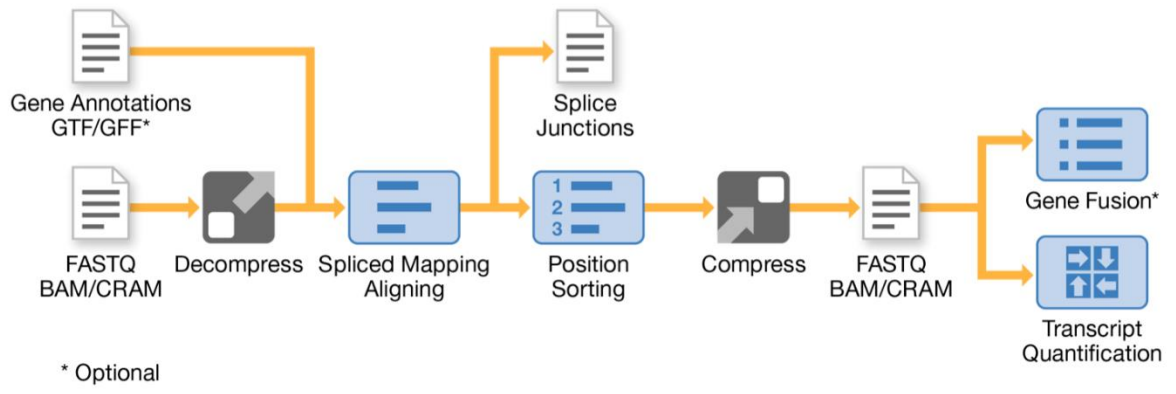
Şekil 3.10 Kütüphane Hazırlığı İş Akışı. Created in BioRender. Başütan, M. (2025)
<https://BioRender.com/e23a875>

Dizileme çalışmasında Illumina NovaSeq 6000 yeni nesil dizileme platformu kullanıldı. Bu basamakta örnek başı ortalama 30 milyon adet 150 bp uzunlukta çift yönlü (paired-end) okuma elde edilmesi planlandı. Kütüphane ölçümü, seyreltme ve yükleme işlemleri, üretici firmanın ilgili yönergeleri takip edilerek gerçekleştirildi.

3.10. Biyoinformatik Analiz

Dizileme işlemi sonrasında, elde edilen okuma verilerinin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı kullanıldı. Kalite kontrol sonuçlarına göre her bir örneğin, veri miktarları, okuma kaliteleri, GC dağılımları, kmer dağılımları, olası adaptör kontaminasyonları incelendi. Dizileme sürecinde, ham okuma verilerindeki düşük kalitedeki baz okumaları ve olası adaptör-indeks kontaminasyonlarının sonraki analiz basamaklarında sapmalara neden olmaması için, okumalardan kırıldı. Kalite değerlerine göre kırma işlemleri için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanıldı (Bolger, Lohse, and Usadel 2014).

Kırma sonrasında eldeki diziler, Illumina DRAGEN Bio-IT platformu ve RNA Pipeline iş akışı kullanılarak analiz edildi. Genel süreç ve basamaklar Şekil 3.11’de gösterilmiştir. Bu analiz sürecinde, okumalar, seçilen genom kırılma bölgeleri dikkate alınarak (splice-aware) hizalama gerçekleştirildi. Bu uygulamada referans genom olarak ilgili organizmanın güncel referans genomu (*Cereibacter sphaeroides KD131 genome assembly ASM2100v1*) kullanıldı. Hizalama sonrası anotasyonunda gen, ekzon ve transkript bilgileri için ASM2100v1 veriseti kullanıldı. Bu işlem sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplanmış ve ardından ilgili transkriptin uzunluğuna göre normalize edilerek RPK (Reads per Kilobase) değerleri elde edildi. Bu değerler ardından toplam okuma sayısına göre tekrar normalize edilerek TPM (Transcripts Per Million) değerleri çıkarıldı. Normalizasyon sonrasında, gruplar arası anlatımı değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için edgeR R paketi (Robinson, McCarthy, and Smyth 2010) ve Quasi-Likelihood modeli kullanıldı. Gen ontoloji analizinde TopGO paketi (Alexa and Rahnenfuhrer 2021) ve Kolmogorov-Smirnov (KS) istatistiksel testi kullanıldı. Yolak analizlerinde clusterProfiler paketi kullanıldı (Yu vd., 2012). Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmalarının düzenlenmesi, veri görselleştirme uygulamaları ve rapor oluşturulmasında R betikleri kullanıldı.



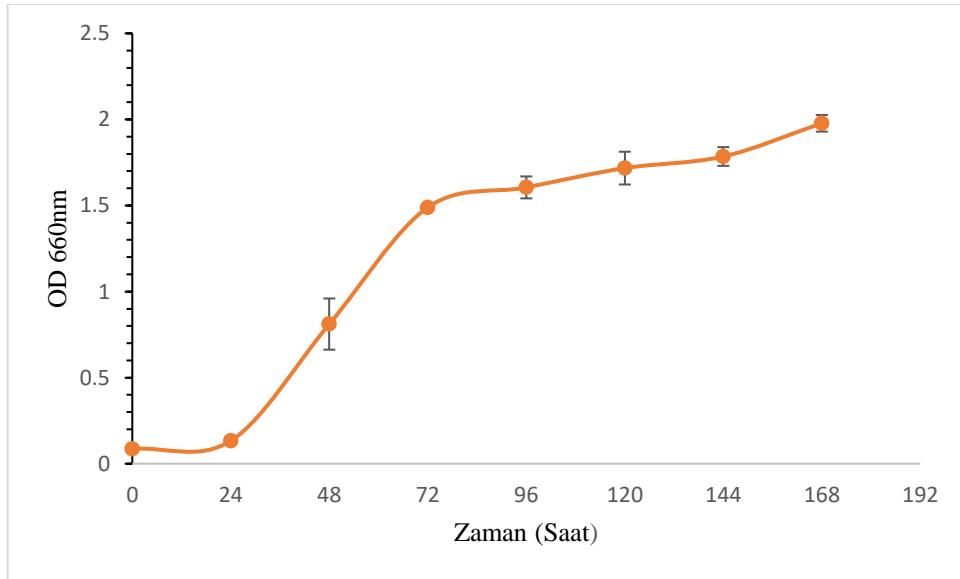
Şekil 3.11 Biyoinformatik analiz iş akışı

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

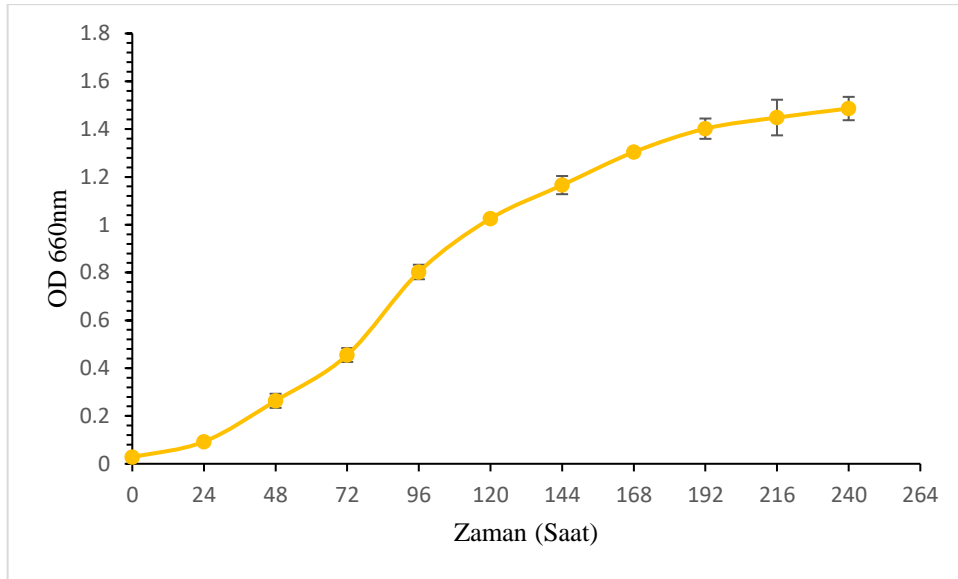
4.1. Büyüme Eğrileri (OD) ve pH Analizleri

4.1.1. Büyüme eğrileri (OD)

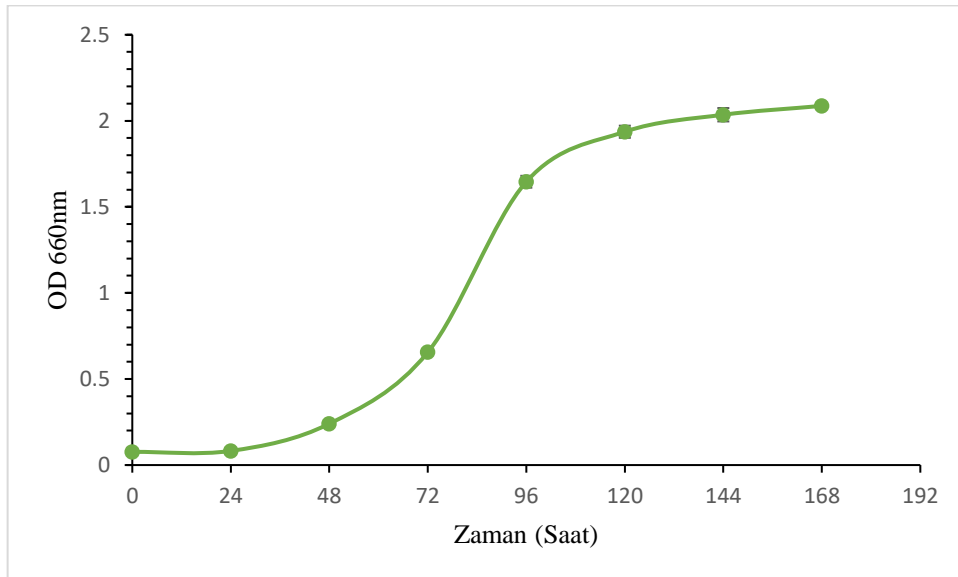
Kullanılan azot kaynağının farklılığına bağlı olarak 3 ortamda da büyütülen bakterilerin büyüme sırasında optik yoğunluk (OD) değerleri farklılık gösterdi. Hazırlanan her bir besiyerinde çoğaltılan bakteri kültürlerinin optik yoğunlukları her 24 saatte bir 660 nm’de spektrofotometre ile ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için her bir deney seti üç tekrarlı yapıldı ve hata çubukları grafiklere eklendi. Şekil 4.1’de *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864) ’in azot kaynağı için glutamat karbon kaynağı olarak malatın kullanıldığı besiyerinde OD değerlerinin grafik eğrisi, şekil 4.2’de azot kaynağı için N₂ gazının karbon kaynağı için ise malatın kullanıldığı besiyerinde OD değerlerinin grafik eğrisi, şekil 4.3’te azot kaynağı için NH₄ karbon kaynağı olarak ise malatın kullanıldığı besiyerinde OD değerlerinin grafik eğrisi zamana bağlı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Zamana bağlı Glutamat besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in büyüme eğrisi (n=3)



Şekil 4.2 Zamana bağlı N₂ besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in büyüme eğrisi (n=3)



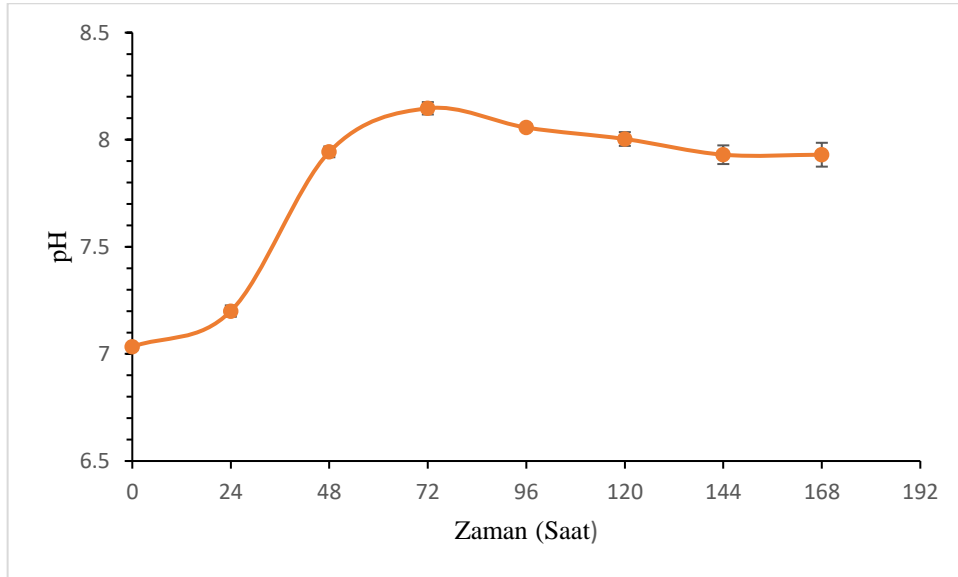
Şekil 4.3 Zamana bağlı NH₄ besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in büyüme eğrisi (n=3)

Bu üç farklı ortamda büyüyen bakterilerin optik değerleri karşılaştırıldığında Amonyumlu (NH₄) büyüme ortamlarında, glutamatlı ortama kıyasla daha fazla optik yoğunluk gözlemlendi. Her bir ortamda *C. sphaeroides*'in maksimum optik yoğunluk değerleri sırasıyla glutamat:1,97±0,04, N₂:1,50±0,04 ve NH₄:2,08±0,008 kaydedildi. Optik yoğunluk değerleri göz önünde bulundurulduğunda glutamat besiyerinde çoğalan bakteriler 96. saatten sonra, N₂ besiyerinde çoğalan bakteriler 192. Saatten sonra ve NH₄ besiyerinde çoğalan bakteriler 120. Saatten sonra durağan faza girmiştir. Sonraki aşamalarda yapılması planlanan RNA izolasyonu log fazındaki hücrelerden seçilerek

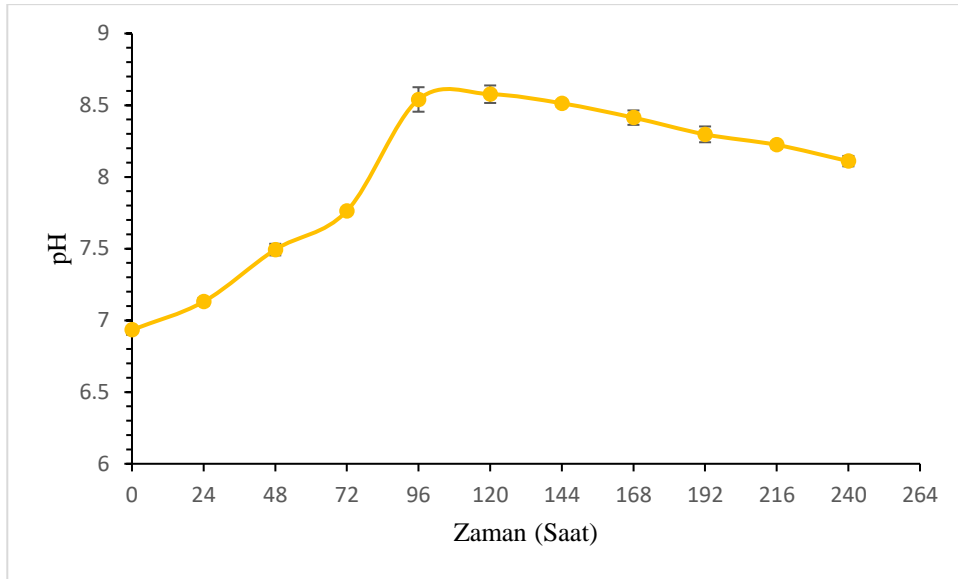
yapıldı. Büyüme eğrileri bu amaçla oluşturuldu. Log fazı bakterilerin metabolik olarak en aktif olduğu faz olup çoğunlukla genç hücrelerden oluşmaktadır. Bu hücrelerden elde edilecek RNA örneklerinin metabolik zenginliği yansıtacağı düşünülmektedir. Farklı azot kaynaklarında büyütülen bakterilerin 660 nm'deki spektrofotometre değerleri göz önüne alınıp optik yoğunluğu (OD) 0.5-0.6 aralığına ulaştığında RNA izolasyonu yapıldı.

4.1.2. pH analizleri

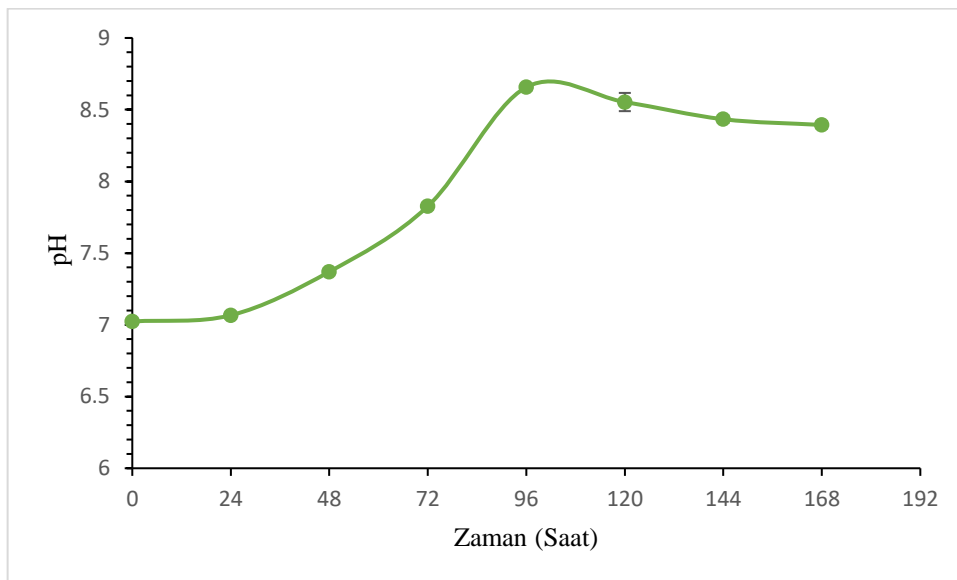
Deney başlangıcında her bir besiyer ortamının pH'ı 6.8 olarak ayarlandı ve bakterilerin büyümesi durağan fazdan ölüm fazına geçene kadar her 24 saatte bir örnek alınarak pH metre ile değerleri ölçülerek takip edildi. Tez kapsamında istatistiksel açıdan anlamlılık olması için pH deneyi 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirildi ve hata çubukları grafiklere eklendi. Şekil 4.4'te *C. sphaeroides* O.U.001 (DSM 5864)'in azot kaynağı için glutamat karbon kaynağı için malatın kullanıldığı besiyerinde pH değerlerinin grafik eğrisi, Şekil 4.5'te azot kaynağı için N₂ gazının karbon kaynağı için ise malatın kullanıldığı besiyerinde pH değerlerinin grafik eğrisi, Şekil 4.6'da azot kaynağı olarak NH₄ karbon kaynağı için ise malatın kullanıldığı besiyerinde pH değerlerinin grafik eğrisi zamana bağlı olarak gösterilmiştir.



Şekil 4.4 Zamana bağlı Glutamat besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in pH değerleri (n=3)



Şekil 4.5 Zamana bağlı N₂ besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in pH değerleri (n=3)



Şekil 4.6 Zamana bağlı NH₄ besiyerinde büyütülen *Cereibacter sphaeroides*'in pH değerleri (n=3)

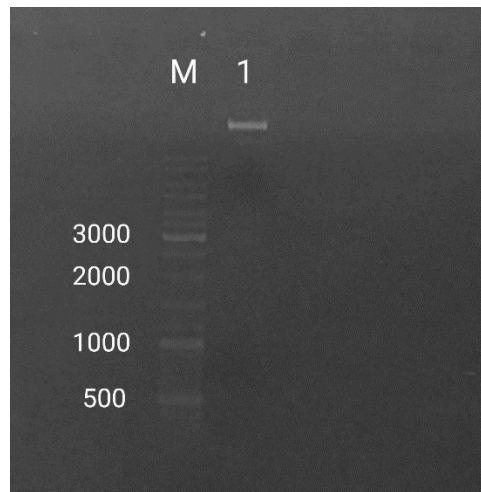
pH grafik eğrileri incelendiğinde glutamat besiyerinde pH değerinin ortalama $8,05 \pm 0,05$ 'e kadar yükseldiği, NH₄ besiyerinde $8,39 \pm 0,025$ 'e kadar yükseldiği ve N₂ besiyerinde $8,41 \pm 0,10$ 'e yükseldiği gözlemlendi. Bu sonuçlara göre azotun amonyağa çevrildiği koşulda ve ortam da hazır halde bulunan NH₄ koşulunda biriken amonyum miktarı glutamat koşuluna göre daha fazladır.

4.2. DNA İzolasyonu ve Tür Validasyonu

DNA izolasyonu manuel şekilde gerçekleştirildi. İzole edilen DNA örneği öncelikle bakterinin *C. sphaeroides* olduğunu konfirme etmek için tür tanımlanmasında kullanılmak üzere kullanıldı. Dizileme hizmeti Ankara-BM Laboratuvar Sistemlerinden yapıldı. Daha sonra tasarlanan primerlerin validasyonu için PCR yapıldı. Elde edilen DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümleri Tablo 4.1'de verilmiştir. İzole edilen bakterinin agaroz jel görüntüsü ise şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 *Cereibacter sphaeroides*'ten elde edilen DNA'nın saflık ve konsantrasyon ölçümleri

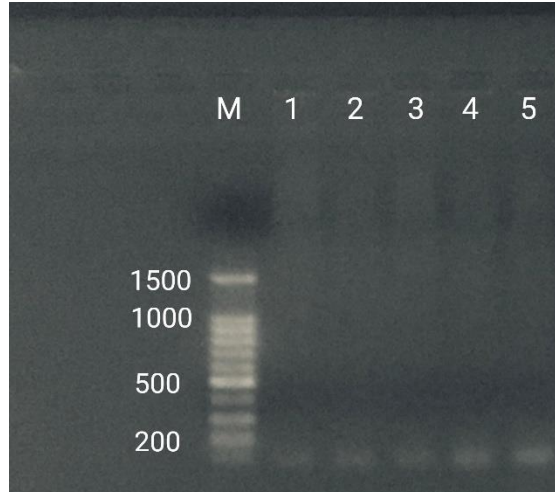
Örnek	Konsantrasyon (µg/ml)	260/280 nm	260/230 nm
<i>C. sphaeroides</i>	89,60	1,1440	0,24070



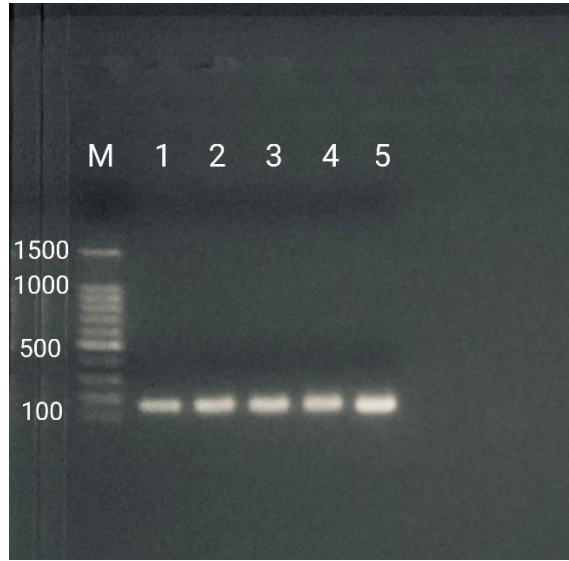
Şekil 4.7 DNA izolasyon sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1: DNA M: 10000 bp'lik RNA markırı

İzole edilen DNA'nın agaroz jelde görüntülenmesi gerçekleştikten sonra bakteri türünün validasyonu için PCR aşamasına geçildi. Örneklerin konsantrasyonunu artırmak için PCR çok tekrarlı şekilde yapıldı. PCR sonucunda elde edilen ürünler daha sonra agaroz jelde görüntülendi. Jele DNA merdiveni de (SiZer™-100 DNA Marker Solution) yüklenerek elde edilen ürünlerin boyu tespit edildi. Jel görüntü sonuçlarına göre *nifH* PCR ürünü 90 bp (Şekil 4.8) ve 16S rRNA PCR ürünü ise 146 bp (Şekil 4.9) de görüntülendi ve PCR sonucunda ise her bir PCR ürünü beklenen uzunlukta gözlemlendi. PCR ürünleri dizileme sonuçlarında 16S rRNA ve *nifH* PCR ürünlerinin *C. sphaeroides*'e ait olduğu NCBI Blast analizi ile anlaşıldı. Kullanılan bakterinin *C. sphaeroides* olduğu

kesinleştikten sonra RNA-Seq analizi için deneylere başlandı.



Şekil 4.8 *nifH* PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1, 2, 3, 4, 5: 90 bp M: 100 bp'lik DNA markırı



Şekil 4.9 16s rRNA PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Sütun 1, 2, 3, 4, 5: 146 bp M: 100 bp'lik DNA markırı

Şekil 4.8 ve 4.9 PCR sonuçlarıyla birlikte tasarlanan primerlerin validasyonu gerçekleştirilmiştir ve doğrulanmıştır. Bu çalışmanın amacı, RT-PCR öncesinde primerlerin işlevselliğini doğrulamak amacıyla genomik DNA kullanılarak PCR yapılmasıdır. Doğrulan primerler son aşama olan üç farklı azot kaynağında büyütülen *C. sphaeroides*'in *nifH* ekspresyon analizlerinde kullanılı.

4.3. RNA izolasyonunun Spektrofotometrik Ölçüm Sonuçları

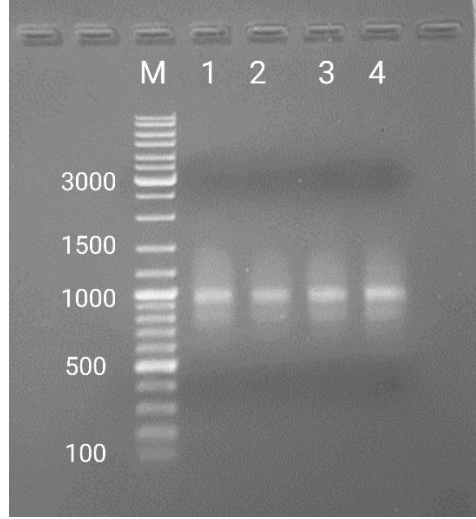
‘ZYMO Research’ kiti kullanılarak farklı azot kaynaklarında büyütülen *C. sphaeroides*’ten izole edilen RNA’nın miktar ve kalitesi Tablo 4.2’de verilmiştir. RNA konsantrasyon belirleme çalışmalarında OD₂₆₀/OD₂₈₀ oranının 1,8 ila 2,1 arasında olması, saf RNA'nın varlığını ve protein kontaminasyonunun minimum seviyede olduğunu gösterir.

Tablo 4.2 *Cereibacter sphaeroides*’ten izole edilen RNA’nın miktar ve kalitesi

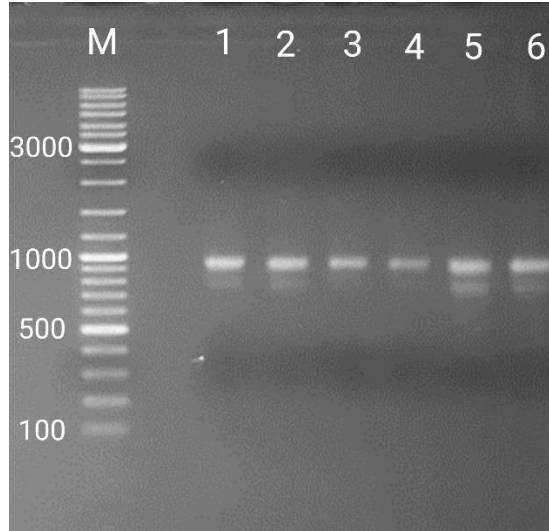
Besiyeri çeşitleri	OD ₂₆₀ / OD ₂₈₀	Konsantrasyon (µg/mL)
Glutamat-3	2,018	36,90
Glutamat-4	2,025	25,96
Glutamat-5	2,025	39,35
N ₂ -1	2,097	61,80
N ₂ -2	1,748	66,37
N ₂ -3	2,061	60,24
NH ₄ -4	2,088	36,98
NH ₄ -7	2,117	36,82
NH ₄ -9	2,076	46,94

4.4. Transkriptom Analizi için RNA İzolasyonu

‘ZYMO Research Direct-zolTM RNA Miniprep Plus’ kiti kullanılarak üç farklı azot kaynağında büyütülen *C. sphaeroides*’ten RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası örnekler jele RNA merdiveni ile (Thermo GeneRuler SM0333-10000 DNA Marker Solution) birlikte yüklendi ve görüntüledi. N₂ besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.10’da, NH₄ (1-2-3 kuyucuk) ve glutamat (4-5-6 kuyucuk) besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü ise Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.10 N₂ besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1, 2, 3, 4: N₂ örneği M: 10000 bp'lik RNA markırı.



Şekil 4.11 NH₄ ve Glutamat besiyerinde büyütülen bakterilerden izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü. Sütun 1, 2, 3: NH₄ örneği; sütun 4, 5, 6: Glutamat örneği M: 10000 bp'lik RNA markırı.

Yukarıda verilen agaroz jel görüntü sonuçlarına göre RNA bantları istenilen aralıkta elde edildi. Daha sonra transkriptomik analizi için Ankara-RefGen Biyoteknoloji firmasından hizmet alımı yapıldı.

4.5. Transkriptomik Analiz Sonuçları

İzole edilmiş RNA materyaline ait kalite kontrol işlemlerinde florometrik ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılarak, miktar, saflık ve yapısal bütünlük tayini yapıldı. Dizileme işlemi sonrasında, çalışma kapsamında 3 farklı koşul için 9 farklı

numunenin RNA dizilemesi gerçekleştirildi. Kalite kontrol sonuçlarına göre aşağıdaki Tablo 4.3'te ilgili örneklerin adları, deney grupları, dizileme sonucunda elde edilen okuma sayıları ve bu okumaların ne kadarının genoma hizalandığı yer almaktadır. “Toplam” sütunu numuneden elde edilen toplam okuma sayısını; “Hizalanan” sütunu genoma hizalanan okumaların sayısını; “Hizalanmayan” sütunu genoma hizalanamayan okumaların sayısını; “Q30 Kalite Oranı” Q30 ve daha üstünde Phred kalite skoru alan okumaların oranını ve “Hizalama Oranı” sütunu ise genoma hizalanan okumaların oranını belirtmektedir.

Tablo 4.3 Çalışılan örneklerle ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri

	Toplam Okuma Sayısı	Hizalanan Okuma Sayısı	Hizalanmayan Okuma sayısı	Q30 Kalite Oranı	Hizalama Oranı
Glutamat					
Glutamat-3	34.528.868	27.812.875	6.715.993	% 95.60	% 80.55
Glutamat-4	28.372.532	22.635.623	5.736.909	% 95.00	% 79.78
Glutamat-5	51.911.164	42.933.344	8.977.820	% 95.61	% 82.71
N₂					
N ₂ -1	29.685.228	25.260.824	4.424.404	% 95.57	% 85.10
N ₂ -2	38.189.774	31.658.321	6.531.453	% 95.74	% 82.90
N ₂ -3	29.469.176	24.853.400	4.615.776	% 95.24	% 84.34
NH₄					
NH ₄ -4	29.789.082	25.939.490	3.849.592	% 95.54	% 87.08
NH ₄ -7	31.076.570	25.882.521	5.194.049	% 95.52	% 83.29
NH ₄ -9	32.294.234	27.163.696	5.130.538	% 95.49	% 84.11

Yukarıda verilen tabloya göre en yüksek toplam okuma Glutamat-5 (51.911.164) ile elde edilmiş ve hizalama oranı %82,71'dir. Bu örneğin Q30 kalite oranı %95,61 ile diğer Glutamat grupları arasında en yüksek kaliteye sahip olduğunu göstermektedir. Genel olarak Glutamat grubu, %95 ve üzerinde Q30 kalite oranına sahip olsa da hizalama oranları %79-83 arasında değişmektedir. N₂-2, en yüksek toplam okuma sayısı (38.189.774) ve %82,90 hizalama oranıyla diğer N₂ gruplarına göre yüksek bir kalitededir. N₂ grubu genelinde Q30 kalite oranı %95 civarında ve hizalama oranları %82-85 arasında değişiyor bu da grubun genel olarak yüksek kalite oranına sahip olduğunu göstermektedir. NH₄ grubunda ise en yüksek toplam okuma NH₄-9 (32.294.234) örneğinde kaydedildi ve hizalama oranı %84,11'dir. NH₄ grubu, %95,4'ün üzerinde bir Q30 kalite oranına sahip ve hizalama oranları %83-87 arasında değişiyor. Bu da grubun yüksek kaliteli ve iyi hizalanan bir veri sağladığını göstermektedir. Bütün gruplar yüksek Q30 kalite oranlarına (genellikle %95 ve üzeri) sahip ve bu da verinin güvenilir olduğunu kanıtlamaktadır. Burada bahsedilen Q30 kalite oranı ise okunmuş

bazların veya DNA diziliminin ne kadar doğru olduğunu ifade etmektedir. Q30 hata oranı bir bazın yanlış okuma olasılığının 1/1000 (yani %0,1) olduğu anlamına gelmektedir.

4.5.1. Filtreleme ve normalizasyon

RPKM (Transkriptin kilobazı başına milyon eşleşen okuma sayısı) ve TPM (Milyon başına transkript sayısı) değerleri bir örnekteki her bir genin veya transkriptin göreceli şekilde çokluğunu gösterir. Karşılaştırılan örnekler arasında toplam RNA miktarının eşit veya RNA türlerinin dağılımı birbirine yakın olduğu zaman RPKM ve TPM'nin doğrudan karşılaştırılması anlamlı sonuçlar vermektedir (S. Zhao vd., 2020). Genlerin büyük çoğunluğunun düşük okuma sayısına sahip olduğu görülmektedir (Şekil 4.12). Dağılımın çoğu, düşük RPK değerlerinde (10 veya altında) yoğunlaşmaktadır. Eğrilerin geneli düşük RPK seviyelerinde benzer bir yoğunluk sergilemektedir. Bu da genlerin büyük kısmının düşük ifadeye sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.12 Ham ve normalize edilmiş verilerdeki tüm transkriptlerin TPM (Transcripts per million) dağılımları

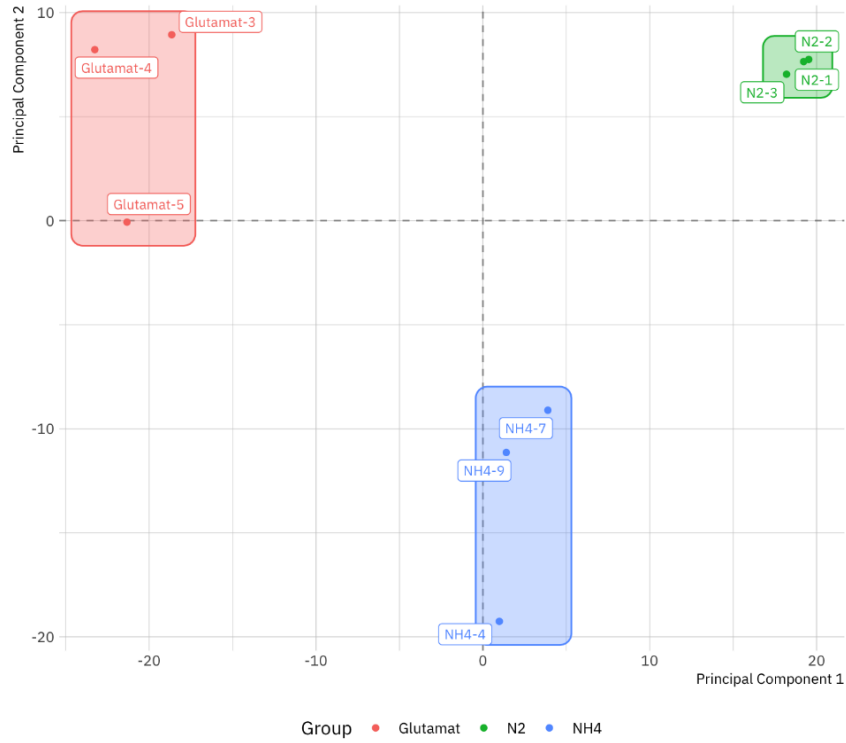
TPM değerleri RPK değerlerine göre daha sıkı bir şekilde normalize edildiğinden daha belirgin bir pik görülmektedir. TPM değerlerinin de genellikle düşük bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir fakat her grupta bulunan gen ifade seviyeleri genellikle birbirine yakındır. Bu da gruplar arasındaki genlerin benzer ifadelere sahip olduğunu göstermektedir. Her iki dağılımda da düşük ifadelere sahip transkriptler baskın

gözükmemektedir fakat TPM grafiğinde okuma sayıları daha normalize edilmiş ve düzgün bir dağılım sergilemektedir.

4.5.2. Temel bileşen analizi (Principal Component Analysis, PCA)

Büyük veri kümeleri çoğu disiplinlerde yaygın bir şekilde kullanılır hale gelmiştir. Bu tür veri kümelerini yorumlayabilmek için verilerdeki bilgiyi büyük ölçüde koruyarak boyut sayısını azaltan ve daha kolay yorumlanabilir hale getiren yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla veri kümeleme için birçok teknik geliştirilmiştir fakat temel bileşen analizi (PCA) eski olmasına rağmen en yaygın kullanılanlardan birisidir. Temel bileşen analiz (Principal Component Analysis, PCA) grafiği, numuneler arasında ön bilgi olmadan (unsupervised analysis) benzerlikler ve farklılıkların görselleştirilmesini sağlar. Böylece ileri analizler gerçekleştirilmeden önce diferansiyel ekspresyonun ne ölçüde tespit edilebileceği hakkında fikir sahibi edinilir (Jolliffe & Cadima, 2016).

Şekil 4.13'te analiz edilen örneklerde en fazla varyasyon gösteren ilk 500 gen dikkate alındığında PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki örneklerin dağılımları görülmektedir.



Şekil 4.13 Örneklerin PCA sonrası PC1 ve PC2 düzlemindeki dağılımları

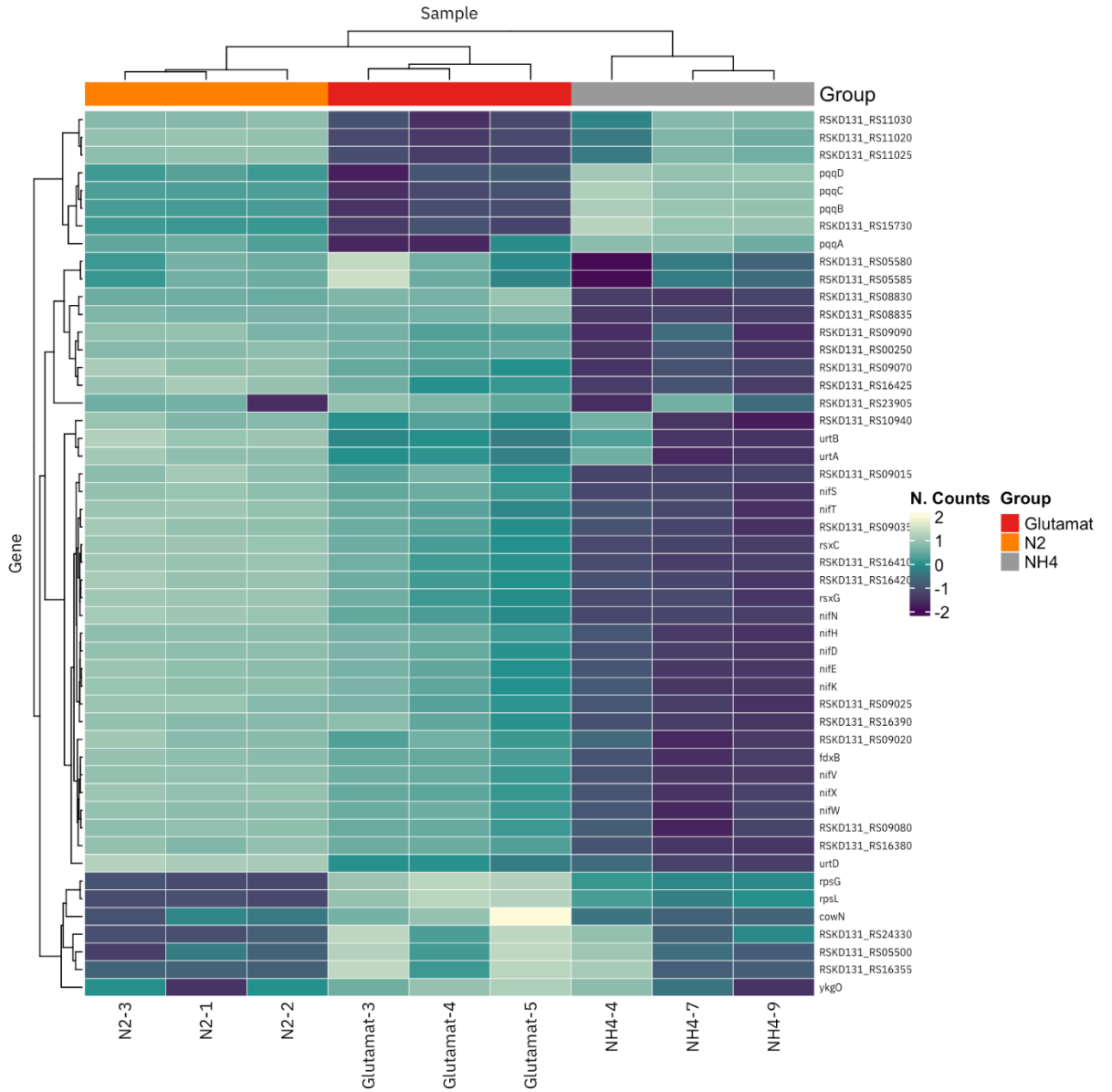
Düzlemdeki dağılımlar incelendiğinde glutamat grubu (Glutamat-3, Glutamat-4, Glutamat-5) örnekleri birbirine oldukça yakın gözükmetedir yani bu gruptaki örnekler gen ifadesi açısından birbirine çok benzemektedir. Glutamat örnekleri gibi N₂ grubu (N₂-1, N₂-2, N₂-3) da kendi içinde sıkı bir kümelenme göstermektedir yine bu da gruptaki örneklerin gen ifadesinin oldukça benzer olduğunu göstermektedir. Diğer iki grup gibi NH₄ grubu (NH₄-4, NH₄-7, NH₄-9) da incelendiğinde NH₄ örnekleri de benzer şekilde kümelenmiş ve bu gruptaki örnekler arasında da benzer bir gen ifadesi olduğunu göstermektedir. Grupların kendi içinde kümelenmesi başlangıç RNA örneklerinin ve her bir grup için yapılan işlemlerin tutarlı olduğunu ispatlamaktadır.

Glutamat, N₂ ve NH₄ grupları, gen ifadesi bakımından oldukça farklılık göstermektedir. Her bir grup kendi içinde sıkı bir kümelenme gösterdiği için bu üç koşulun biyolojik olarak farklı olduğu sonucuna varılabilir. Özellikle Glutamat ve NH₄ grupları hem PC1 hem de PC2 eksenlerinde oldukça ayrı bölgelerde yer almaktadır ve bu da genler arasında büyük farklılıklara işaret etmektedir.

4.5.3. Isı grafiği (Heatmap)

Isı haritası (heatmap), sütunlar ve satırların alt kümelerinin paylaşılması ile birbirine benzer ifadeleri ortaya çıkarmak için istatistiksel açıdan görsellik sağlamak adına kullanılan bir yöntemdir. İfadeler arasında kümelemeler oluşturarak dendrogramların çizimine kolaylık sağlar (Gu, 2022).

Şekil 4.14'te yer alan ısı grafiği (heatmap), örnekler arasında en fazla ekspresyon ve varyasyon gösteren ilk 50 genin ekspresyon profillerini göstermektedir. Isı grafiğinde yer alan 3 koşulda da farklılık oluşturan genler, profil benzerliklerine göre her iki eksende kümelenmiş bir şekildedir ve benzerliklerine göre de dendrogramlar ile ayrılarak görselleştirilmiştir. Bu gruplama örneklerin birbirine ne kadar benzer ekspresyon profili gösterdiğine göre ayrıldı. Yakın gruplandırılmış örnekler, daha benzer profil göstermektedir. Benzer şekilde, ısı grafiğinin sol kısmında yer alan dendrogramda, tüm örnekler dikkate alındığında ilk 50 genin birbirine ne kadar benzer ekspresyon profili gösterdiğine göre gruplandırıldı. Bu grafikte gösterilen genler protein kodlayan genlerdir.



Şekil 4.14 Örnekler arasında en fazla varyasyon gösteren 50 genin ekspresyon profili

Bu ısı haritası, üç farklı gruptaki (Glutamat, N₂, NH₄) gen ekspresyon düzeylerini göstermektedir. Haritadaki her renk tonu, her genin bu üç grup arasındaki ekspresyon düzeylerini göstermektedir. Haritanın solunda görülen dendrogram gösterimi ise benzer ekspresyon profillerine sahip genlerin kümelendiğini ifade etmektedir.

Analiz sonucu, elde edilen ısı grafiği farklı azot kaynaklarının hücredeki gen ifade profiline nasıl etki ettiğini anlamamıza yardımcı olmaktadır. Her grubun farklı gen ifadelerine sahip olması, hücrelerin farklı azot kaynakları altında meydana gelen adaptasyon değişiklikleri hakkında bilgi vermektedir. Glutamat grubunda bulunan genlerin ifadesi diğer gruplardan farklılık göstermektedir. Glutamat azot açısından zengin

bir ortamdır bu yüzden azot metabolizmasıyla ilgili genlerin ifade seviyeleri düşüktür. NH_4 (amonyum) ortamında, hücrelerin doğrudan amonyum alımı yapması nedeniyle azot fiksasyonuna gerek kalmamaktadır. Bu durumda başta *nif* genlerinin ifadesi olmak üzere çoğu genin de ifade seviyelerinde düşüklük gözükmemektedir. Çünkü azot zaten kullanılabilir formdadır. Tam tersi N_2 koşulunda ise azot fiksasyonu yapan genler (örneğin *nif* genleri) yüksek ifade seviyesine sahiptir. Çünkü hücre atmosferik azotu (N_2) biyolojik olarak kullanılabilir bir form olan amonyağa (NH_4) dönüştürmektedir.

Haritanın sağında bulunan *nif* genleri (*nifS*, *nifH*, *nifD*, *nifE*, *nifK*, *nifN*, *nifV*, *nifW*), azot fiksasyon sürecinde önemli bir rol oynayan nitrojenaz enzim kompleksinin alt birimlerini ve yardımcı proteinleri kodlamaktadır. Azot fiksasyonunda rol oynayan genlerin isimleri ve görevleri Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Azot fiksasyonunda rol alan genlerin 3 farklı koşula göre ekspresyon değerleri ise Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.4 Azot fiksasyonunda rol alan genler ve görevleri

Gen	Görevleri
1. <i>nifW</i>	Nitrojenaz dengeleyici/koruyucu protein
2. <i>nifV</i>	Homositrat sentaz
3. <i>nifS</i>	Sistein desülfüraz
4. <i>fdxB</i>	Ferredoxin III, <i>nifE</i> özgülü
5. <i>fdxC</i>	Ferrodoksin
6. <i>nifX</i>	Azot fiksasyon proteini
7. <i>nifN</i>	Nitrojenaz demir-molibden kofaktör biyosentez proteini
8. <i>nifE</i>	Nitrojenaz demir-molibden kofaktör biyosentez proteini
9. <i>nifK</i>	Nitrojenaz molibden-demir protein alt birimi beta
10. <i>nifD</i>	Nitrojenaz molibden-demir protein alfa zinciri
11. <i>nifH</i>	Nitrojenaz demir proteini
12. <i>nifT</i>	Azot fiksasyon proteini
13. <i>nifB</i>	Nitrojenaz kofaktör biyosentez proteini
14. <i>nifA</i>	Nif-spesifik transkripsiyonel aktivatörü

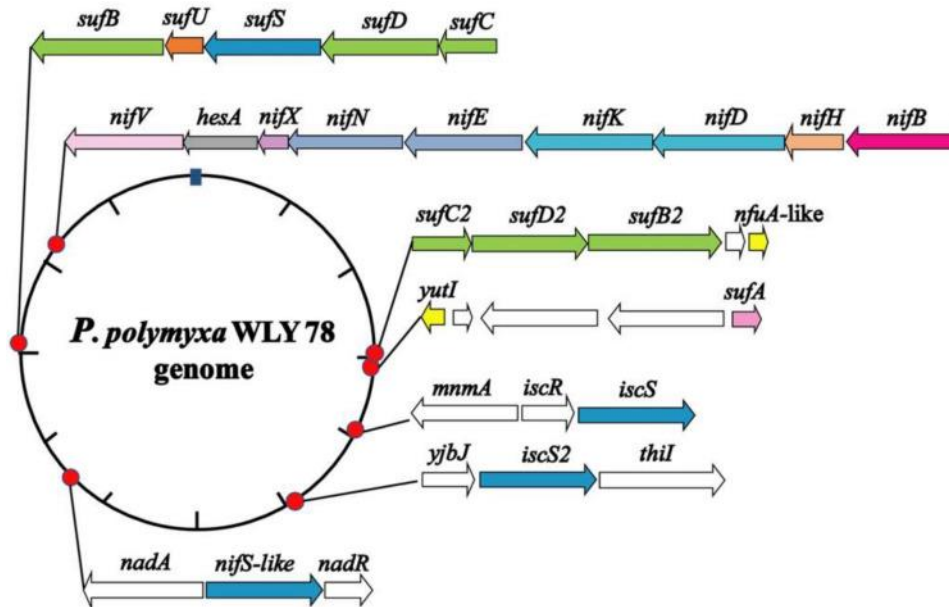
Tablo 4.5 Azot fiksasyonunda rol alan genlerin 3 farklı koşula göre ekspresyon değerleri

Gen	Glutamat	N ₂	NH ₄
<i>nifW</i>	142.8236667	402.966	2.233666667
<i>nifV</i>	57.778	150.0006667	1.373
<i>nifS</i>	37.56633333	90.63933333	1.460333333
<i>fdxB</i>	225.0063333	635.5936667	5.636
<i>fdxC</i>	40.20233333	64.22933333	7.066666667
<i>nifX</i>	101.5413333	458.562	1.234
<i>nifN</i>	14.10866667	59.95066667	0.257
<i>nifE</i>	21.788	47.615	1.075666667
<i>nifK</i>	769.5326667	2767.926333	7.414
<i>nifD</i>	1040.016333	3327.063	6.096666667
<i>nifH</i>	2187.957667	6923.590333	14.588
<i>nifT</i>	176.1126667	598.36	11.69833333
<i>nifB</i>	18.799	66.64466667	2.298
<i>nifA</i>	126.1353333	252.3943333	63.25566667

Bu genlerden *nifD* azot fiksasyonu yapan canlılarda da tespit edilmiştir. Örneğin, *Geobacter metallireducens* ve *Geobacter sulfurreducens*'in de azot fiksasyonu yapabildiği gösterilmiştir (Holmes vd., 2004). *nifD* geni bu bakterinin bütün türlerinde rastlanmıştır ve azot fiksasyonu için önemlidir. Azot sınırlı ortamlarda ortama uyum sağlama özellikleri vardır ve azot fikse etme yetenekleri bakterinin yer altında bulunan çeşitli metallerin ve organik bileşiklerin biyoremediasyonunda rekabet etmesine olanak sağlar. İncelenen 30 *Geobacteraceae* türlerinde *nifD* geni bulunurken *Shewanella oneidensis* ve *Desulfovibrio vulgaris* gibi bakterilerin genomlarında ise *nifD* geni bulundurmamaktadır. Bu da bize azot fikse etme özelliklerinin olmadığını göstermektedir. Bu nedenle bu genlerin ifade seviyeleri azot kaynaklarının değiştiği koşullara bağlı olarak artabilmekte veya azalabilmektedir. Özellikle N₂ ortamında bu genlerin ifadesinin yüksek olması atmosferik azotun amonyağa dönüştürülmesi sürecinin aktif olduğunu göstermektedir (Holmes vd., 2004).

Haritada bulunan *nifS* geninin üç farklı azot koşulundaki ekspresyon karşılaştırması yapıldığında NH₄ koşulunda ekspresyonun düşük olduğunu, glutamat koşulunda ekspresyonun daha değişmeden kaldığını N₂ koşulunda ise ekspresyonda bir artış olduğu gözükmemektedir bu da *nifS* geninin azot fiksasyonunda görev aldığını göstermektedir. Li ve arkadaşları ile Zhao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalar da buna

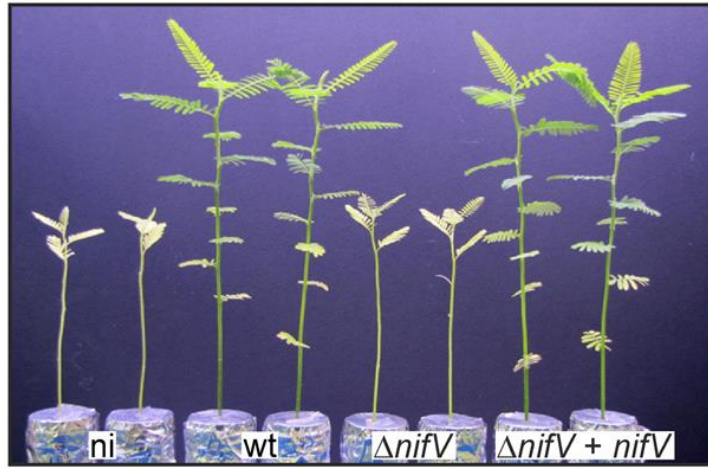
destek verici şekildedir (Li vd., 2021; Zhao vd., 2007). Nitrojenaz enzim sisteminde rol alan *nifS* [Fe-S] küme oluşumuna kükürt sağlamak için L-sistein yapısının kükürten uzaklaştırmasını katalize eden piridoksal fosfat içeren bir enzimdir. *nifU* geni ise [Fe-S] kümesinin birleşimi için *nifS* tarafından yönlendirilen moleküler bir yapı görevi görür. Çalışmada kullanılan *Paenibacillus polymyxa* WLY78, gram pozitif ve N₂ sabitleyici bir bakteridir. Genomunda *nifB*, *nifH*, *nifD*, *nifK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *hesA* ve *nifV* genlerini bulundurmaktadır fakat *nifS* ve *nifU* genlerini bulundurmamaktadır (*Paenibacillus polymyxa* WLY78'in *nif* genlerinin genomik konumu ve Fe-S kümesinin oluşumunda rol alan genler Şekil 4.15'te gösterilmiştir). Bu nedenle çalışmada *nifS* benzeri ve *nifU* benzeri genlerinin nitrojenaza destek olup olmadığı araştırılmıştır. Bunun için delesyon mutanları (Δ *nifS* benzeri) ve bir tamamlayıcı suş (Δ *nifS* benzeri/ *nifS* benzeri) oluşturulmuştur. Yabani tip ve mutanta uğratılmış *P. polymyxa* WLY78 karşılaştırıldığında Δ *nifS* benzeri azotun sınırlı olduğu koşullarda neredeyse hiç aktivite göstermemiştir. Mutant Δ *nifS* benzerinin tamamlayıcı suşu *nifS* benzeri ile yeniden tamamlanması ile nitrojenaz aktivitesi geri kazandırılmıştır. Bu da *nifS* benzeri genin azot fiksasyonunda rol aldığını göstermektedir. Bu çalışma ile *Paenibacillus polymyxa* WLY78'de *nifS* benzeri genin azot fikse etmede görev aldığı ortaya koyulmuştur (Q. Li vd., 2021; D. Zhao vd., 2007).



Şekil 4.15 *Paenibacillus polymyxa* WLY78'in *nif* genlerinin genomik konumu ve Fe-S kümesinin oluşumunda rol alan genler (Q. Li vd., 2021)

NifW'nin, MoFe proteininin FeMo-co olmadan bir apo-formuna bağlandığı bulunmuştur fakat biyokimyasal işlevleri hala bilinmemektedir. *nafY* ve *nifX*'in proteinleri FeMo-co ve NifB-co'nun sırayla *nifDK* ve *nifEN* proteinlerine aktarım sürecinde rol oynamaktadır. Bu genlerin nitrojenaz enziminin alt birimlerinden birisi olan FeMo-co sentezinde rol oynamasından kaynaklı analiz sonuçları da incelendiğinde N₂ koşulunda bu genlerde artış meydana gelirken NH₄ koşulunda ise bu genlerin ifadesinde artış meydana gelmemiştir. Yapılan bir çalışmada ise sırasıyla *nifX*, *nifZ-nifT*, *nifP-orf84-dpsA-orf99* ve *hesA-hesB-fdxH-feoA-fedB-mop* taşıyan kromozomal parçaları silinerek mutant NK8, NK2, NK7 ve NK9 oluşturuldu. Oluşturulan mutantlardaki nitrojenazın alt birimlerinde bulunan gen bozulmalarının etkisini değerlendirmek için Western blot analizi yapılmıştır. Western blot sonucunda *nifH* proteininde azalma gözlemlenmiştir. Aynı şekilde *nifD* proteinin ifadesinde de azalma meydana geldiği gözlemlenmiştir fakat *ΔnifW* de ise herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Nitrojenaz enzimi ile ilişkili proteinlerin (*ΔnifZ*, *ΔnifW*, *ΔnifX*, *ΔnifXnafY* ve *ΔnifP*) ifade seviyelerinde de azalma meydana gelmiştir (Nonaka vd., 2019). Yapılan bu çalışma sonucunda da bu genlerin nitrojenaz sistemine destek veren genler olduğu kanıtlanmaktadır.

nifV geni nitrojenaz sisteminin merkezinde bulunan Fe-Moco'nun düzenlenmesi için gerekli olan homositratin oluşumunu katalizleyen homositrat sentaz enzimini kodlayan genidir (Hashimoto vd., 2019). Deneyde N₂ koşulunda *nifV* geninin ekspresyonunda artış meydana geldiği gözükürken NH₄ koşulunda ise bu genin ekspresyonunda bir azalma olduğu gözükmektedir. Yapılan bir bitki çalışması da bunu kanıtlayıcı niteliktedir. Çalışmada çift çaprazlama yöntemi kullanılarak *nifV* delesyon mutanı oluşturulmuştur. Asetilen indirgeme testi (ARA) kullanılarak nitrojenaz aktivitesi analiz edilmiştir. Çalışma deneyinde *A. evenia* bitkileri azot kaynağının olmadığı ve düşük oksijen gerilimi olan koşullar altında büyütülmüştür. Çalışma sonunda etilen oluşum kinetiği yabancı tipe göre, $\Delta nifV$ mutantında önemli ölçüde bir azalma meydana gelmiştir. Daha sonra bu *A. evenia* bitkilerine *nifV* geni plazmitin ORS285 $\Delta nifV$ suşu ile taşınımıyla tekrardan enfekte edilmiştir. Bu veriler sonucunda *A. evenia* ile ORS285 suşunun simbiyozu sırasında *nifV* geninin nitrojenaz aktivitesinde önemli bir rol aldığı gösterilmiştir. Şekil 4.16'da *A. evenia* bitkilerinin büyümelerinin karşılaştırılması gösterilmiştir (Nouwen vd., 2017).

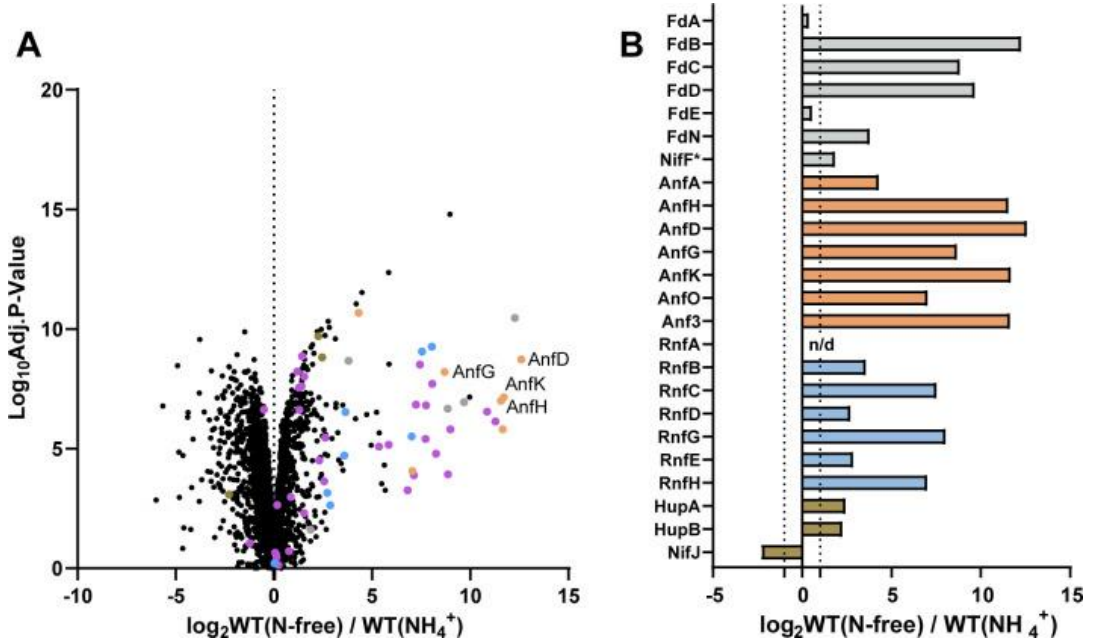


Şekil 4.16 *A. evenia* bitkilerinin büyüme karşılaştırması (Nouwen vd., 2017)

cowN, N₂ fiksasyon destekleyici gen olarak adlandırılır. Grafikte de görüldüğü üzere glutamat koşulunda değişmeyen bir ekspresyon bulunurken NH₄ ve N₂ koşullarında bu genin ifadesi daha baskılanmış durumdadır. *Rhodobacter capsulatus* *coaA* ve *cowN* genleri, Mo-nitrojenazın yapısal genleri *nifHDK* ve *fdxC* genlerinin yukarısında bulunur. Bu da bu genlerin işlevsel olarak nitrojenaz sistemi ile bağlantılı olma olasılığını gösterir. *cowN* genleri, Mo-nitrojenazın yapısal genlerinden *nifHDK*'yi içeren bakterilerde bulunmasından kaynaklı bu genin diazotroflara özgü olduğunu göstermektedir. *cowN* geni, bazı diazotrofik bakteri türlerinde *nif* genlerine bağlı olsa da bu gen ile azot (N₂) fiksasyonu arasındaki ilişki yalnızca *Rhodospirillum rubrum*'da gösterilmiştir (Hoffmann vd., 2014).

Ortolog ferredoksin görevi gören *fdxC* geni ile yapılan bir deneyde *Rhodobacter capsulatus* kullanılarak Fe-nitrojenaza elektron taşınımı araştırılmıştır. Deneyde *Rhodobacter capsulatus* kullanılmasının sebebi ise sadece Mo- ve Fe-nitrojenazları yapısında bulundurmasındandır. Deney sırasında *fdxC* veya *fdxN* genlerinin tek tek silinmesi yani delesyonu ile daha yavaş büyüme ve Fe-nitrojenaz katalizli N₂ fiksasyonunda azalma meydana gelirken bu iki genin aynı anda silinmesi (çift delesyon) ile diazotrofik büyüme ortadan kalkarken N₂ fiksasyonunda tamamen ortadan kaldırılmıştır. Bu sonuçlar ayrı ayrı delesyon suşları $\Delta fdxN$ ve $\Delta fdxC$ genlerinde Fe-nitrojenaz aktivitesinde 3-4 kat azalma ve bu genlerin çift delesyon suşlarında hiçbir aktivite göstermemesi ile doğrulanmıştır (Addison vd., 2024). Yapılan başka bir deneyde tam hücreli proteomik çalışması gerçekleştirilmiştir. Bunun için azot fiksasyon genlerinin baskılanıp NH₄⁺ (amonyum) üzerindeki *Rhodobacter capsulatus* büyümesi ile N₂ tek azot kaynağı olarak büyütülen *Rhodobacter capsulatus* arasındaki protein bollukları

kıyaslanmıştır. *Rhodobacter capsulatus* 'ta N_2 fiksasyon proteinlerinde yukarı regülasyon meydana gelmiştir. NH_4^+ (amonyum) bulundurulmuş ortamlarda büyütülen *Rhodobacter capsulatus* 'un proteomundaki anlamlılık değerlerine karşı değişiklikler volkan grafiğinde gösterilmiştir. Volkan grafiğinde x ekseninde azot serbest ortamındaki gen ekspresyonunun NH_4^+ (amonyum) ortamına göre \log_2 oranını göstermektedir. X ekseninde bulunan pozitif değerler azot serbest ortamında daha fazla eksprese olan genleri; negatif değerler ise ekspresyonunun NH_4^+ (amonyum) ortamında daha fazla eksprese olan genleri temsil etmektedir. (A) Volkan grafiğinde renklerin ifade ettikleri proteinler şu şekildedir; Fe-nitrojenaz yapısal ve ilişkili proteinler (Anf proteinleri turuncu), Fd ve Fld proteinleri (gri), Hup proteinleri ve NifF (kahverengi), Rnf proteinleri (açık mavi) ve N_2 fiksasyonunda rol alan gen kümelerinde kodlanmış diğer proteinler (mor). (B) Çubuk grafiğinde ise volkan grafiğinde gösterilen proteinlerin N_2 fiksasyon şartları ve N_2 fiksasyon dışı şartlar arasındaki ortalama yoğunluklarının \log_2 oranları gösterilmiştir (şekil 4.17).



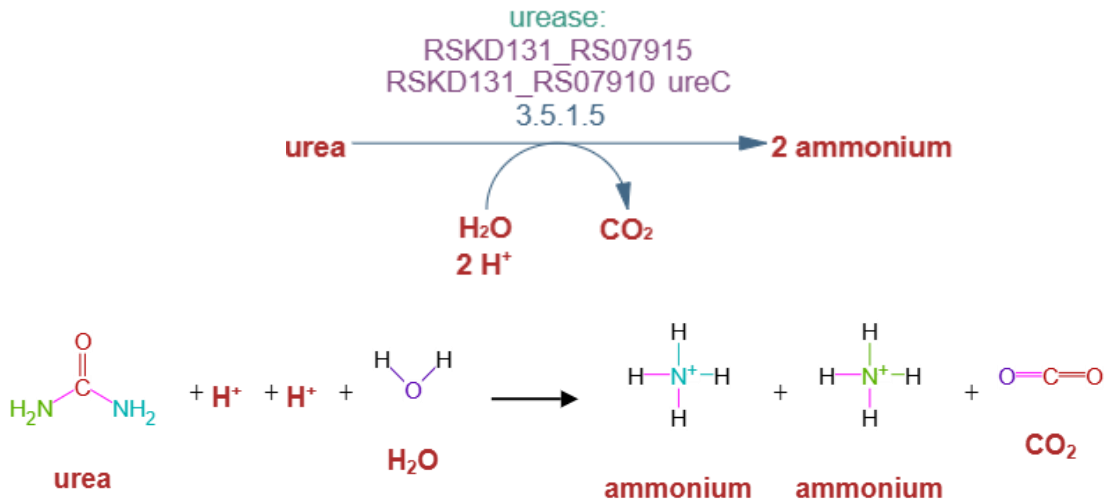
Şekil 4.17 Diazotrofik büyüme altında *Rhodobacter capsulatus* 'un N_2 fiksasyon proteinlerinin up regülasyonu. X ekseninde bulunan pozitif değerler azot serbest ortamında daha fazla eksprese olan genleri; negatif değerler ise ekspresyonunun NH_4^+ (amonyum) ortamında daha fazla eksprese olan genleri temsil etmektedir (Addison vd., 2024)

Azot serbest ortamda *anf* genleri yukarı (up) regüle olmuştur bu da bu genlerin azot fiksasyonda rol oynadığını göstermiştir. Çubuk grafiği incelendiğinde ise *Fd* ve *Rnf* genleri de yukarı (up) regüle olmuştur. Bu tez çalışmasında çıkan sonuçlar bu çalışmayla

parellezlik gösterir niteliktedir. Glutamat ve N₂ koşulları altında büyütölen *C. sphaeroides*'te *fdxc* geninin ekspresyon değeri daha yüksek iken NH₄ (amonyum) koşulunda büyütölen bakterinin ekspresyon değeri daha düşük ifade edilmiştir (Addison vd., 2024; Ricagno vd., 2007).

pqqA, *pqqB*, *pqqC*, *pqqD* genleri, birlikte pirolu kinolin kinon (PQQ) biyosentez yolunu kodlayan gen grubunun bir parçasıdır (NCBI). *pqq*, bir kofaktördür ve oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alan enzimler için önemlidir. Bu genler, *pqq*'nun sentezini sağlayarak azot fiksasyonu yapan hücrelerin enerji metabolizmasını etkilemektedir (Keseler vd., 2021).

urtA ve *urtB* genleri, üre taşıyıcı proteinleri kodlayan genlerdir (NCBI). Üre alımı ve taşınmasıyla ilgilidirler. *urtD* geni ise bazı azot fiksasyonu yapan bakterilerde bulunan ve üre taşınımında rol alan bir gen olarak bilinmektedir. Bu gen, üre ve diğer azotlu bileşiklerin hücre içinde bir araya toplanmasına yardımcı olan bir taşıyıcı proteinini kodlamaktadır. Üre taşıyıcı sistemde rol alan bu genler *Corynebacterium glutamicum*'da incelenmiştir (Beckers vd., 2004). Azot kısıtlamasına cevap olarak *urtABCDE* operonu tarafından ABC tipi taşıyıcılar kodlanır. Azot düzenleyicisi *amtR* ile *urt* genleri düzenlenir. AmtR baskılayıcı protein ise *Corynebacterium glutamicum*'un üreaz kodlayan *ureABCEFGD* genlerinin transkripsiyonun kontrolünden de sorumludur. Bu üreaz kodlayan genlerin asıl amacı ise azot yokluğuna cevap olarak transkripsiyona uğrayan operon oluşturmaktır (Beckers vd., 2004). Bu araştırma sonucunda ısı grafiği (heatmap) incelendiğinde NH₄ koşulunda bu genlerin ekspresyonu baskılanırken N₂ koşulunda bu genlerin ekspresyonlarında artış meydana gelmektedir. Çünkü üreaz enzimi tarafından üre hidrolize uğrar ve amonyum (NH₄) meydana gelir (üenin üreaz enzimi ile hidrolize uğraması Şekil 4.18'de gösterilmiştir), NH₄ koşulunda ortamda yeterli miktarda amonyum (NH₄) bulunduğu için bu genlere ihtiyaç duyulmayacağından ekspresyonlarında azalma ya da baskılanma gözlemlenmektedir.



Şekil 4.18 Üre hidrolizi

4.5.4. Diferansiyel gen ekspresyon analizi

Diferansiyel gen ekspresyon (DGE) analizi normalize edilmiş okuma sayıları üzerinden, deney grupları arasındaki istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon değişikliklerini tespit etmek için kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle, belirli bir gen için okuma sayılarında gözlenen bir farkın sadece rastgele varyasyon ile meydana gelme beklentisinden daha büyük olup olmadığına karar vermek için Diferansiyel Gen Ekspresyon Analizi kullanılmaktadır. Tablo 4.6’da DGE analizi sonrasında her bir karşılaştırma grubunun detayları ve anlamlı derecede (FDR < 0.05) farklılık gösteren genlerin sayıları yer almaktadır. Üç farklı grup oluşturulmuştur. Glutamat-N₂ grubu arasında 918 değişmeyen gen, 988 ekspresyonu azalan gen ve 488 artan gen mevcuttur. Glutamat-NH₄ grubu arasında 1564 değişmeyen gen bulunurken 439 ekspresyonu azalan, 391 ise ekspresyonu artan gen bulunmaktadır. NH₄-N₂ grubu arasında ise 1868 ekspresyonu değişmeyen gen, 234 ekspresyonu azalan gen ve 292 ekspresyonu artan gen bulunmaktadır.

Tablo 4.6 Gerçekleştirilen karşılaştırma grupları ve anlamlı derece farklılık gösteren genlerin sayıları

Test	Kontrol Grubu	Deney Grubu	Ekspresyonu Azalan Genler	Değişmeyen Genler	Ekspresyonu Artan Genler
1	Glutamat	N ₂	988	918	488
2	Glutamat	NH ₄	439	1564	391
3	NH ₄	N ₂	234	1868	292

4.5.4.1. DGE Karşılaştırma 1

Karşılaştırma 1 içinde yapılan analize göre 488 adet gende anlamlı (FDR<0.05) ekspresyon artışı; 988 adet gende anlamlı (FDR<0.05) ekspresyon düşüşü tespit edildi. Aşağıda bulunan Tablo 4.7’de farklı genlerin ifade seviyelerinin Glutamat ve N₂ koşullarında nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığını gösteren 15 gene yer verilmektedir.

Tablo 4.7 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (Glutamat-N₂)

Gen ve Transkript	Glutamat [†]	N ₂ [†]	LogFC [†]	P Değeri	FDR [†]
rplN RSKD131_RS00120	22.3 (±7.6)	0.81 (±0.2)	-3.99 ▼	4.18 × 10 ⁻⁹	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
- RSKD131_RS11550	0.22 (±0.1)	1.9 (±0.5)	3.89 ▲	6.15 × 10 ⁻⁹	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
rpsQ RSKD131_RS00115	40.71 (±16.2)	1.6 (±0.3)	-3.84 ▼	1.49 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
preA RSKD131_RS07365	0.81 (±0.2)	6.88 (±1.9)	3.86 ▲	1.86 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
rpsN RSKD131_RS00135	19.81 (±4.8)	0.93 (±0.3)	-3.66 ▼	2.04 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
- RSKD131_RS07375	0.65 (±0.3)	5.53 (±1.4)	3.90 ▲	2.15 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
rplE RSKD131_RS00130	34.47 (±9.2)	1.42 (±0.4)	-3.83 ▼	2.34 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
rpsG RSKD131_RS00050	47.39 (±19.2)	1.36 (±0.2)	-4.29 ▼	2.42 × 10 ⁻⁸	*** 7.25 × 10 ⁻⁶
rpsL RSKD131_RS00045	33.08 (±15.9)	0.74 (±0.1)	-4.63 ▼	3.87 × 10 ⁻⁸	*** 1.03 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS11560	0.15 (±0)	0.97 (±0.2)	3.46 ▲	4.82 × 10 ⁻⁸	*** 1.15 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS11545	0.39 (±0.1)	2.93 (±0.5)	3.66 ▲	5.57 × 10 ⁻⁸	*** 1.21 × 10 ⁻⁵
fusA RSKD131_RS00055	61.97 (±19.4)	2.73 (±0.6)	-3.71 ▼	6.73 × 10 ⁻⁸	*** 1.34 × 10 ⁻⁵
hydA RSKD131_RS07345	0.56 (±0.3)	3.14 (±0.7)	3.32 ▲	7.45 × 10 ⁻⁸	*** 1.37 × 10 ⁻⁵
rplX RSKD131_RS00125	44.92 (±12.6)	2.12 (±0.3)	-3.59 ▼	8.50 × 10 ⁻⁸	*** 1.39 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS11515	17.93 (±7)	1.4 (±0.2)	-2.85 ▼	8.68 × 10 ⁻⁸	*** 1.39 × 10 ⁻⁵

rplN, *rpsQ*, *rpsN*, *rplE*, *rpsG*, *rpsL*, *fusA*, *rplX* gibi genler, Glutamat koşulunda yüksek ifade seviyesine sahiptir. Bu genler ribozomal proteinleri kodlamaktadır. Bu genler ve diğer ribozomal alt birimde görev alan (30S [Tablo 4.8] ve 50S [Tablo 4.9] ribozomal proteinler) genlerin isimleri ve görevleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.

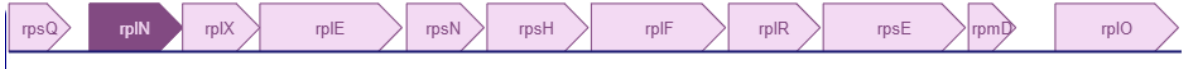
Tablo 4.8 30S ribozomal proteinler

Gen	Görev
1. <i>rpsL</i>	30S ribozomal protein S12
2. <i>rpsG</i>	30S ribozomal protein S7
3. <i>rpsJ</i>	30S ribozomal protein S10
4. <i>rpsS</i>	30S ribozomal protein S19
5. <i>rpsC</i>	30S ribozomal protein S3
6. <i>rpsQ</i>	30S ribozomal protein S17
7. <i>rpsN</i>	30S ribozomal protein S14
8. <i>rpsH</i>	30S ribozomal protein S8
9. <i>rpsE</i>	30S ribozomal protein S5
10. <i>rpsM</i>	30S ribozomal protein S13
11. <i>rpsK</i>	30S ribozomal protein S11
12. <i>rpsD</i>	30S ribozomal protein S4
13. <i>rimO</i>	30S ribozomal protein S12 metiltiyotransferaz
14. <i>rpsB</i>	30S ribozomal protein S2
15. <i>rpsI</i>	30S ribozomal protein S12
16. <i>rpsF</i>	30S ribozomal protein S6
17. <i>rpsR</i>	30S ribozomal protein S18
18. <i>rpsU</i>	30S ribozomal protein S21
19. <i>rpsP</i>	30S ribozomal protein S16
20. <i>rbfA</i>	30S ribozom bağlayıcı faktör
21. <i>rpsO</i>	30S ribozomal protein S15
22. <i>rpsT</i>	30S ribozomal protein S20
23. <i>rpsA</i>	30S ribozomal protein S1

Tablo 4.9 50S ribozomal proteinler

Gen	Görev
1. <i>rplK</i>	50S ribozomal protein L11
2. <i>rplA</i>	50S ribozomal protein L1
3. <i>rplJ</i>	50S ribozomal protein L10
4. <i>rplL</i>	50S ribozomal protein L7/L12
5. <i>rplC</i>	50S ribozomal protein L3
6. <i>rplD</i>	50S ribozomal protein L4
7. <i>rplB</i>	50S ribozomal protein L2
8. <i>rplP</i>	50S ribozomal protein L16
9. <i>rpmC</i>	50S ribozomal protein L29
10. <i>rplN</i>	50S ribozomal protein L14
11. <i>rplX</i>	50S ribozomal protein L24
12. <i>rplE</i>	50S ribozomal protein L5
13. <i>rplF</i>	50S ribozomal protein L6
14. <i>rplR</i>	50S ribozomal protein L18
15. <i>rpmD</i>	50S ribozomal protein L30
16. <i>rplO</i>	50S ribozomal protein L15
17. <i>rplQ</i>	50S ribozomal protein L17
18. <i>rplT</i>	50S ribozomal protein L20
19. <i>rpmI</i>	50S ribozomal protein L35
20. <i>rpmG</i>	50S ribozomal protein L33
21. <i>rpmB</i>	50S ribozomal protein L28
22. <i>rpmF</i>	50S ribozomal protein L32
23. <i>rplM</i>	50S ribozomal protein L13
24. <i>rplI</i>	50S ribozomal protein L9
25. <i>rpmH</i>	50S ribozomal protein L34
26. <i>ykgO</i>	B tipi 50S ribozomal protein L36
27. <i>rplU</i>	50S ribozomal protein L21
28. <i>rpmA</i>	50S ribozomal protein L27

rpsG geni, ribozom bağlanmasında ve işlevinde önemli olan 30S ribozomal alt birim S7 proteinini kodlar (NCBI). Translasyonel geri bildirim baskılayıcı olarak görev alan S7 proteini hem kendi sentezini hem de diğer ribozomal proteinlerin sentezi ve modifikasyonunu düzenler. Ribozomal proteinlerin sentez ve modifikasyonundan sorumlu bir diğer gen dizisi ise *rplR*, *rplO*, *rplX*, *rpsH*, *rplL*, *rlpN*, *rpsQ*, *rpsN*, *rplF* ve *rpsI*'dir Şekil 4.19'da bu gen dizisinin operonu gösterilmektedir. *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan çalışmaların çoğunda bu ribozomal genlerin ifade değişiklikleri veya bu genlerin baskılanmaları çevresel streslerden kaynaklıdır. Ribozomal genlerdeki bu ifade düşüklüğü ve baskılanma hücrenin kendini korumaya alması ve büyüme durumunun adaptasyonunda rol alan genlerin ifade artışındaki harcanan enerjiyi yeniden düzenlediğini kanıtlar (Stintzi, 2003).



Şekil 4.19 Ribozomal proteinlerin sentez ve modifikasyonundan sorumlu genlerin operon dizisi

fusA, protein sentez uzama faktörü-G'yi (EF-G) kodlayan bir gen dir (NCBI). Protein sentez uzama faktörü G'nin (EF-G)'nin işlevini engelleyerek bakteriyel protein sentez inhibisyonunu sağlayarak gram-pozitif enfeksiyonlara karşı antibiyotik rol oynayan fusidik asittir (Besier vd., 2003). *RSKD131_RS11550*, *RSDK131_RS07375*, *RSDK131_RS11560*, *RSDK131_RS11545*, *hydA* ve *preA* genlerinin transkripti ise N₂ koşulunda yüksek ifade edilmektedir (LogFC değeri pozitif ve P değeri anlamlıdır). Bu analiz sonucu genler arasındaki farklılıklar, organizmanın azot kaynaklarına göre nasıl adapte olduğunu ve enerji kaynaklarını nasıl optimize ettiğini ortaya koymaktadır.

4.5.4.2. DGE Karşılaştırma 2

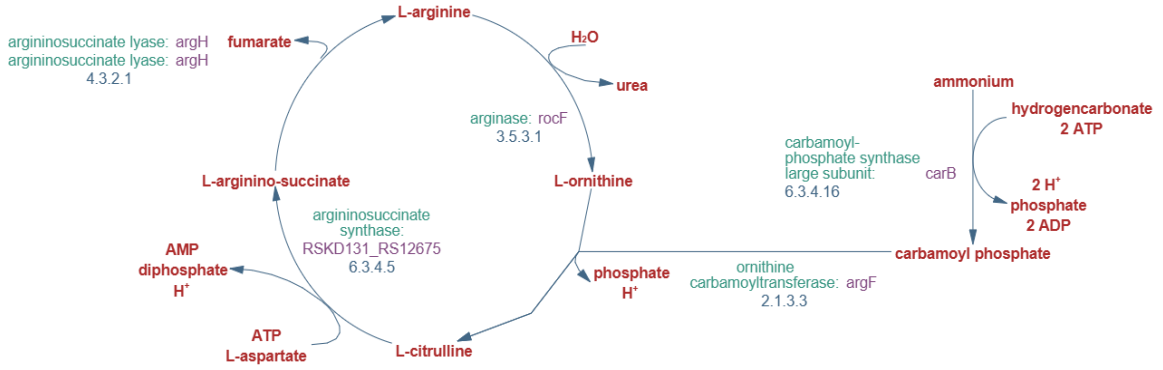
Karşılaştırma 2 içinde yapılan analize göre 391 adet gende anlamlı (FDR<0.05) ekspresyon artışı; 439 adet gende anlamlı (FDR<0.05) ekspresyon düşüşü tespit edilmektedir. Aşağıda bulunan Tablo 4.10'da farklı genlerin ifade seviyelerinin Glutamat ve NH₄ koşullarında nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığını gösteren 15 gene yer verilmektedir.

Tablo 4.10 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (Glutamat-NH₄)

Gen ve Transkript	Glutamat ⁺	NH ₄ ⁺	LogFC [†]	P Değeri	FDR [‡]
- RSKD131_RS08835	4.25 (±2.3)	0.05 (±0)	-5.63 ▼	2.51 × 10 ⁻⁷	*** 3.33 × 10 ⁻⁴
pqqE RSKD131_RS10435	0.3 (±0.2)	4.86 (±0.1)	4.67 ▲	3.31 × 10 ⁻⁷	*** 3.33 × 10 ⁻⁴
cybH RSKD131_RS08845	5.36 (±2)	0.51 (±0.1)	-2.80 ▼	4.17 × 10 ⁻⁷	*** 3.33 × 10 ⁻⁴
pqqB RSKD131_RS10450	1.42 (±0.8)	34.57 (±6.3)	5.27 ▲	1.48 × 10 ⁻⁶	*** 8.89 × 10 ⁻⁴
- RSKD131_RS08830	4.28 (±2.9)	0.07 (±0)	-5.30 ▼	2.84 × 10 ⁻⁶	** 1.26 × 10 ⁻³
pqqC RSKD131_RS10445	0.4 (±0.3)	8.18 (±1.9)	5.04 ▲	3.20 × 10 ⁻⁶	** 1.26 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS15730	0.01 (±0)	0.57 (±0.1)	5.75 ▲	3.69 × 10 ⁻⁶	** 1.26 × 10 ⁻³
carB RSKD131_RS10580	1.99 (±0.5)	0.31 (±0)	-2.10 ▼	4.80 × 10 ⁻⁶	** 1.36 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS12350	2.32 (±0.9)	0.32 (±0.1)	-2.27 ▼	5.11 × 10 ⁻⁶	** 1.36 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS12345	1.83 (±0.6)	0.24 (±0.1)	-2.36 ▼	6.86 × 10 ⁻⁶	** 1.52 × 10 ⁻³
preA RSKD131_RS07365	0.81 (±0.2)	2.16 (±0.2)	1.98 ▲	7.27 × 10 ⁻⁶	** 1.52 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS11550	0.22 (±0.1)	0.92 (±0.2)	2.63 ▲	7.63 × 10 ⁻⁶	** 1.52 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS14670	0.57 (±0.2)	1.68 (±0.1)	2.14 ▲	9.08 × 10 ⁻⁶	** 1.67 × 10 ⁻³
- RSKD131_RS11560	0.15 (±0)	0.53 (±0.1)	2.35 ▲	1.11 × 10 ⁻⁵	** 1.90 × 10 ⁻³
cobD RSKD131_RS10430	0.22 (±0.1)	0.91 (±0.1)	2.71 ▲	1.32 × 10 ⁻⁵	** 1.95 × 10 ⁻³

pqqE, *pqqB*, *pqqC* gibi genler pirroloquinolin kinon (PQQ) biyosentezinde görev alabilmektedir. *PQQ*, hücrede bir kofaktör olarak görev yapar ve oksidatif stres yanıtında rol oynamaktadır. NH₄ koşulunda yüksek ifade seviyesine sahiptir (LogFC değeri pozitif). Bu genler, hücrede enerji üretimine de katkıda bulunmaktadır (Keseler vd., 2021). *RSKD131_RS08835* ve *cybH* genleri ise Glutamat koşulunda daha yüksek ifade seviyesine sahiptir (LogFC değeri negatif). *cybH* geni sitokrom b ile ilişkilidir ve Ni/Fe-hidrojenaz da rol oynamaktadır (J. Hu vd., 2023). Glutamat koşulunda yüksek ifade edilmesi ise bu geni daha aktif kullandığını göstermektedir.

carB geni ise karbamoil fosfat sentazın bir alt birimini kodlamaktadır ve azot metabolizmasında rol oynamaktadır. *carB* genin döngüsü şekil 4.20’de gösterilmiştir (*Cereibacter sphaeroides KDI31*; *KCTC 12085 carB*, t.y.). Glutamat koşulunda daha yüksek ifade edilmesi, hücrenin bu ortamda azot metabolizmasını aktif olarak sürdürdüğünü göstermektedir. NH₄ koşulunda ise daha az ifade edilmektedir. Çünkü NH₄ koşulunda amonyum serbest bir halde bulunmaktadır. *carB* genine ihtiyaç yoktur bu yüzden ifade seviyesi daha düşüktür.



Şekil 4.20 *carB* geninin döngüsü

cobD geni treonin-fosfat dekarboksilaz da görev almaktadır (NCBI). *C. sphaeroides* gibi fotosentetik bakterilerde olmak üzere çeşitli metabolik süreçler için gerekli olan kobalamin (B12 vitamini) biyosentez yolunun bir parçasıdır (Tavares vd., 2019). *cobD* geni, Glutamata kıyasla NH_4 koşulunda daha yüksek ifade seviyesine sahiptir (LogFC değeri pozitif). Tabloda P değeri ve FDR değerleri oldukça düşük olan birçok gen bulunmaktadır. Bunlara örnek *RSKD131_RS08835*, *pqqE* ve *cybH* genleridir. Bu da gözlemlenen farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermektedir.

4.5.4.3. DGE Karşılaştırma 3

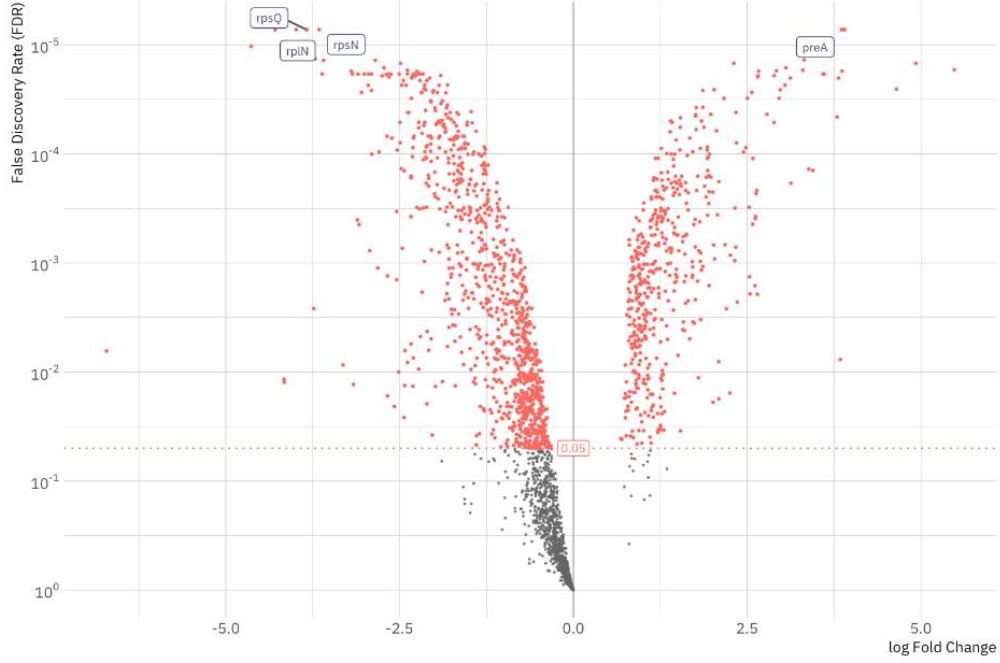
Karşılaştırma 3 içinde yapılan analize göre 292 adet gende anlamlı ($\text{FDR} < 0.05$) ekspresyon artışı; 234 adet gende anlamlı ($\text{FDR} < 0.05$) ekspresyon düşüşü tespit edilmektedir. LogFC değeri, P değeri ve FDR değeri gibi istatistiksel anlamlılık göstergeleri de verilmektedir. Tablo 4.11’de farklı genlerin ifade seviyelerinin N_2 ve NH_4 koşullarında nasıl değiştiğini ve bu değişimlerin istatistiksel anlamlılığını gösteren 15 gene yer verilmektedir.

Tablo 4.11 FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 15 gen (N₂-NH₄)

Gen ve Transkript	N ₂ ^a	NH ₄ ^a	LogFC ^c	P Değeri	FDR ^d
- RSKD131_RS08835	3.11 (±0.7)	0.05 (±0)	6.18 ▲	8.21 × 10 ⁻⁹	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
rsxC RSKD131_RS16405	0.82 (±0.2)	0 (±0)	7.35 ▲	2.07 × 10 ⁻⁸	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS16410	1.93 (±0.5)	0.01 (±0)	8.22 ▲	2.71 × 10 ⁻⁸	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
cybH RSKD131_RS08845	6.63 (±1.4)	0.51 (±0.1)	4.05 ▲	3.40 × 10 ⁻⁸	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
rsxG RSKD131_RS16415	1.86 (±0.4)	0.01 (±0)	7.72 ▲	3.83 × 10 ⁻⁸	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS08830	1.91 (±0.3)	0.07 (±0)	5.18 ▲	4.04 × 10 ⁻⁸	*** 1.61 × 10 ⁻⁵
nifN RSKD131_RS09045	0.57 (±0.1)	0 (±0)	7.54 ▲	5.19 × 10 ⁻⁸	*** 1.77 × 10 ⁻⁵
nifS RSKD131_RS09010	0.86 (±0.1)	0.01 (±0)	6.12 ▲	1.49 × 10 ⁻⁷	*** 3.58 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS16420	2.33 (±0.5)	0.02 (±0)	7.29 ▲	1.59 × 10 ⁻⁷	*** 3.58 × 10 ⁻⁵
nifV RSKD131_RS09005	1.44 (±0.3)	0.01 (±0)	6.92 ▲	1.64 × 10 ⁻⁷	*** 3.58 × 10 ⁻⁵
nifB RSKD131_RS09095	0.64 (±0.2)	0.02 (±0)	5.06 ▲	1.65 × 10 ⁻⁷	*** 3.58 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS16390	0.52 (±0.1)	0.02 (±0)	5.12 ▲	3.43 × 10 ⁻⁷	*** 6.84 × 10 ⁻⁵
- RSKD131_RS07325	15.28 (±3.2)	3.4 (±0.2)	2.52 ▲	4.35 × 10 ⁻⁷	*** 8.01 × 10 ⁻⁵
nifD RSKD131_RS09060	31.82 (±6.3)	0.06 (±0)	9.34 ▲	5.01 × 10 ⁻⁷	*** 8.12 × 10 ⁻⁵
nifX RSKD131_RS09040	4.41 (±1.1)	0.01 (±0)	8.67 ▲	5.09 × 10 ⁻⁷	*** 8.12 × 10 ⁻⁵

RSKD131_RS08835, *RSKD131_RS164050* ve *RSKD131_RS164100* genleri NH₄ koşulunda çok daha düşük ifade seviyesine sahiptir (neredeyse sıfır). Bu genlerin NH₄ koşulunda düşük ifade edilmeleri, hücrenin bu koşullarda azotla ilgili döngülere daha az katıldığını göstermekteyken N₂ koşulunda ise oldukça yüksek ifade seviyelerine sahiptirler. Bu durum, bu genlerin N₂ koşulunda azot fiksasyonuna veya azotla ilgili döngülere katıldığını ifade edebilmektedir.

nif genleri (örn. *nifN*, *nifS*, *nifV*, *nifB*, *nifD*, *nifX*), azot fiksasyonunda rol oynamaktadır. Azot fiksasyonu, azot gazının biyolojik olarak kullanılabilir forma (örneğin; amonyum) dönüştürülmesidir (Hoffman vd., 2014). N₂ koşulunda yüksek ifade seviyeleri, hücrenin bu koşullarda azot fiksasyonu yapma gereksinimini yansıtmaktadır. Genlerin şekil 4.21’de operon dizisi verilmektedir. Bu genler, azot kaynağının N₂ olduğu koşullarda daha aktif hale gelmektedir. Örneğin, dinitrojenaz proteininin α alt birimini kodlayan *nifD* geninin N₂ koşulunda 31,82 (±6.3) ifadesi görülmektedir. *nif* gen ailesine ait genlerin NH₄ koşulunda ifade seviyelerinin sıfıra yakın ya da çok düşük olduğu görülmektedir. Örneğin, *nifS* ve *nifV* genlerinin NH₄ ortamında neredeyse hiç ifade edilmemektedir. Bu durum, NH₄ ortamında azot fiksasyonuna gerek olmadığını ve organizmanın bu süreci durdurduğunu göstermektedir.



Şekil 4.22 Karşılaştırma 1 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi

X eksenini (log Katlama Değişimi) iki koşul (N_2 ve Glutamat) arasındaki gen ifadesindeki değişimin büyüklüğünü göstermektedir. Soldaki genler aşağı (down) düzenlenen genleri (negatif katlama değişimi) yani genin baskılandığını ve sağdaki genlerin yukarı (up) regüle (pozitif katlama değişimi) edildiğini gösterir. Y eksenini, FDR değerinin (False Discovery Rate) p-değerine göre düzeltilmiş anlamlılık seviyesini ifade eder. Y eksenindeki bir nokta ne kadar düşüğe sonuç istatistiksel olarak o kadar anlamlıdır. Yani bu ekseninde daha yukarıda yer alan noktalar daha anlamlı sonuçlara işaret eder. 0,05 FDR'deki noktalı çizgi ise istatistiksel anlamlılığın eşliğini göstermektedir.

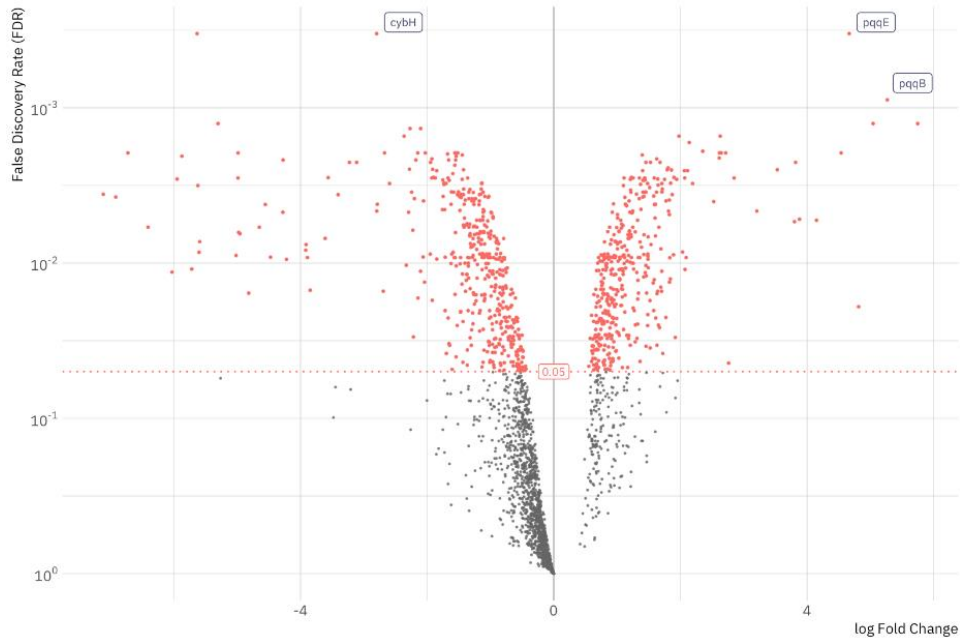
Karşılaştırma 1 için volkan grafiği, N_2 ve Glutamat karşılaştırmasında iki kanat şeklinde dağılan genlerin anlamlı bir şekilde ekspresyon değişimi meydana gelmiştir ve bu genlerden bazılarının yukarı (up) regüle edildiğini ($\log \text{fold change} > 0$) ya da baskılandığını ($\log \text{fold change} < 0$) ortaya koymaktadır. Grafikte 0.05 orta noktanın üst tarafında bulunan kırmızı noktalar istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren genleri ($FDR < 0.05$) temsil ederken siyah noktalar anlamlı olmayan genleri göstermektedir.

rpsQ (30S), *rplN* (50S) ve *rpsN* (30S) genleri ribozomal proteinlerin üretimiyle ilgili genlerdir. Bu genler hücrede protein sentezi için gerekli olan ribozomların yapısal bileşenlerini oluşturmaktadır (NCBI). Özellikle ribozomun küçük (30S) ve büyük (50S) alt birimlerini oluşturan proteinleri kodlamaktadır (Stintzi, 2003) ve bu genler grafiğin üst kısmında bulunan kırmızı noktalar arasındadır ve anlamlı değişim gösteren genler

arasındadır. *preA* geni ise NAD'ye bağımlı dihidropirimidin dehidrojenaz alt biriminde görev almaktadır (NCBI). Bazı bakterilerde iki bileşenli sinyal sistemleriyle ilişkili bir genidir ve periplazmik bağlayıcı bir protein kodlamaktadır (B. Yang vd., 2019). Bu genlerin yukarı (up) veya aşağı (down) regüle edilmesi hücrenin glutamat ortamında verdiği yanıtın bir göstergesidir. Ribozomal genlerdeki değişim protein üretim kapasitesini etkileyebilmektedir.

4.5.5.2. NH₄'ün Glutamat ile karşılaştırılması

Şekil 4.23'te bir Volkan grafiği kullanılarak NH₄ (amonyum) ve Glutamat karşılaştırması sonucu diferansiyel gen ekspresyonu gösterilmektedir.



Şekil 4.23 Karşılaştırma 2 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi

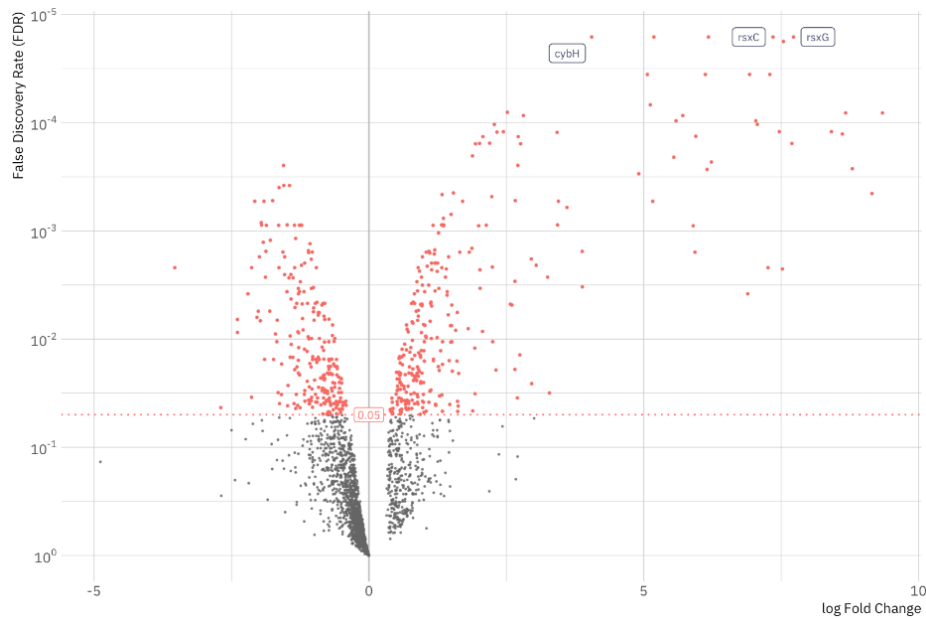
Bu volkan grafiği, NH₄ ve Glutamat koşulları arasında belirli genlerde anlamlı ekspresyon değişiklikleri olduğunu göstermektedir. *cybH* geni, Ni/Fe-hidrojenaz sitokrom b proteinini kodlamaktadır (NCBI). Sitokrom b proteinleri, elektron taşıma zincirinde yer alarak hücresel solunumda rol oynamaktadır. Hücresel solunumda enerji üretimi sağlandığından *cybH* genindeki ekspresyon değişiklikleri hücrenin enerji metabolizmasında bir farklılık olduğunu göstermektedir (J. Hu vd., 2023). NH₄ ile

Glutamat koşullarında farklı *cybH* gen ekspresyonu bu iki koşulun enerji ihtiyacı veya enerji üretim süreçlerinde farklılık olabileceğini ifade etmektedir.

pqqE ve *pqqB* genleri, pirin-kinon (PQQ) biyosentezinde görev alan genlerdir. *PQQ*, bazı bakterilerde redoks reaksiyonlarında koenzim olarak işlev görmektedir. Hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasına ve metabolik süreçlerin düzenlenmesine yardımcı olabilmektedir (Keseler vd., 2021). *pqqE* ve *pqqB* genlerinin yukarı (up) regüle edilmesi yani bu genlerin ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler NH_4 ve Glutamat koşulları arasında farklı enerji metabolizması ve oksidatif strese karşı yanıt gibi temel hücresel süreçlerde farklılıklar olduğunu düşündürmektedir.

4.5.5.3. N_2 'nin NH_4 (amonyum) ile karşılaştırılması

Şekil 4.24'te bir Volkan grafiği kullanılarak N_2 ve NH_4 (amonyum) karşılaştırması sonucu diferansiyel gen ekspresyonu gösterilmektedir.



Şekil 4.24 Karşılaştırma 3 için en anlamlı değişkenlik gösteren genlerin volkan grafiği gösterimi

cybH geni, bir önceki grafikte de belirtildiği gibi Ni/Fe-hidrojenaz sitokrom b proteinini kodlamaktadır ve hücresel solunumun bir parçası olan elektron taşıma zincirinde görev almaktadır (J. Hu vd., 2023). *cybH* geninde gözlenen diferansiyel ekspresyon hücrenin N_2 (azot) ve NH_4 (amonyum) koşulları arasındaki farklı enerji ihtiyaçlarına veya metabolik tepkilerini göstermektedir. Bu genin yukarı (up) regüle

edilmesi, NH_4 koşulunda hücrenin daha fazla enerji üretme gereksinimi olduğunu göstermektedir.

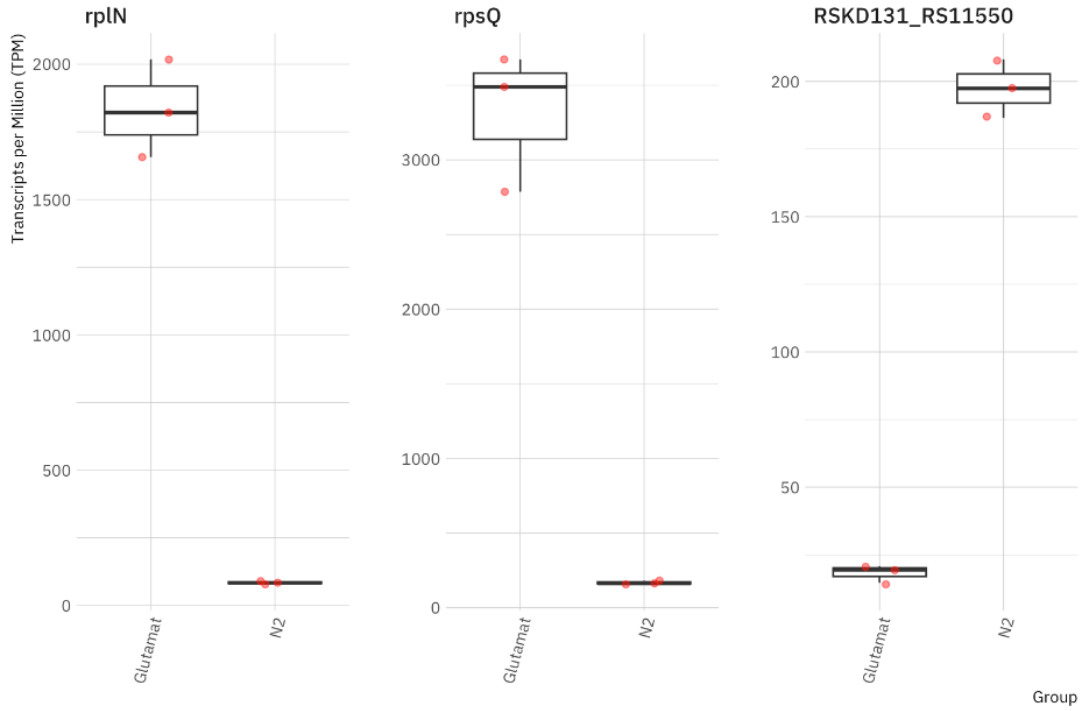
rsxC ve *rsxG* genleri ise elektron taşıma kompleksinin alt birimi olup oksidatif stres koşullarında redoks dengesini korumaya yardımcı olan Rsx kompleksinin parçalarındandır. Rsx kompleksi, elektron transferi ve redoks dengesi ile ilişkilendirilmektedir (Ham & Park, 2023). Bu genlerdeki ekspresyon artışı, hücrenin NH_4 koşuluna yanıt olarak oksidatif strese karşı çıkmak için redoks mekanizmalarını aktive ettiğini düşündürmektedir. NH_4 ortamı, hücrede oksidatif strese neden olabilir ve hücrelerin bu koşula uyum sağlamak için *rsxC* ve *rsxG* genlerinin ekspresyonunun daha fazla aktive etmesi gerekebilmektedir. Özetleyecek olursak *cybH* genindeki yukarı (up) regülasyon, hücredeki enerji ihtiyacının arttığını veya enerji metabolizmasında düzenleme olduğunu gösterir iken *rsxC* ve *rsxG* genlerindeki artış ise oksidatif stres koşullarına karşı adaptif bir yanıt olarak değerlendirilebilmektedir.

4.5.6. Diferansiyel ekspresyon

Diferansiyel ekspresyon analizinde farklı koşullar altında ya da farklı gruplar arasında genlerin ifade düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin karşılaştırılması, farklı genlerin ekspresyonlarındaki artış veya azalışın analizi ve kümeler arasında oluşabilecek farklılıkları ortaya çıkarmak için kullanılan biyoinformatik yöntemlerden birisidir. Bu analiz sonucu ile farklı gen gruplarının ya da farklı genlerin gelişim aşamalarına veya çevresel etkenler gibi faktörlere bağlı olarak ifadelerinde ne kadar ve ne gibi değişikliklerin olduğunu belirlemede yardımcı olmaktadır (Khozyainova vd., 2023).

4.5.6.1. Karşılaştırma 1 için diferansiyel ekspresyon

Şekil 4.25 içinde, en düşük FDR değerine sahip 3 genin normalize edilmiş okuma değerlerine göre dağılımları gösterilmektedir. Normalize edilmiş okuma değerleri, ilgili genin ekspresyonunu gösteren dolaylı parametrelerdir.



Şekil 4.25 Karşılaştırma 1 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları

Bu grafik, Glutamat ve N₂ arasındaki en anlamlı üç genin (*rplN*, *rpsQ* ve *RSKD131_RS11550*) Transkript Milyon Başına (TPM) ekspresyon seviyeleri kutu grafikleriyle gösterilmektedir. Her kutu grafiği belirli bir gen için TPM dağılımını temsil etmektedir. Her kutu grafiği, genin bir gruptaki ekspresyon seviyelerinin medyanı, çeyrek dilimleri ve uç değerlerini ortaya koymaktadır.

rplN geninin Glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi, oldukça yüksek ifade edilmektedir. Kutu grafiğindeki üst ve alt sınırlar gen ekspresyonundaki varyasyonunu, ortadaki kalın çizgi ise genin medyan ekspresyon seviyesini göstermektedir. Üstte ve altta bulunan kuyruklar daha yüksek ve daha düşük TPM değerlerini temsil etmektedir. Kırmızı noktalar, veri setindeki örnekleri ve uç değerleri göstermektedir. *rplN* geni, Glutamat koşulunda stabil ve yüksek bir ekspresyon profiline sahiptir. *rplN* geninin Glutamat ortamında yüksek ekspresyon göstermesi bu genin Glutamat metabolizmasıyla veya Glutamata bağlı süreçlerle ilgili olabileceğini düşündürmektedir. Kutu grafiğindeki geniş aralık ve medyan değeri genin bu ortamda stabil ve tutarlı bir şekilde ifade edildiğini göstermektedir. *rplN* geninin N₂ koşulunda ekspresyon seviyesi sıfıra yakın veya çok düşük seviyelerde gözlemlenmektedir. Kutu neredeyse yok denecek kadar küçüktür ve medyan neredeyse sıfırdır. *rplN* geninin N₂ koşulunda ekspresyon düşüklüğü bu ortamda

genin neredeyse hiç ifade edilmemesi genin bu koşulda gereksiz veya baskılanmış olduğunu göstermektedir.

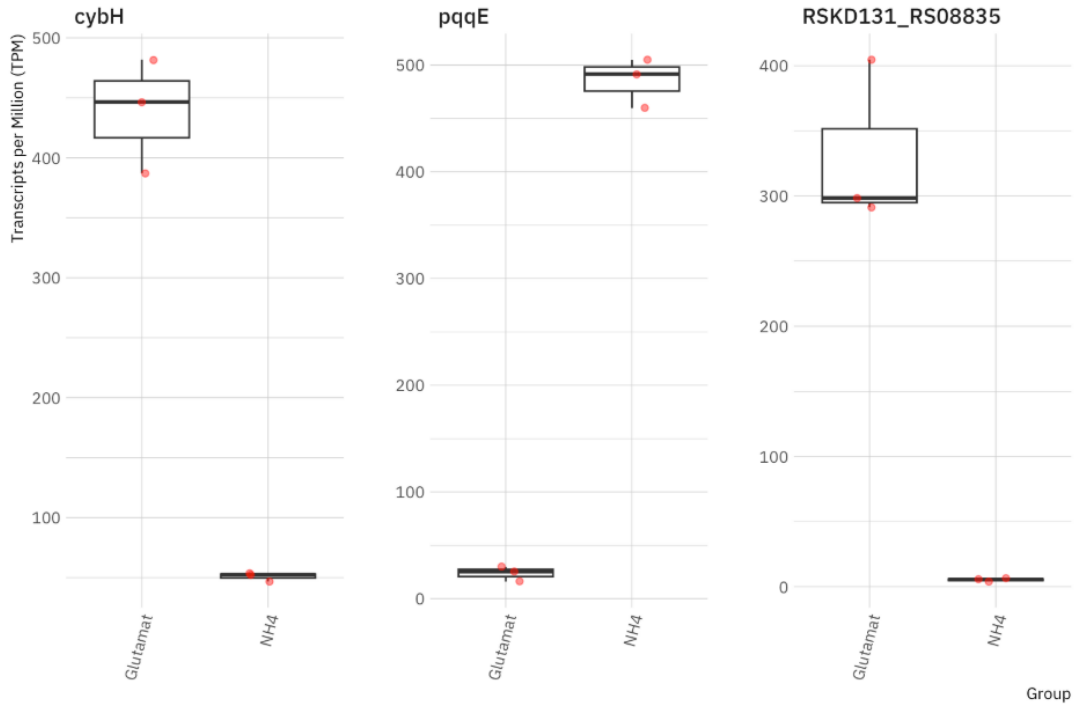
rpsQ geninin Glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi, *rplN* genine göre de daha yüksek seviyelerdedir. Bu durum, genin bu koşul altında oldukça aktif olduğunu göstermektedir. Bu genin de Glutamat koşulundaki medyan değeri oldukça yüksektir. Varyasyonları ve kutu grafiğindeki geniş aralık, genin ekspresyonunda örnekler arasında bazı değişikliklerin nasıl farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Kırmızı noktalar bu grafikte de uç değerleri temsil etmektedir ve glutamat koşulundaki belirli örneklerin yüksek TPM değerlerine sahip olduğunu göstermektedir. Bu genin medyanı, grafiğin üst ve alt sınırları arasında dengeli bir dağılım gösterir bu da ekspresyonun tutarlılığını ifade etmektedir. *rpsQ* geninin N₂ koşulundaki ekspresyon seviyesi Glutamat koşuluna göre yine düşük seviyededir ve neredeyse medyan sıfırdır. Bu da *rpsQ* geninin N₂ koşulunda baskılandığını veya aktif olmadığını göstermektedir. Glutamat koşuluna göre N₂ koşulunda ki bu düşük ekspresyon seviyesi bu genin ortamda ihtiyaç olmaması veya genin baskılandığını göstermektedir.

RSKD131_RS11550 geninin Glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi, diğer iki gene kıyasla daha düşük bir ekspresyon seviyesine sahiptir. Fakat yine de glutamat koşulunda anlamlı bir fark gözlemlenmektedir ve genin ekspresyonu belirli bir seviyede devam etmektedir. Glutamat koşulundaki kutu grafiği daha dar ve genel aralığı temsil etmektedir. Diğer iki gene göre bu genin Glutamat ortamındaki ekspresyonu daha düşüktür fakat yine de Glutamat koşulunda var olduğu anlamına gelmektedir. *RSKD131_RS11550* geninin N₂ koşulunda ekspresyon seviyesi yine çok düşük seviyededir. Kutu ve medyan çizgi oldukça aşağıda ve az varyasyon göstermektedir. Bu da *RSKD131_RS11550* geninin N₂ koşulunda baskılandığını veya aktif olmadığını göstermektedir.

Tüm genlerde Glutamat koşulu, N₂ koşuluna kıyasla çok daha yüksek TPM değerlerine sahiptir. Bu sonuçlar Glutamat koşulunda, bu genlerin ekspresyonunda artış meydana gelirken N₂ koşulunda ise bu genlerin ekspresyonu baskılanmaktadır. Genlerin Glutamat koşulunda aktif ancak N₂ koşulunda pasif olması bu genlerin Glutamat metabolizmasında veya bu metabolizma ile ilişkili süreçlerde görev aldığını düşündürürken, N₂'nin bu genlerin ekspresyonunu baskılaması bu genlerin N₂ koşullarına adaptasyon sağlamadığını veya bu ortamda işlevsel olarak gerekli olmadığını düşündürmektedir.

4.5.6.2. Karşılaştırma 2 için diferansiyel ekspresyon

Şekil 4.26 içinde, en düşük FDR değerine sahip 3 genin normalize edilmiş okuma değerlerine göre dağılımları gösterilmektedir. Normalize edilmiş okuma değerleri, ilgili genin ekspresyonunu gösteren dolaylı parametrelerdir.



Şekil 4.26 Karşılaştırma 2 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları

Bu grafikte, *cybH*, *pqqE* ve *RSKD131_RS08835* genlerinin Glutamat ve NH₄ gruplarındaki Transkript Milyon Başına (TPM) ekspresyon seviyelerinin dağılımı gösterilmektedir. Her gen için kutu grafikleri, genlerin ekspresyon seviyelerinin medyanını, çeyrek dilimlerini, varyasyonunu ve uç değerleri göstermektedir.

cybH geninin Glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi yüksek ifade edilmektedir. Glutamat grubundaki medyan değeri genin bu koşulda ortalama ekspresyon seviyesinin yüksek olduğunu göstermektedir. Medyan çizgisi ise genin ekspresyonunun orta seviyede yoğunlaştığını belirtmektedir. Kutunun genişliği, genin ekspresyon seviyelerinde örnekler arasındaki varyasyonu göstermektedir. Grafikteki kırmızı noktalar uç değerlerdir ve standart dağılımın dışında kalan yüksek veya düşük değerleri ifade etmektedir. *cybH* geninin NH₄ koşulunda ekspresyon seviyesi, oldukça düşüktür hatta medyan neredeyse

sıfıra yakındır. Bu da *cybH* geninin NH_4 koşulunda aktif olmadığını veya baskılandığını göstermektedir.

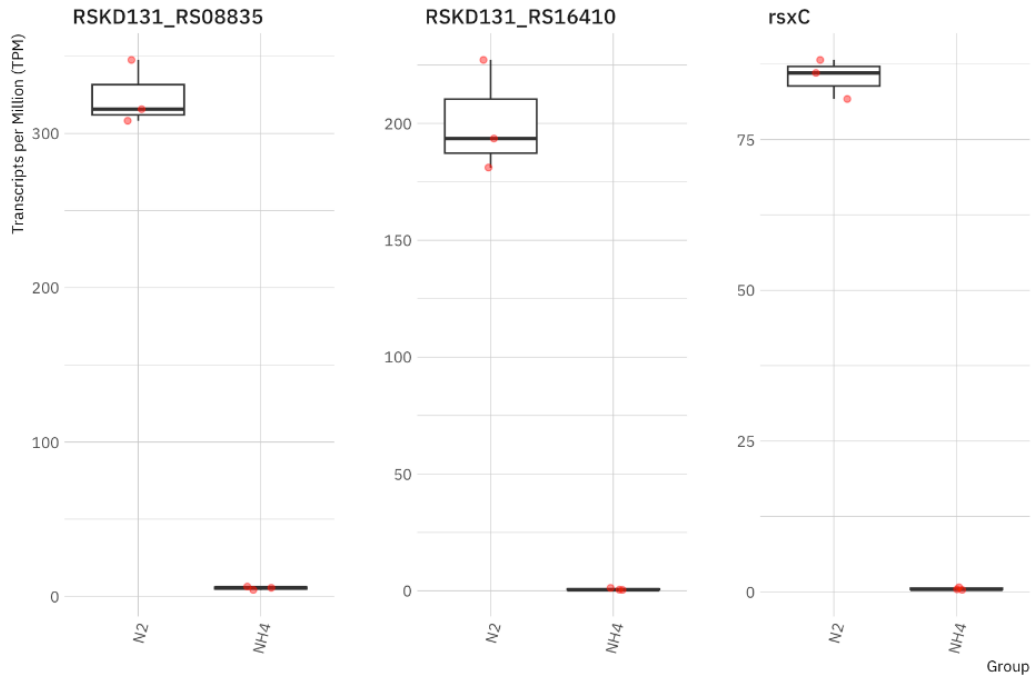
pqqE geninin NH_4 koşulunda ekspresyon seviyesi yüksektir ve kutu grafiği dar bir aralık göstermektedir. Bu durum genin bu grup içindeki ekspresyon seviyelerinin daha az değişkenlik gösterdiğini yani örnekler arasında daha homojen bir ekspresyon olduğunu göstermektedir. *pqqE* geni, Glutamat ortamında belirgin bir ekspresyon gösterir ancak *cybH* genine göre daha az varyasyon göstermektedir. *pqqE* geninin glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi oldukça düşük olup medyan çizgisi oldukça aşağıdadır ve medyan değeri ise sıfıra yakındır.

RSKD131_RS08835 geninin Glutamat koşulunda ekspresyon seviyesi diğer genlerden biraz daha farklıdır. Medyanı yüksektir fakat kutu grafiği diğer genlere göre daha geniş bir aralık göstermektedir. Bu da örnekler arasında ekspresyonun daha fazla değişkenlik gösterdiğini ifade etmektedir. Genin yüksek varyasyonu ise bazı örneklerde çok yüksek ekspresyon seviyelerine ulaşırken diğerlerinde daha düşük seviyelerde gözlemlenmektedir. *RSKD131_RS08835* geninin NH_4 koşulunda ekspresyon seviyesi ise diğer genlerde olduğu gibi bu koşulda da oldukça düşüktür ve neredeyse sıfıra yakındır. Kutu grafiği dar ve sıfıra yakın bir medyan göstermektedir. Bu da *RSKD131_RS08835* geninin NH_4 koşulunda düşük ekspresyon seviyesine sahip olduğunu veya aktif olmadığını göstermektedir.

Bu analiz, genlerin Glutamat ve NH_4 koşulları altındaki farklı ekspresyon seviyelerini net bir şekilde ortaya koymakta ve Glutamat grubunun gen aktivitesini önemli ölçüde artırdığını göstermektedir. Ayrıca iki genin Glutamat ortamında aktif olması Glutamatın hücresel açıdan önemli olduğunu gösterir. NH_4 ortamında bu genlerin ekspresyonunun düşük olması amonyumun bu genlerin aktivasyonunu desteklemediğini veya genlerin NH_4 varlığında baskılandığını göstermektedir.

4.5.6.3. Karşılaştırma 3 için diferansiyel ekspresyon

Şekil 4.27’de, *RSKD131_RS08835*, *RSKD131_RS16410* ve *rsxC* genlerinin N_2 ve NH_4 koşullarında Transkript Milyon Başına (TPM) ekspresyon seviyelerinin dağılımı gösterilmektedir. Grafik, genlerin farklı koşullardaki ekspresyon seviyelerini karşılaştırarak genlerin hangi koşullarda daha aktif olduğunu veya baskılandığını incelememize olanak sağlamaktadır.



Şekil 4.27 Karşılaştırma 3 için en anlamlı değişkenlik gösteren 3 genin normalize edilmiş okuma dağılımları

RSKD131_RS08835 geninin N₂ koşulundaki ekspresyonu ortalama 300 TPM civarındadır. Medyanı yüksek ve kutu grafiği dar bir aralıktadır. Bu da örnekler arasında nispeten homojen bir ekspresyon gösterir ve ekspresyonun homojen olması genin stabil ve kontrollü bir şekilde olduğunu göstermektedir. Homojen ekspresyon, örnekler arasındaki varyasyonun düşük olduğunu ifade etmektedir. Grafikte görülen kırmızı noktalar N₂ koşulunda gözlemlenen bazı uç değerlerdir. *RSKD131_RS08835* geninin NH₄ koşulundaki ekspresyon seviyesi ise oldukça düşüktür. Kutu grafiği ve medyan çizgisi neredeyse sıfıra yakındır. Bu durum *RSKD131_RS08835* geninin NH₄ varlığında düzenleyici mekanizmalar tarafından baskılandığını veya inaktif hale getirildiğini göstermektedir.

RSKD131_RS16410 geninin N₂ koşulunda ekspresyon seviyesi, 200 TPM civarında ortanca bir değere sahiptir ve kutu grafiği geniş bir aralığı kapsar. Kutunun daha geniş olması bu genin N₂ ortamında daha değişken bir ekspresyon sergilediğini ve örnekler arasında daha büyük farklılıklar olduğunu göstermektedir. Grafikte bazı uç değerler mevcuttur uç değerlerin varlığı bazı örneklerde genin daha yüksek veya daha düşük ekspresyon gösterdiğini ifade etmektedir. Kırmızı noktalar da bu koşulda genin bazı örneklerde normalden daha yüksek veya düşük değerlere sahip olabileceğini desteklemektedir. *RSKD131_RS16410* geninin NH₄ koşulunda ekspresyonu oldukça

düşüktür ve diğer genlerde olduğu gibi *RSKD131_RS16410* geninin de medyan değeri sifira yakındır. Bu durum bu genin NH_4 koşulunda baskılandığını ya da aktif olmadığını belirtmektedir.

rsxC geninin N_2 koşulunda ekspresyon seviyesi oldukça düşük (75 TPM civarında) olmasına rağmen kutunun dar aralığı, örnekler arasındaki varyasyonun az olduğunu ve genin nispeten homojen bir şekilde ifade edildiğini göstermektedir. Grafikte kırmızı uç değerler bulunmaktadır fakat bu değerler oldukça yakın olup genelde ekspresyon seviyeleri gözlenmektedir. *rsxC* geninin NH_4 koşulunda ekspresyonu neredeyse sifira yakındır. Bu *rsxC* geninin NH_4 koşulunda fonksiyonunun baskılandığını veya inaktif hale geldiğini göstermektedir.

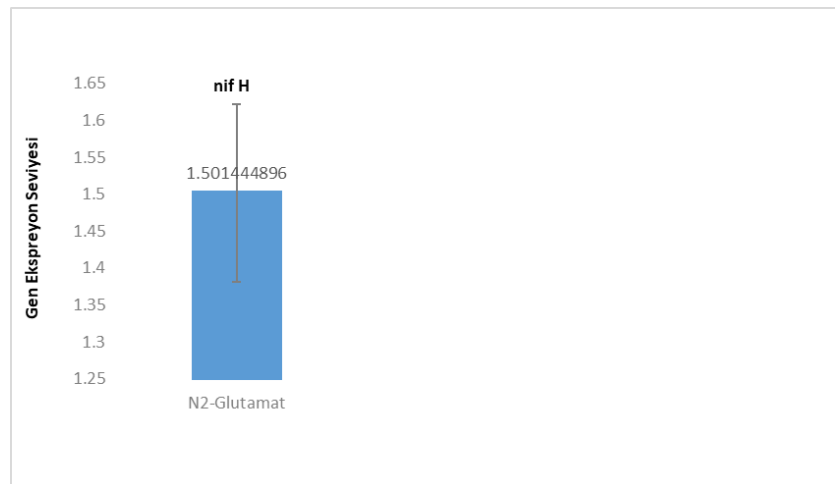
Her üç gen de N_2 koşulunda daha yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir. *RSKD131_RS08835* geninin N_2 koşulundaki ekspresyonu daha homojen ve yüksek iken, *RSKD131_RS16410* geninin ekspresyonu daha değişken bir yapı sergilemektedir. *rsxC* geninin N_2 koşulundaki ekspresyonu ise daha düşük seviyede ve daha sabit bir yapıya sahiptir. NH_4 koşulunda ise bu genlerin ekspresyonu oldukça düşüktür. Bu durum, bu üç gen içinde N_2 koşulunda gen aktivitesini artırdığını ve NH_4 koşulunda ise gen ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. N_2 'nin gen ekspresyonunu artırdığı, NH_4 'ün ise bu genlerin baskılanmasına yol açtığı gözlemlenebilmektedir. Bu genler, N_2 ve NH_4 gibi nitrojen kaynaklarına bağlı metabolik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. N_2 'nin varlığında genlerin aktif hale gelmesi bu genlerin nitrojen metabolizmasına dahil olduğunu göstermektedir.

4.6. Üç Farklı Koşulda Çoğaltılan *Cereibacter sphaeroides*'ten *nifH* Ekspresyon Analizi

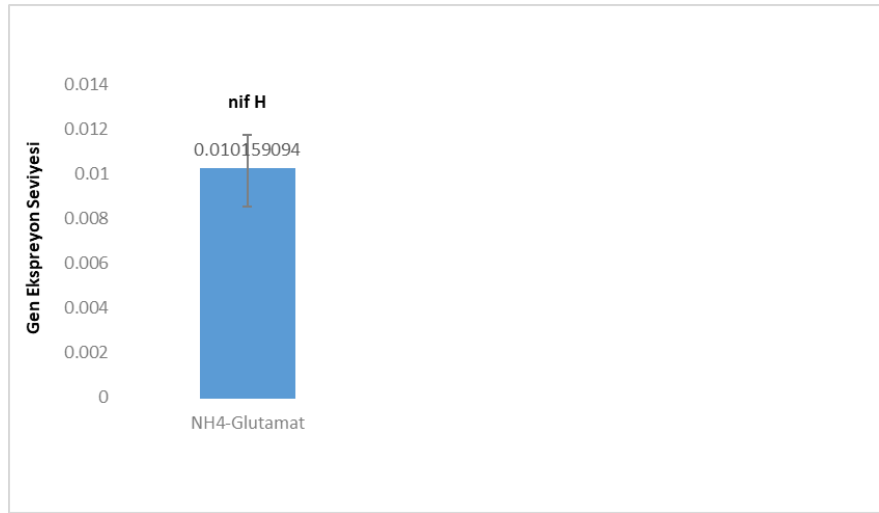
Bu tez kapsamında üç farklı azot koşulunda (glutamat, N_2 ve NH_4) çoğaltılan *C. sphaeroides* O.U.001'de bulunan *nifH* geninden gen ekspresyon analizi yapılmıştır. *nifH* geni *C. sphaeroides*'te bulunan Mo-nitrojenaz enziminin alt birimi olan Fe-Proteini kodlayan bir gendir. Hücrede nitrojenaz enziminin yüksek ifade edilmesi gen ekspresyonunun da yüksek olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada ise farklı azot kaynaklarında çoğaltılan bakterinin nitrojenaz enzimi üzerindeki gen ifade düzeylerinde meydana gelen değişim araştırılmıştır. Kantitatif PCR (qPCR) ile gen ifade analizi yapılmıştır. Gen ifade analizi *nifH* geni referans gen (housekeeping gene) olan 16S rRNA'ya oranlanarak yapılmıştır. Gen ifade analizi sonrası $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ yöntemi kullanılarak

hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi ile her bir koşula ait *nifH* gen ifadesi hem referans gene göre hem de kontrol grubuna göre oranlanarak hesaplanmıştır.

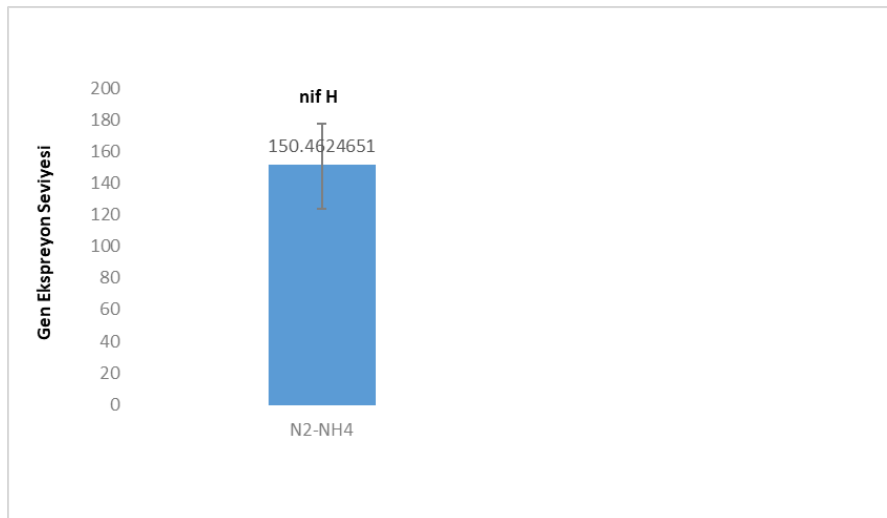
qPCR sonuçlarına göre gen ekspresyon seviyeleri ($2^{-\Delta\Delta CT}$) üç farklı azot kaynağından (glutamat, N_2 ve NH_4) deneysel olarak incelendi. Şekil 4.28’de *nifH* geninin ekspresyonunun glutamat koşuluna kıyasla N_2 koşulunda 1,5 kat bir artış gösterdiği tespit edildi. Şekil 4.29’a göre *nifH* geninin ekspresyonu glutamat koşuluna kıyasla NH_4 koşulunda 0,01 kat değişim meydana geldiği tespit edildi. Bu, gen ekspresyonunun baskılandığını ve neredeyse hiç aktif olmadığını göstermektedir. NH_4 burada negatif bir düzenleyici olarak rol almıştır. Şekil 4.30’da ise *nifH* geninin ekspresyonu NH_4 koşuluna kıyasla N_2 koşulunda 150 kat bir artış gösterdiği tespit edildi. qPCR sonuçları ile transkriptom analizi sonuçları birbirlerini destekleyici nitelikte bulundu. Transkriptom analizi sonucu ve qPCR analiz sonuçlarına göre nitrojenaz enzim sisteminde rol alan genler ortamda bulunan azot kaynağına göre değişiklik göstermektedir. Glutamat ortamında daha nötr bir şekilde ifade seviyesi bulunurken N_2 ortamında bu genler yukarı regüle halde NH_4 koşulunda ise ortamda kullanıma hazır bir N kaynağı bulunduğu için nitrojenaz enzimine gerek olmamaktadır ve bu yüzden NH_4 koşulunda bu genlerin ifadeleri baskılanmaktadır veya aşağı regüle edilmektedir.



Şekil 4.28. N_2 ve Glutamat koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması



Şekil 4.29. NH₄ ve Glutamat koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması



Şekil 4.30. N₂ ve NH₄ koşullarında gen ekspresyon karşılaştırması

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu çalışma kapsamında karbon kaynakları için malat kullanılırken azot kaynağı olarak üç farklı azot kullanılarak oluşturulan koşullarda (glutamat, N₂ ve NH₄) çoğaltılan bakterilerden transkriptomik analiz ve transkriptomik analizi destekleyecek nitelikte qPCR analizi yapılmıştır. Çalışma sonuçlarımız hipotezimizi destekler niteliktedir. Diazotrofik koşullarda çoğaltılan *C. sphaeroides*'in azot fiksasyonunda görevli genlerin ifadeleri önemli ölçüde artarken (up regulation=yukarı düzenleme); NH₄'lü ortamda çoğaltılan bakterilerin azot fiksasyonunda rol alan genler ise aşağı (down regulation) düzenlemeyle sonuçlanmıştır. Protein kodlayan her bir genin üç farklı koşuldaki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Besiyeri ortamına N₂ gazı verildiğinde bakteriler N₂ ile azot fiksasyonu yapacağı için nitrojenaz enzim seviyesi artış gösterecektir. Böylece bu hipotezi destekler şekilde nitrojenaz enziminin regülasyonu ve nitrojenaz enzim metabolizmasında görev alan genler ortaya çıkarılmıştır. Nitrojenaz ortamda bulunan N₂ gazını NH₃'e dönüştürür ve kullanılabilir hale getirdiği için ortama ürün olarak doğrudan NH₄ eklendiği zaman bakteri ortamda hazır azotlu bileşiğin (NH₄) var olduğunu ve bu sebepten nitrojenaz enziminin çalışmasına/aktivitesine ihtiyaç olmadığını algılayacaktır ve enzim üretimi üzerinde bir represyon sağlanacaktır. Azot kaynağı olarak NH₄'ün kullanıldığı bu düzenekte, NH₄'ün nitrojenaz enzim üzerindeki negatif regülasyonu hakkında bilgi edinilmiştir. Tez kapsamında yapılan analiz ve deney sonuçları birbirine paralellik göstermiştir ve anlam olarak tutarlıdır. Tez çalışması kapsamında yapılan RNA-Seq tabanlı transkriptom çalışması aynı koşullarda proteomik analiz sonuçları ile birbirini tamamlayıcı nitelikte olacak ve bütüncül bir sonuç ortaya çıkacaktır. Tez çalışması ile hem nitrojenaz enziminin regülasyonu ve nitrojenaz enzim metabolizmasında görev alan genler ortaya çıkarılmıştır hem de NH₄ metabolizmasında görev alan genler ortaya çıkarılarak literatüre katkı sağlanmıştır.

5.2 Öneriler

- ✓ Azot kaynağı olarak N₂'nin kullanıldığı koşullarda gen ifadesi yüksek olan genlerin promotor elementleri rekombinant DNA çalışmalarında kullanılabilir.
- ✓ N₂'li koşulda nitrojenaz enzimleri daha çok çalıştığı için bakterileri önce N₂'li koşulda büyütüp daha sonra hidrojen koşullarına geçirilip hidrojen üretimi tetiklenebilir.
- ✓ *C. sphaeroides*'in azot fiksasyon kabiliyeti yüksek olduğu için diazotrofik koşullarında büyütülüp gübre olarak kullanılabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abd-Elnaby, M., Alfonse, M., & Roushdy, M. (2021). Classification of breast cancer using microarray gene expression data: A survey. *Journal of Biomedical Informatics*, *117*, 103764. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2021.103764>
- Addison, H., Glatter, T., Hochberg, G. K. A., & Rebelein, J. G. (2024). Two distinct ferredoxins are essential for nitrogen fixation by the iron nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *mBio*, *15*(3), e03314-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.03314-23>
- AlJanahi, A. A., Danielsen, M., & Dunbar, C. E. (2018). An Introduction to the Analysis of Single-Cell RNA-Sequencing Data. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *10*, 189. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.07.003>
- Ambardar, S., Gupta, R., Trakroo, D., Lal, R., & Vakhlu, J. (2016). High Throughput Sequencing: An Overview of Sequencing Chemistry. *Indian Journal of Microbiology*, *56*(4), 394. <https://doi.org/10.1007/S12088-016-0606-4>
- Arai, H., Jung, H. R., & Kaplan, S. (2007). Transcriptome Dynamics during the Transition from Anaerobic Photosynthesis to Aerobic Respiration in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Journal of Bacteriology*, *190*(1), 286. <https://doi.org/10.1128/jb.01375-07>
- Artika, I. M., Dewi, Y. P., Nainggolan, I. M., Siregar, J. E., & Antonjaya, U. (2022). Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*, *13*(12), 2387. <https://doi.org/10.3390/genes13122387>
- Athanasopoulou, K., Boti, M. A., Adamopoulos, P. G., Skourou, P. C., & Scorilas, A. (2022). Third-Generation Sequencing: The Spearhead towards the Radical Transformation of Modern Genomics. *Life*, *12*(1). <https://doi.org/10.3390/life12010030>
- Basak, N., & Das, D. (2009). Photofermentative hydrogen production using purple non-sulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in an annular photobioreactor: A case study. *Biomass and Bioenergy*, *33*(6-7), 911-919. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2009.02.007>
- Bathke, J., Konzer, A., Remes, B., McIntosh, M., & Klug, G. (2019). Comparative analyses of the variation of the transcriptome and proteome of *Rhodobacter sphaeroides* throughout growth. *BMC Genomics*, *20*(1), 358. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5749-3>
- Bauer, C. E., & Wu, J. (2008). RegB/RegA, A Global Redox-Responding Two-Component System. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *631*, 131-148. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78885-2_9
- Beckers, G., Bendt, A. K., Krämer, R., & Burkovski, A. (2004). Molecular identification of the urea uptake system and transcriptional analysis of urea transporter- and urease-encoding genes in *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Bacteriology*, *186*(22), 7645-7652. <https://doi.org/10.1128/jb.186.22.7645->

7652.2004/asset/4c151570-fe7d-4984-97f5-84d0c76fd360/assets/graphic/zjb0220442050004.jpeg

- Bertone, P., & Snyder, M. (2005). Advances in functional protein microarray technology. *The FEBS Journal*, 272(21), 5400-5411. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04970.x>
- Besier, S., Ludwig, A., Brade, V., & Wichelhaus, T. A. (2003). Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 47(2), 463-469. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03307.x>
- Broglia, L., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2023). Methodologies for bacterial ribonuclease characterization using RNA-seq. *FEMS Microbiology Reviews*, 47(5), fuad049. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuad049>
- Buccitelli, C., & Selbach, M. (2020). mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nature Reviews Genetics* 2020 21:10, 21(10), 630-644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
- Camarena, L., & Dreyfus, G. (2020). Living in a Foster Home: The Single Subpolar Flagellum Fla1 of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomolecules*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/biom10050774>
- Cereibacter sphaeroides* KD131; KCTC 12085 *carB*. (t.y.). Geliş tarihi 28 Aralık 2024, gönderen https://biocyc.org/gene?orgid=gcf_000021005&id=rskd131_rs10580#showall
- Chen, G., Ning, B., & Shi, T. (2019). Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis. *Frontiers in Genetics*, 10(APR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00317>
- Chu, Y., & Corey, D. R. (2012). RNA Sequencing: Platform Selection, Experimental Design, and Data Interpretation. *Nucleic Acid Therapeutics*, 22(4), 271. <https://doi.org/10.1089/nat.2012.0367>
- Demtröder, L., Narberhaus, F., & Masepohl, B. (2019). Coordinated regulation of nitrogen fixation and molybdate transport by molybdenum. *Molecular Microbiology*, 111(1), 17-30. <https://doi.org/10.1111/mm1.14152>
- Ding, S., Chen, X., & Shen, K. (2020). Single-cell RNA sequencing in breast cancer: Understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy. *Cancer Communications*, 40(8), 329. <https://doi.org/10.1002/cac2.12078>
- DNA Mikroarray Teknolojisi - Lab Akademi*. (t.y.-a). Geliş tarihi 10 Ocak 2023, gönderen <https://labakademi.com/dna-mikroarray-teknolojisi/>
- Dubbs, J. M., & Tabita, F. R. (2004). Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(3), 353-376. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.01.002>

- Eady, R. R. (1991). The Mo-, V-, and Fe-Based Nitrogenase Systems of *Azotobacter*. *Advances in Inorganic Chemistry*, 36(C), 77-102. [https://doi.org/10.1016/S0898-8838\(08\)60037-9](https://doi.org/10.1016/S0898-8838(08)60037-9)
- Eady, R. R. (1996). Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chemical Reviews*, 96(7), 3013-3030. https://doi.org/10.1021/cr950057h/asset/cr950057h.fp.png_v03
- Ehrenreich, A. (2006). DNA microarray technology for the microbiologist: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006 73:2, 73(2), 255-273. <https://doi.org/10.1007/S00253-006-0584-2>
- Einsle, O., & Rees, D. C. (2020). Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. *Chemical reviews*, 120(12), 4969. <https://doi.org/10.1021/ACS.chemrev.0c00067>
- Elsen, S., Jaubert, M., Pignol, D., & Giraud, E. (2005). PpsR: a multifaceted regulator of photosynthesis gene expression in purple bacteria. *Molecular Microbiology*, 57(1), 17-26. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2005.04655.X>
- Engstrom-Melnyk, J., Rodriguez, P. L., Peraud, O., & Hein, R. C. (2015). Clinical Applications of Quantitative Real-Time PCR in Virology. *Methods in Microbiology*, 42, 161-197. <https://doi.org/10.1016/bs.mm.2015.04.005>
- Garcia, A. K., McShea, H., Kolaczowski, B., & Kaçar, B. (2020). Reconstructing the evolutionary history of nitrogenases: Evidence for ancestral molybdenum-cofactor utilization. *Geobiology*, 18(3), 394. <https://doi.org/10.1111/GBI.12381>
- Govindarajan, R., Duraiyan, J., Kaliyappan, K., & Palanisamy, M. (2012). Microarray and its applications. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(Suppl 2), S310. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100283>
- Gu, Z. (2022). Complex heatmap visualization. *iMeta*, 1(3), e43. <https://doi.org/10.1002/IMT2.43>
- Ham, H., & Park, D. S. (2023). Novel approach toward the understanding of genetic diversity based on the two types of amino acid repeats in *Erwinia amylovora*. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44558-w>
- Hashimoto, S., Wongdee, J., Songwattana, P., Greetatorn, T., Goto, K., Tittabutr, P., Boonkerd, N., Teaumroong, N., & Uchiumi, T. (2019). Homocitrate Synthase Genes of Two Wide-Host-Range Bradyrhizobium Strains are Differently Required for Symbiosis Depending on Host Plants. *Microbes and Environments*, 34(4), 393. <https://doi.org/10.1264/jsme2.me19078>
- Heller, M. J. (2003). DNA Microarray Technology: Devices, Systems, and Applications. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438>, 4, 129-153. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.020702.153438>

- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z. Y., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2014). Mechanism of Nitrogen Fixation by Nitrogenase: The Next Stage. *Chemical Reviews*, 114(8), 4041. <https://doi.org/10.1021/cr400641x>
- Hoffmann, M. C., Pfaänder, Y., Fehringer, M., Narberhaus, F., & Masepohl, B. (2014). NifA- and CoxA-Coordinated cowN Expression Sustains Nitrogen Fixation by *Rhodobacter capsulatus* in the Presence of Carbon Monoxide. *Journal of Bacteriology*, 196(19), 3494. <https://doi.org/10.1128/jb.01754-14>
- Holmes, D. E., Nevin, K. P., & Lovley, D. R. (2004). Comparison of 16S rRNA, nifD, recA, gyrB, rpoB and fusA genes within the family Geobacteraceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1591-1599. <https://doi.org/10.1099/IJS.0.02958-0/cite/refworks>
- Hrdlickova, R., Toloue, M., & Tian, B. (2016). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 8(1), 10.1002/wrna.1364. <https://doi.org/10.1002/wrna.1364>
- Hu, J., Zeng, C., Liu, G., Ren, Z. J., Luo, H., & Teng, M. (2023). Carbon dots internalization enhances electroactive biofilm formation and microbial acetate synthesis. *Journal of Cleaner Production*, 411, 137333. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.137333>
- Hu, Y., Lee, C. C., & Ribbe, M. W. (2011). Vanadium Nitrogenase: A Two-Hit Wonder? *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 41(4), 10.1039/c1dt11535a. <https://doi.org/10.1039/c1dt11535a>
- Hu, Y., Lee, C. C., & Ribbe, M. W. (2012). Vanadium Nitrogenase: A Two-Hit Wonder? *Dalton transactions (Cambridge, England: 2003)*, 41(4), 1118-1127. <https://doi.org/10.1039/c1dt11535a>
- Hu, Y., & Ribbe, M. W. (2011). Biosynthesis of the Metalloclusters of Molybdenum Nitrogenase. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 75(4), 664. <https://doi.org/10.1128/mmbr.05008-11>
- Hu, Y., & Ribbe, M. W. (2013). Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(19), 13173. <https://doi.org/10.1074/jbc.r113.454041>
- Hu, Y., & Ribbe, M. W. (2015). Nitrogenase and Homologs. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 20(2), 435. <https://doi.org/10.1007/s00775-014-1225-3>
- Jasniewski, A. J., Lee, C. C., Ribbe, M. W., Ribbe, M. W., & Hu, Y. (2020). Reactivity, Mechanism, and Assembly of the Alternative Nitrogenases. *Chemical reviews*, 120(12), 5107. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00704>
- Jazayeri, S. M., Melgarejo Muñoz, L. M., & Romero, H. M. (2015). RNA-SEQ: A Glance At Technologies And Methodologies. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 23-35. <https://doi.org/10.15446/ABC.V20N2.43639>

- Jeong, E. L., Broad, S. J., Moody, R. G., & Phillips-Jones, M. K. (2020). The adherence-associated Fdp fasciclin I domain protein of the biohydrogen producer *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by the global Prr pathway. *International Journal of Hydrogen Energy*, *45*(51), 26840. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.07.108>
- Jiang, Z., Zhou, X., Li, R., Michal, J. J., Zhang, S., Dodson, M. V., Zhang, Z., & Harland, R. M. (2015). Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *72*(18), 3425. <https://doi.org/10.1007/S00018-015-1934-Y>
- Jolliffe, I. T., & Cadima, J. (2016). Principal component analysis: a review and recent developments. *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*, *374*(2065), 20150202. <https://doi.org/10.1098/rsta.2015.0202>
- Kars, G., & Alparlan, Ü. (2013). Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 in a biorefinery concept. *International Journal of Hydrogen Energy*, *38*(34), 14488-14494. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.09.050>
- Kars, G., & Alparlan, Üm. (2014). Heterologous expression of glutamyl-tRNA reductase gene in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 to enhance 5-aminolevulinic acid production. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, *28*(6), 1034. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.978170>
- Kars, G., Gündüz, U., Yücel, M., Türker, L., & Eroglu, I. (2006). Hydrogen production and transcriptional analysis of *nifD*, *nifK* and *hupS* genes in *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 grown in media with different concentrations of molybdenum and iron. *International Journal of Hydrogen Energy*, *31*(11), 1536-1544. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.021>
- Keseler, I. M., Gama-Castro, S., Mackie, A., Billington, R., Bonavides-Martínez, C., Caspi, R., Kothari, A., Krummenacker, M., Midford, P. E., Muñoz-Rascado, L., Ong, W. K., Paley, S., Santos-Zavaleta, A., Subhraveti, P., Tierrafría, V. H., Wolfe, A. J., Collado-Vides, J., Paulsen, I. T., & Karp, P. D. (2021). The EcoCyc Database in 2021. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.711077/full>
- Khozyainova, A. A., Valyaeva, A. A., Arbatsky, M. S., Isaev, S. V., Iamshchikov, P. S., Volchkov, E. V., Sabirov, M. S., Zainullina, V. R., Chechekhin, V. I., Vorobev, R. S., Menyailo, M. E., Tyurin-Kuzmin, P. A., & Denisov, E. V. (2023). Complex Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Data. *Biochemistry. Biokhimiia*, *88*(2), 231. <https://doi.org/10.1134/S0006297923020074>
- Kogenaru, S., Qing, Y., Guo, Y., & Wang, N. (2012). RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. *BMC Genomics*, *13*(1), 629. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-629>
- Kolodziejczyk, A. A., Kim, J. K., Svensson, V., Marioni, J. C., & Teichmann, S. A. (2015). The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Molecular*

- Cell*, 58(4), 610-620. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.005/asset/3c77edc6-ef00-489f-829a-1288953d6c94/main.assets/gr3.jpg>
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, 54(4), 391. <https://doi.org/10.1007/S13353-013-0173-X>
- Kukurba, K. R., & Montgomery, S. B. (2015). RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harbor protocols*, 2015(11), 951. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>
- Kumar, A., Goel, G., Fehrenbach, E., Puniya, A. K., & Singh, K. (2005). Microarrays: The Technology, Analysis and Application. *Engineering in Life Sciences*, 5(3), 215-222. <https://doi.org/10.1002/elsc.200420075>
- Kuyuk, S. A., & Ercan, I. (2017). Commonly used statistical methods for detecting differential gene expression in microarray experiments. *Biostatistics and Epidemiology International Journal*, 0(0), 1-8. <https://doi.org/10.30881/beij.00001>
- Lee, C. C., Hu, Y., & Ribbe, M. W. (2010). Vanadium Nitrogenase Reduces CO*. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5992), 642. <https://doi.org/10.1126/science.1191455>
- Leidenfrost, R. M., Wappler, N., & Wünschiers, R. (2020). Draft Genome Assembly of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 Substrain H2 from Nanopore Data. *Microbiology Resource Announcements*, 9(29). <https://doi.org/10.1128/mra.00414-20>
- Li, Q., Li, Y., Li, X., & Chen, S. (2021). Identification of genes involved in fe-s cluster biosynthesis of nitrogenase in *paenibacillus polymyxa* wly78. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7), 3771. <https://doi.org/10.3390/ijms22073771/s1>
- Li, X., & Wang, C. Y. (2021). From bulk, single-cell to spatial RNA sequencing. *International Journal of Oral Science*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/S41368-021-00146-0>
- Lin, B., Hui, J., & Mao, H. (2021). Nanopore Technology and Its Applications in Gene Sequencing. *Biosensors*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/bios11070214>
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., & Law, M. (2012). Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 11. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>
- López-Torrejón, G., Burén, S., Veldhuizen, M., & Rubio, L. M. (2021). Biosynthesis of cofactor-activatable iron-only nitrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 14(3), 1073. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13758>
- Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 265. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- Mackenzie, C., Choudhary, M., Larimer, F. W., Predki, P. F., Stilwagen, S., Armitage, J. P., Barber, R. D., Donohue, T. J., Hosler, J. P., Newman, J. E., Shapleigh, J. P., Sockett, R. E., Zeilstra-Ryalls, J., & Kaplan, S. (2001). The home stretch, a first

- analysis of the nearly completed genome of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Photosynthesis Research*, 70(1), 19-41. <https://doi.org/10.1023/a:1013831823701/metrics>
- Maeda, I. (2022). Potential of Phototrophic Purple Nonsulfur Bacteria to Fix Nitrogen in Rice Fields. *Microorganisms*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010028>
- McGettigan, P. A. (2013). Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(1), 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.12.008>
- Merrick, M. J., & Edwards, R. A. (1995). Nitrogen Control in Bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(4), 604-622.
- Milton, R. D., & Minter, S. D. (2019). Nitrogenase Bioelectrochemistry for Synthesis Applications. *Accounts of Chemical Research*, 52(12), 3351-3360. https://doi.org/10.1021/acs.accounts.9b00494/asset/images/medium/ar9b00494_0007.gif
- Mougiakos, I., Orsi, E., Ghiffary, M. R., Post, W., de Maria, A., Adiego-Perez, B., Kengen, S. W. M., Weusthuis, R. A., & van der Oost, J. (2019). Efficient Cas9-based genome editing of *Rhodobacter sphaeroides* for metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 204. <https://doi.org/10.1186/S12934-019-1255-1>
- Niel, C. B. van. (1944). The Culture, General Physiology, Morphology, And Classification Of The Non-Sulfur Purple And Brown Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 8(1), 1-118. <https://doi.org/10.1128/br.8.1.1-118.1944>
- Nonaka, A., Yamamoto, H., Kamiya, N., Kotani, H., Yamakawa, H., Tsujimoto, R., & Fujita, Y. (2019). Accessory proteins of the nitrogenase assembly, NifW, NifX/NafY, and NifZ, are essential for diazotrophic growth in the nonheterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR), 495. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00495/full>
- Nouwen, N., Arrighi, J. F., Cartieaux, F., Chaintreuil, C., Gully, D., Klopp, C., & Giraud, E. (2017). The role of rhizobial (NifV) and plant (FEN1) homocitrate synthases in *Aeschynomene*/photosynthetic *Bradyrhizobium* symbiosis. *Scientific Reports*, 7(1), 448. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-00559-0>
- Oh, J.-I., & Kaplan, S. (2001). Generalized approach to the regulation and integration of gene expression. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1116-1123. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2001.02299.X>
- Orsi, E., Beekwilder, J., Eggink, G., Kengen, S. W. M., & Weusthuis, R. A. (2021). The transition of *Rhodobacter sphaeroides* into a microbial cell factory. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(2), 531. <https://doi.org/10.1002/bit.27593>
- Pandey, R., Armitage, J. P., & Wadhams, G. H. (2017). Use of transcriptomic data for extending a model of the AppA/PpsR system in *Rhodobacter sphaeroides*. *BMC Systems Biology*, 11(1), 146. <https://doi.org/10.1186/S12918-017-0489-Y>

- Payá-Tormo, L., Echavarri-Erasun, C., Makarovskiy-Saavedra, N., Pérez-González, A., Yang, Z. Y., Guo, Y., Seefeldt, L. C., & Rubio, L. M. (2024). Iron-molybdenum cofactor synthesis by a thermophilic nitrogenase devoid of the scaffold NifEN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *121*(46), e2406198121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2406198121>
- Pervez, M. T., Hasnain, M. J. U., Abbas, S. H., Moustafa, M. F., Aslam, N., & Shah, S. S. M. (2022). A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *BioMed Research International*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/3457806>
- Peters, A. E., Bavishi, A., Cho, H., & Choudhary, M. (2012). Evolutionary constraints and expression analysis of gene duplications in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *BMC Research Notes*, *5*, 192. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-192>
- Pope, S. D., & Medzhitov, R. (2018). Emerging Principles of Gene Expression Programs and Their Regulation. *Molecular Cell*, *71*(3), 389-397. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.017/asset/1a4ece70-8340-426b-a40e-87808dde3104/main.assets/gr4.jpg>
- Porter, S. L., Wilkinson, D. A., Byles, E. D., Wadhams, G. H., Taylor, S., Saunders, N. J., & Armitage, J. P. (2011). Genome Sequence of *Rhodobacter sphaeroides* Strain WS8N. *Journal of Bacteriology*, *193*(15), 4027. <https://doi.org/10.1128/JB.05257-11>
- Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T. D., Harris, S. R., Connor, T. R., Bertoni, A., Swerdlow, H. P., & Gu, Y. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, *13*(1), 341. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-341>
- Rashid, B., Husnain, T., & Riazuddin, S. (2014). Genomic Approaches and Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance: Biological Techniques*, *1*, 1-37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800876-8.00001-1>
- Ribbe, M. W., Górecki, K., Grosch, M., Solomon, J. B., Quechol, R., Liu, Y. A., Lee, C. C., & Hu, Y. (2022). Nitrogenase Fe Protein: A Multi-Tasking Player in Substrate Reduction and Metallocluster Assembly. *Molecules*, *27*(19). <https://doi.org/10.3390/molecules27196743>
- Ricagno, S., de Rosa, M., Aliverti, A., Zanetti, G., & Bolognesi, M. (2007). The crystal structure of FdxA, a 7Fe ferredoxin from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *360*(1), 97-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.013>
- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., & Dean, D. R. (2009). Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. *Annual review of biochemistry*, *78*, 701. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.070907.103812>

- Seefeldt, L. C., Hoffman, B. M., & Dean, D. R. (2012). Electron Transfer in Nitrogenase Catalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 16(1-2), 19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.02.012>
- Seefeldt, L. C., Yang, Z. Y., Duval, S., & Dean, D. R. (2013). Nitrogenase reduction of carbon-containing compounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(8-9), 1102-1111. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.04.003>
- Segundo-Val, I. S., & Sanz-Lozano, C. S. (2016). Introduction to the Gene Expression Analysis. *Methods in Molecular Biology*, 1434, 29-43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3652-6_3
- Seifert, K., Thiel, M., Wicher, E., Wodarczak, M., & aniecki, M. (2012). Microbiological Methods of Hydrogen Generation. *Biogas*. <https://doi.org/10.5772/33563>
- Shi, H., Li, Y., Hao, T., Liu, X., Zhao, X., & Chen, S. (2020). The Role of Fnr Paralogs in Controlling Anaerobic Metabolism in the Diazotroph *Paenibacillus polymyxa* WLY78. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(10). <https://doi.org/10.1128/aem.03012-19>
- Sippel, D., & Einsle, O. (2017). The structure of vanadium nitrogenase reveals an unusual bridging ligand. *Nature chemical biology*, 13(9), 956. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2428>
- Slatko, B. E., Gardner, A. F., & Ausubel, F. M. (t.y.). *Overview of Next Generation Sequencing Technologies*. <https://doi.org/10.1002/cpmb.59>
- Stintzi, A. (2003). Gene expression profile of *Campylobacter jejuni* in response to growth temperature variation. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 2009-2016. <https://doi.org/10.1128/jb.185.6.2009-2016.2003/asset/733d8980-0da3-404d-9231-eee2d3b78f19/assets/graphic/jb0631135003.jpeg>
- Sun, K., Liu, Y., Zhou, X., Yin, C., Zhang, P., Yang, Q., Mao, L., Shentu, X., & Yu, X. (2022). Nanopore sequencing technology and its application in plant virus diagnostics. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.939666>
- Suwantot, A., & Kaplan, S. (1992). *A Self-Transmissible, Narrow-Host-Range Endogenous Plasmid of Rhodospirillum rubrum 2.4.1: Physical Structure, Incompatibility Determinants, Origin of Replication, and Transfer Functions*. 174(4).
- Tavares, N. K., Stracey, N., Brunold, T. C., & Escalante-Semerena, J. C. (2019). The L-Thr kinase/ L-Thr-phosphate decarboxylase (CobD) enzyme from *Methanosarcina mazei* Gö1 contains metalcenters needed for optimal activity. *Biochemistry*, 58(30), 3260. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00268>
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., & Pfaffl, M. W. (2003). Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Research*, 31(20), e122. <https://doi.org/10.1093/nar/gng122>

- Wang, H., Sha, X., Li, R., Li, Y., Khaleque, H. N., Zhang, Y., Bohu, T., Bai, Z., & Zhuang, X. (2021). Comparative genome analysis provides molecular evidence for reclassification of the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* EBL0706 as a strain of *Rhodospirillum rubrum* azotoformans. *Microorganisms*, *9*(8), 1754. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081754/s1>
- Wolf, J. B. W. (2013). Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Molecular Ecology Resources*, *13*(4), 559-572. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12109>
- Xuan, J., He, L., Wen, W., & Feng, Y. (2023). Hydrogenase and Nitrogenase: Key Catalysts in Biohydrogen Production. *Molecules*, *28*(3), 1392. <https://doi.org/10.3390/molecules28031392>
- Yang, B., Song, H., An, D., Zhang, D., Raza, S. H. A., Wang, G., Shan, X., Qian, A., Kang, Y., & Wang, C. (2019). Functional Analysis of *preA* in *Aeromonas veronii* TH0426 Reveals a Key Role in the Regulation of Virulence and Resistance to Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(1), 98. <https://doi.org/10.3390/ijms21010098>
- Yang, J., Xie, X., Wang, X., Dixon, R., & Wang, Y. P. (2014). Reconstruction and minimal gene requirements for the alternative iron-only nitrogenase in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(35), E3718. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411185111/-/dcsupplemental>
- Yu, J., Park, J. Y., Kim, Y. H., & Min, J. (2023). Evaluation of Growth and Utilization Potential of *Rhodospirillum rubrum* in Reused Medium. *Molecular Biotechnology*, *65*(3), 441-445. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00553-6/tables/1>
- Zhang, L., Chen, F. X., Zeng, Z., Xu, M., Sun, F., Yang, L., Bi, X., Lin, Y., Gao, Y. J., Hao, H. X., Yi, W., Li, M., & Xie, Y. (2021). Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 3847. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.766364/bibtex>
- Zhao, D., Curatti, L., & Rubio, L. M. (2007). Evidence for *nifU* and *nifS* participation in the biosynthesis of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(51), 37016-37025. <https://doi.org/10.1074/jbc.m708097200/attachment/f3fe5e5b-ea55-45a9-8d88-40e74af9bc3c/mmc1.pdf>
- Zhao, S., Ye, Z., & Stanton, R. (2020). Misuse of RPKM or TPM normalization when comparing across samples and sequencing protocols. *RNA*, *26*(8), 903. <https://doi.org/10.1261/RNA.074922.120>
- Ziegenhain, C., Vieth, B., Parekh, S., Reinius, B., Guillaumet-Adkins, A., Smets, M., Leonhardt, H., Heyn, H., Hellmann, I., & Enard, W. (2017). Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Molecular Cell*, *65*(4), 631-643.e4.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.023/attachment/fcade0b6-de85-4824-97a9-06f4ca38335a/mmc2.pdf>