

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Chlamydomonas reinhardtii'de COPII VEZİKÜL
ALTBİRİMİ SEC24A İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK LİNKAJ
VE FENOTİPİK ANALİZLERİ

Sevinç EVREN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



Chlamydomonas reinhardtii'de COPII VEZİKÜL
ALTBİRİMİ SEC24A İNERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK LİNKAJ
VE FENOTİPİK ANALİZLERİ

Sevinç EVREN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Chlamydomonas reinhardtii'de COPII VEZİKÜL
ALTBİRİMİ SEC24A İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK LİNKAJ
VE FENOTİPİK ANALİZLERİ

Sevinç EVREN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından FYL-2019-4902 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Chlamydomonas reinhardtii*'de COPII VEZİKÜL
ALTBİRİMİ SEC24A İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK LİNKAJ
VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sevinç EVREN
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 13/07/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY (Danışman)

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

ÖZET

***Chlamydomonas reinhardtii*'de COPII VEZİKÜL ALTBİRİMİ SEC24A İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK LİNKAJ VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sevinç EVREN

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doktor Öğretim Üyesi Münevver AKSOY

Temmuz 2020; 61 sayfa

Bu çalışmada model organizma olarak tek hücreli bir yeşil alg olan *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) kullanılmıştır. *Chlamydomonas* Center'dan alınan ve SEC24A geni 3'UTR bölgesinde insersiyona sahip olan *sec24a* mutanlığı ile İleri Genetik (forward genetic) çalışması yapılmıştır. COPII kompleksinin oluşumunda bir dizi sitoplazmik protein görev alır ve minimal üç sitozolik bileşenden, toplamda 5 farklı proteinden oluşmaktadır. Bunlar; GTPase-Sar1, Sec23/Sec24 kompleksi ve Sec13/Sec31 kompleksidir. Hücre içi salgı yolağının COPII vezikülünde kargo tanıma ve taşımada görev alan SEC24 proteininden iki paralog bulunduran *C. reinhardtii*'de, SEC24A geni üzerinde çalışılmıştır. Yapılan biyoinformatik çalışmalar sonucunda *C. reinhardtii*'de bulunan SEC24A proteini en fazla *Homo sapiens* SEC24D proteinine benzerlik gösterdiği, SEC23 proteini ile bağlanma motifinin SEC24A protein sekansı üzerinde bulunduğu ve domain yapısını koruduğu belirlenmiştir. *sec24a* hücrelerinde generatif üreme aşamaları, zigot oluşumu ve mayoz bölünme gibi aşamalarda çok bariz bir anormallik görülmemiştir. Hücre yapısında farklılıklar gözlemlenmiştir. Arilsülfataz enziminin hücre dışına salınımında bir farklılık gözlemlenmezken, alkalin fosfataz enziminin hücre dışına salgılanmasında azalma tespit edilmiştir. Sonuçlar SEC24A'nın alkalin fosfataz enziminin sekretuar yoldan dışarıya salgılanmasında görev alabileceğini göstermektedir. Bu konuda kesin bir sonuca varabilmek için ilerideki çalışmalarda mutanlığı üçüncü geriye çaprazlama yapılarak projeni testi yapılacaktır.

ANAHTAR KELİMELEER: *Chlamydomonas reinhardtii*, COPII vezikülleri, SEC24, sekretuar yolk

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

ABSTRACT

GENETIC LINKAGE AND PHENOTYPIC ANALYSES OF COPII VESICLE SUBUNIT SEC24A INSERTION MUTANTS IN *Chlamydomonas reinhardtii*

Sevinç EVREN

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

July 2020; 61 pages

Chlamydomonas reinhardtii, a unicellular microalga was used as model organism in this study. A forward genetic analysis was done using an insertional mutant *sec24a* which had an insertion in 3'UTR region. COPII complex is made of 5 different proteins. These proteins are GTPase Sar1, SEC23/SEC24 complex SEC13/SEC31 complex. SEC24 is involved in cargo recognition and study was done on SEC24A paralog of *C. reinhardtii* which has two SEC24 paralogs. Bioinformatic analysis has shown that SEC24A is most similar to human SEC24D and it contains the FXP motif which is involved in binding to SEC23. *sec24a* didn't have any detectable abnormalities in gametogenesis, zygote formation and meiosis. *sec24a* had normal arylsulfatase activity but alkaline phosphatase activity may be lower according to our colorimetric assays. Third backcross of the mutant needs to be generated in order to make a conclusion on this phenotype.

KEYWORDS: *Chlamydomonas reinhardtii*, COPII vesicles, SEC24, secretory pathway

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Emre AKSOY

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca bana destekte bulunan, hiçbir bilgisini sakınmadan benimle paylaşan ve yol gösteren sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu tez projesi BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu) tarafından FYL-2019-4902 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman motivasyonumu artıran hem eğitim hem de sosyal hayatımda ihtiyacım olduğunda yanımda olan sevgili arkadaşlarım Ümit BABACAN, Sibel KALA, Bahadır SEZER, Rabia ÖZDEMİR ve Özgün MUSUL'a teşekkür ederim. Laboratuvar olanaklarını kullanmamıza olanak sağlayan olan Prof. Dr. Faik KANTAR'a, Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak hayatımın her yerinde seçimlerimi sorgulamaksızın sabırla yanımda olan, bana maddi manevi desteğini esirgemeyen, güven veren sevgili annem Eşe ÇAKAN'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Alglerin Sınıflandırılması ve Taksonomisi	4
2.1.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ve yaşam döngüsü.....	5
2.1.2. Biyoteknolojide model organizma olarak <i>C. reinhardtii</i>	9
2.2. Sekretuar Yolak ve Hücre İçi Salgı Vezikülleri	10
2.2.1. COPII vezikülünün oluşum mekanizması	10
2.2.2. SEC24A ile ilgili yapılan çalışmalar	11
3. MATERYAL VE METOD	13
3.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar.....	13
3.1.1. TAP besiyeri	14
3.1.2. TA besiyeri	14
3.1.3. Azotsuz ortam SEM-N	14
3.1.4. Sülfatsız besiyeri.....	15
3.1.5. Paromomisinli besiyeri	15
3.2. <i>Chlamydomonas</i> Suşlarının Elde Edilmesi	15
3.3. Klon Oluşturma	15
3.4. DNA İzolasyonu.....	16
3.5. RNA İzolasyonu	17
3.6. Mutant Genomundaki İnsersiyonun PCR ile Belirlenmesi	17
3.7. RT-PCR	20
3.8. Agaroz Jel Elektroferozü ve Örneklerin Yüklenmesi	21
3.9. Antibiyotik Direnci Testi.....	22
3.10. Enzim Aktivite Testi	22

3.11. Çaprazlamave Tetratların Diseksiyonu	22
3.12. Projeni Hücrelerinde Antibiyotik Direncinin, Çiftleşme Tiplerinin ve Morfolojinin Belirlenmesi	23
3.13. Biyoinformatik Analizler	23
3.1.1. Biyoinformatik analizlerde kullanılan programlar	9
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	26
4.1. Biyoinformatik Bulgular	26
4.1.1. Hizalama analizi ve F-X-P motifinin belirlenmesi	26
4.1.2. Protein domain analizi	32
4.1.3. Protein 3D yapı konformasyonu ve F-X-P motifinin 3D yapıda belirlenmesi	33
4.1.4. Protein lokalizasyon analizi	36
4.2. Deneysel Bulgular	38
4.2.1. Paromomisin direnci	38
4.2.2. Arilsülfataz ve Alkalenfosfotaz aktivitesi	39
4.2.3. Klonlarda insersiyon bölgesinin PCR analizi	42
4.2.4. Klonların RT-PCR analizi	43
4.2.5. <i>sec24a</i> mutantının hücre yapısı ve anormallikleri	44
4.2.6. <i>sec24a</i> mutantının çaprazlama ve zigotik yeteneklerinin incelenmesi	46
4.2.7. Projenilerin analizleri	49
4.2.8. Projenilerin renk ve morfolojisi	50
4.2.9. Projenilerin paromomisin direnci	51
4.2.10. Projenilerin insersiyon bölgesinin PCR analizi	53
6. SONUÇLAR	54
7. KAYNAKLAR	56
8. EKLER	62
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas reinhardtii*’de COPII Vezikül Altbirimi *SEC24A* İnsersiyonel Mutantlarının Genetik Linkaj ve Fenotipik Analizleri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

13/ 07/ 2020

Sevinç EVREN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde oran
°C	: Santigrat derece
µl	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
g	: Gram
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojenin gücü
rpm	: Dakikadaki devir sayısı
µm	: Mikrometre

Tezde kullanılan ondalık ayraç virgüldür. Örneğin; 21,01

Kısaltmalar

ALP	: Alkalen fosfataz
ARS	: Arilsülfataz
<i>sec24a(k-X)</i>	: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> insersiyonel mutantının X numaralı klonu
Mt	: Çiftleşme tipi
P _x	: X numaralı projeni
QFC	: Dört kamçılı hücre
SEC	: Sekretuar
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
T _x	: X numaralı tetrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 COPI ve COPII veziküllerinin oluşumunda kat düzeneği şeması	2
Şekil 2.1. Chlamydomonas anatomisi	5
Şekil 2.2. Chlamydomonas yaşam döngüsü ve gamet farklılaşması, aglütinasyon, füzyon, zigot gelişiminde fonksiyonu olan genler	6
Şekil 2.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'de papyon şeklindeki Sec23/24–Sar1 kompleksi	11
Şekil 3.1. Klon oluşturma	16
Şekil 3.2. İnsersiyon bölgesinin ve kullanılan primerlerin <i>SEC24A</i> gen modeli üzerindeki yeri.....	20
Şekil 4.1. CrSEC24A ile VcSec24 protein sekansı hizalama sonucu.....	27
Şekil 4.2. CrSEC24A ile ScSec24p protein sekansı hizalama sonucu	29
Şekil 4.3. CrSEC24A ile CrSEC24B protein sekansı hizalama sonucu	30
Şekil 4.4. CrSEC24A ile HsSec24D protein sekansı hizalama sonucu	31
Şekil 4.5. CrSEC24A proteininin sekonder yapısına göre renklendirilmiş 3D görüntüsü	33
Şekil 4.6. CrSEC24A ve HsSec24D proteinlerinin 3D konformasyonunun karşılaştırması	34
Şekil 4.7. CrSEC24A ve ScSec24p proteinlerinin 3D konformasyonunun karşılaştırması	35
Şekil 4.8. CrSEC24A proteini tahmini konformasyon 3D görüntüsü ve kristal yapısı çözümlenmiş HsSec24D protein 3D görüntüsü üzerinde F-X-P motifinin belirlenmesi	36
Şekil 4.9. CrSEC24A protein lokalizasyon tahmini	37
Şekil 4.10. Paromomisin direnci testi	38
Şekil 4.11. Arilsülfataz aktivite testi	40
Şekil 4.12. Alkalen fosfataz aktivite testi	41
Şekil 4.13. <i>sec24a</i> mutantında insersiyonun belirlenmesi için yapılan PCR analizi sonucu	42
Şekil:4.14. RT-PCR analizi sonucu	43

Şekil 4.15. <i>sec24a(k-1)</i> hücre yapı ve anormalliklerini gösteren farklı alanlardan alınmış mikroskop görüntüleri	45
Şekil:4.16. Hücrelerin flagella hareket aktifliği	46
Şekil 4.17. <i>crsec24(k-1)</i> mutant klonu ve CC-125 yabancı suşu çaprazlama sonrası bazı generatif evre mikroskop görüntüleri	47
Şekil 4.18. <i>crsec24(k-1)</i> mutantı ve CC-125 yabancı suşu çaprazlama sonrası oluşan dört flagellalı hücre görüntüleri	48
Şekil 4.19. Çaprazlama sonrası pelikül tabakası.....	48
Şekil 4.20. Tetratların projeniler arası renk farklılıkları	51
Şekil 4.21. Tetrat 1 ve tetrat 2'nin projeniler arası renk farklılıkları	51
Şekil 4.22. Projenilerin antibiyotik direnci testi	52
Şekil 4.23. Tetrat 1 projeni hücrelerinde insersiyonun belirlenmesi için yapılan PCR analizi sonucu.....	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların marka ve modelleri	13
Çizelge 3.2. PCR ve RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri	18
Çizelge 3.3. PCR ve RT- PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz sekansları.....	19
Çizelge 3.4. Biyoinformatik analizlerde kullanılan protein sekansları	24
Çizelge 4.1. CrSEC24A ile bazı organizmaların protein sekansının hizalama sonuçlar	28
Çizelge 4.2. Farklı organizmalara ait SEC24 ortologlarının domain analizi.....	32
Çizelge 4.3. Tam tetrat oldukları tahmin edilen projeni hücrelerinin çiftleşme tipi belirleme, fenotipik, morfolojik ve insersiyon analizleri	49
Çizelge 4.4. Tam olmayan tetrat projeni hücrelerinin fenotipik, morfolojik analizleri .	50

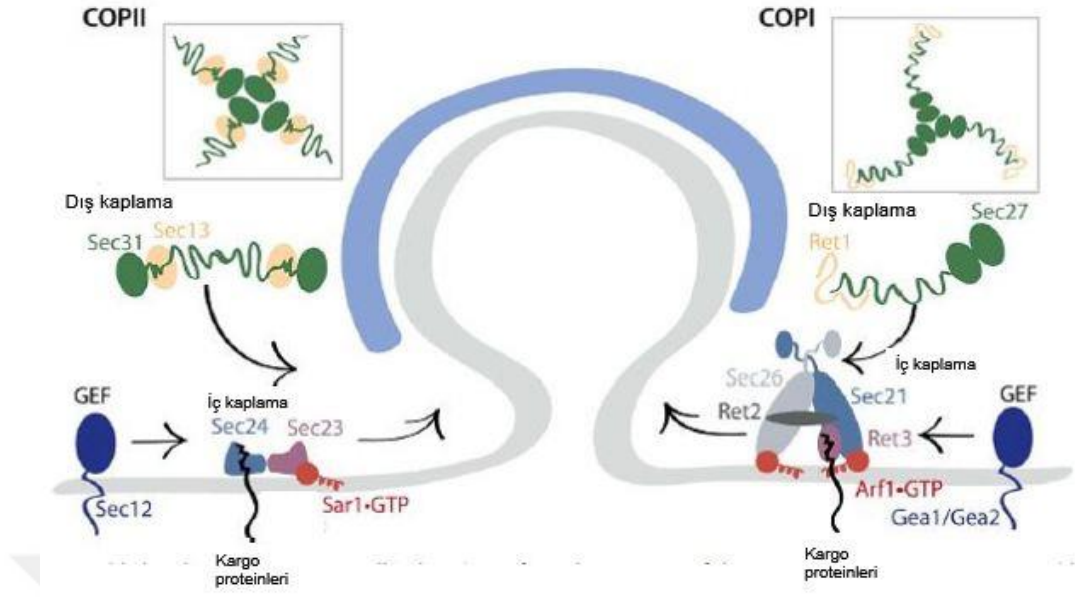
1. GİRİŞ

Bu çalışmada model organizma olarak tek hücreli bir yeşil alg olan *C. reinhardtii* (*Chlamydomonas reinhardtii*) kullanılarak İleri Genetik (forward genetic) çalışması yapılmıştır. *C. reinhardtii*'de bulunan SEC24 genleri üzerine yapılan bir çalışma bulunmamakla birlikte, SEC24A üzerine yürütülen bu tez çalışması *C. reinhardtii*'de bir ilk olmuştur.

1960'lı yıllardan bu yana *C. reinhardtii*, çeşitli hücresel süreçlerle ilgili biyolojik sorulara cevap vermek için model organizma olarak başarıyla kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar bu organizmadan, biyolojideki temel süreçleri incelemek için güçlü bir model olmasını baz alarak "Yeşil Maya" veya "Fotosentetik Maya" olarak bahsetmiştir (Goodenough 1992; Rochaix 1995). *Chlamydomonas* ile yapılan çalışmalar hayvan, bitki, insan ve diğer organizmalarda; genetik, biyolojik ve hücresel düzeyde karmaşık olayların anlaşılması için araştırmacılara özelliklerinden dolayı kolaylık sağlamaktadır.

Sekretuar yolda bulunan proteinler, katlanması ve işlenmesi için ER'a (endoplazmik redikulum) transfer edilir. Buradan veziküller aracılığı ile Golgi'ye taşınıp işlenerek endozomlara, lizozomlara, hücre zarına taşınmak veya hücreden dışarıya salgılanmak üzere sınıflandırılırlar. Hücre içi trafikte vezikül ile taşımada görev alan üç farklı vezikül manto protein ailesi bulunmaktadır. Bunlar klatrin, COPI ve COPII (COP: Manto ya da kaplama proteini)'dir. Rothman ve Schekman'ın laboratuvarlarının büyük bir keşfi, erken salgı yolunda veziküler taşımaya aracılık eden ve klatrin olmayan katların varlığını belirlemek olmuştur (Waters vd. 1991; Barlowe vd. 1994). Bu katlardan biri olan COPI (Kaplama protein kompleksi I), Golgi içi ve Golgi'den ER'ya retrograd taşımaya ilgilendirken (Letourneur vd. 1994) diğer bir kat olan COPII'nin (Kaplama protein kompleksi II), ER'den ER-Golgi ara bölmesine (ERGIC) ya da Golgi kompleksine taşımaya aracılık ettiği bilinmektedir (Barlowe vd. 1994). Bir dizi molekül, bu vezikülleri oluşturmak için ER çıkış yerlerinde membran üzerinde birlikte çalışır.

COPII vezikülünün temel fonksiyonel birimleri beş protein içeren üç sitolojik bileşenden oluşmaktadır ve bunlar; Sar1p, Sec23/24p kompleksi ve Sec13/31p kompleksidir. Sec13/31 proteinleri vezikülün dış katmanını oluştururken, Sec23/24 proteinleri iç katmanını oluşturmaktadır. GTP bağlayıcı bir protein olan Sar1p, COPII oluşumunu başlatır (Matsuoka vd. 1998). ER membranında COPII kaplı vezikül oluşumu, küçük GTPaz Sar1'in GDP/GTP değişiminin aktivasyonu ile tetiklenir. Buna karşılık aktif Sar1, COPII kaplama düzeneğini teşvik eder. Sar1 tarafından GTP hidrolizi, daha sonra vezikül oluşumunun ek turları için geri dönüştürülen kaplama proteinlerinin sökülmesine yol açar. Dolayısıyla, Sar1 GTPaz döngüsünün COPII'nin montajını ve sökülmesini düzenlediği düşünülmektedir. Ortaya çıkan kanıtlar kargo proteinlerinin, kaplama montajını kargo seçimi ile koordine etmek için Sar1 GTP hidrolizini modüle ettiğini göstermektedir (Sato 2004). COPII veziküllerine kargo seçimi Sec24 alt birimi tarafından yönlendirilir (Miller vd. 2002).



Şekil 1.1 COPI ve COPII veziküllerinin oluşumunda kat düzeneği şeması

Hem COPII'nin (solda) hem de COPI'in (sağda), montajları Arf/Sar1 ailesinin küçük Gtpaz'ları tarafından yönlendirilir. **COPII:** COPII'de Sar1, ER membranına lokalize olan guanin nükleotid değişim faktörü (GEF), Sec12 ile aktive edilir. Aktif Sar1-GTP, "iç kaplama" katmanına karşılık gelen ve kargo bağlama işlevini sağlayan Sec23/Sec24 dimerini işe alır. Sec13/Sec31'in bir heterotetrameri daha sonra eklenir ve "dış kaplama" oluşturulur. **COPI:** COPI vezikülü kat oluşumu Arf1'in aktivasyonu ile gerçekleşir. Sec21/Sec26/Ret2/Ret3'ün iç kaplama kompleksini işe alır. COPI dış kaplama sec27/Ret1/Sec28 tarafından oluşturulur ve Sec27'ün üç B-pervane etkileşimleri yoluyla bir triskelion yapısında toplanır (Barlowe ve Miller 2013)

Salgılanacak olan kargo proteini, COPII kaplama vezikülü tarafından tanınan ve sitosolik alanından bir ER dışı aktarma sinyali taşıyan transmembran reseptörleri vasıtasıyla bu taşıma keseciklerine seçici olarak eklenebilir (Barlowe 2003). Organizmalarda Sec24 protein ailesinden birden fazla paralog eksprese edilebilmektedir. *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae*) hücreleri Sec24 protein ailesinden Sec24p, Lst1p ve Iss1p olarak üç paralog içerirken; *H. sapiens* (*Homo sapiens*) ve *M. musculus* (*Mus musculus*) Sec24A, Sec24B, Sec24C ve Sec24D olarak dört paralog içermektedir. Ancak dört Sec24 proteininin hepsinin aynı hücrede eksprese edilip edilmediği veya fonksiyonel olarak farklı olup olmadığı bilinmemektedir (Tang vd. 1999; Pagano vd. 1999). *C. reinhardtii*'de ise SEC24A ve SEC24B olmak üzere iki paralog bulunmaktadır.

Organizmalarda bir proteinin birden fazla paraloğunun bulunmasının nedeni ilgi konusudur. Bu paraloglar birbirine destek için bulunabilirken, birinin yokluğu hücrede normal olmayan etkilere ve hatta bazen letal etkiye sahip olabilir. Örneğin 2000 yılında Shimoni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *S. cerevisiae*'de Sec23/Lst1p ve Sec23/24p karışımı ile oluşan veziküllerin morfolojik olarak ve yüzdürme yoğunluğunda benzer olmasına rağmen normal COPII veziküllerinden (87 nm ve 75 nm çap) daha büyük oldukları gözlemlenmiştir. İmmüno elektron mikroskopik ve

biyokimyasal çalışmalar, aynı veziküllerin zarlarında hem Sec23/Lst1p hem de Sec23/24p bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sonuç COPII kat polimerizasyonunun geometrisini değiştirerek; hantal yani büyük kargo moleküllerinin, polimerlerin veya parçacıkların taşınmasına izin verebileceğini göstermiştir (Shimoni vd. 2000). Yani Sec24p proteinlerinin kombinasyonlu olarak yer aldığı karmaşık COPII vezikülleri, vezikülün genişlemesine ve daha büyük kargo molekülleri ya da proteinlerinin taşınmasına hizmet edebilir.



2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Alglerin Sınıflandırılması ve Taksonomisi

Algler bitkiler aleminin alt filogenetik basamaklarını oluşturan çok çeşitli organizmalar grubudur. Bu grup bitkilerden boyut ve taksonomik özellikleriyle ayrılırlar. Bitkilerde olduğu gibi yaprak, kök vb. organları yoktur. Bitkilerdeki gibi embriyoya sahip değildir. Özelleşmiş dokulara sahip olmamak şartıyla çok hücreli ya da tek hücreli olabilirler. Genellikle canlı organizmaların sınıflandırılması, artan genetik, biyolojik çalışmalar ve filogenetik bilginin sonucu olarak zaman içinde sürekli olarak değişmektedir. Bu yüzden, farklı konuların temel alınarak yapıldığı birçok sınıflandırma literatürde mevcut olduğu gibi henüz tamamlanmış bir sınıflandırmanın mevcudiyeti varsayılabilir. Alglerin sınıflandırmasında temel alınan unsurların bazılarını kısaca şu şekilde gruplandırabiliriz;

➤ Morfoloji:

Morfoloji baz alınarak yapılan sınıflandırmada birbirinin içinde birlikte yaşam anlamına gelen “Endosimbiyotik Teori” ya da diğer adıyla “Endosimbiyoz Teorisi” önemli rol oynamaktadır. Ökaryotların evriminde ve filogenetik basamakların tanımlanmasında, kloroplast ve mitokondri yapısının incelenmesiyle konu üzerindeki soru işaretlerine tatmin edici cevaplar alınmaya başlanmıştır. Bu teoriye göre milyonlarca yıldır yaşamını sürdürebilen bakteriler, kendisinden küçük bakterileri veya proteobakterileri endositoz yoluyla yemeleri ve sindirememeleri sonucunda mitokondri ve kloroplast organellerinin içlerinde hapsolmalarıyla evrimleştiğini ileri süren bir teoridir. Endosimbiyotik teoriye göre mitokondri proteobakterilerden, kloroplast yani plastidler ise siyanobakterilerden gelmek kaydıyla ökaryot hücre tipinin olduğu düşünülmektedir. Birincil endosimbiyozda kloroplast 2 membrana sahiptir ve *C. reinhardtii* bu gruba dahildir. Başka organizmanın birincil endosimbiyoz ürününü, endositoz yoluyla yemesinin sonucu olarak ikincil endosimbiyoz oluşur ve kloroplastı üç membrana sahiptir. Bunlarla birlikte üçüncül ve dördüncül endosimbiyoz şeklinde ilerlemektedir. Tüm bu sıralamalar hücrelerin ard arda endosimbiyotik ilişkiye girmesi ile açıklanmaktadır ve temeli ise bazı organellerin zar kat sayılarına dayandırılmaktadır.

➤ Moleküler yapı:

Ökaryotik ve prokaryotik ribozom küçük alt birimlerinin (16S/18S) değerlendirilmesi; taksonomide, sınıflandırmada ve tanımlandırmada önemli bilgiler içermektedir. Ribozomların küçük alt birimleri korunan bazı bölgelere sahiptir ve bunların karşılaştırması taksonomik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bunun yanında gen sekanslama teknikleri ve kullanılan biyoteknolojik teknikler genetik bilgi birikimine katkı sağlamaktadır.

➤ Pigment içeriği:

Bazı algler grupları klorofil içerdikleri için yeşil olarak görünürken, bazıları klorofile ilave olarak ksantofil ve karotenoid gibi pigmentler içerirler ve bu pigmentlerin ışık absorbe yeteneklerinin farklı olması nedeniyle kahverengi veya kırmızı görünürler. Işık absorpsiyonu ise direkt olarak fotosentetik aktiviteyi

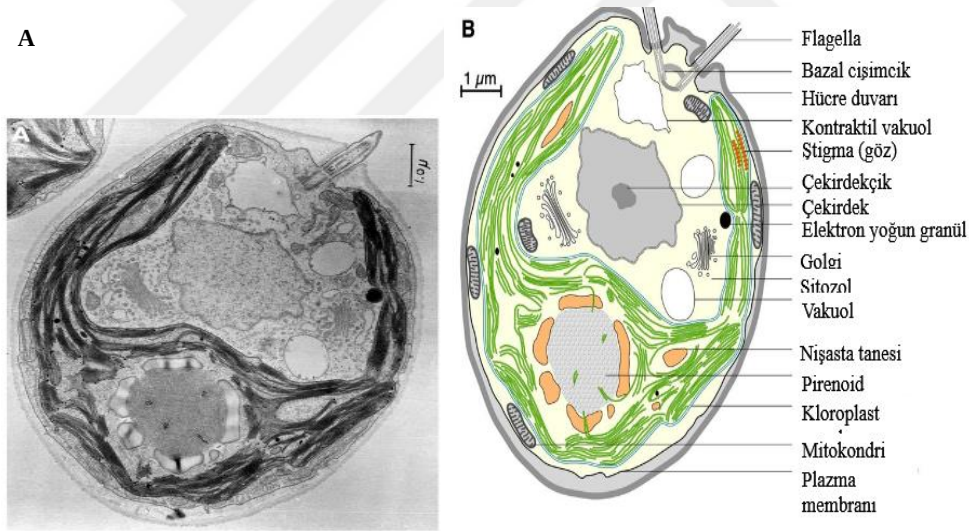
etkilemektedir. Sonuç olarak, farklı pigmentler ihtiva eden farklı alg grupları, farklı fotosentetik aktivite ve verimliliğine sahiptir.

Öncelik olarak pigment bileşimine dayanarak yapılan sınıflandırma incelendiğinde algler 9 farklı sınıfa ayrılmıştır ve bunlar içindeki en büyük gruplar şunlardır;

- Chlorophyceae (yeşil algler)
- Phaeophyceae (kahverengi algler)
- Pyrrophyceae (dinoflagellates)
- Chrysophyceae (altın kahverengi yosun)
- Bacillariophyceae (diatoms)
- Rhodophyceae (kırmızı algler) (Hemaiswarya vd. 2013).

2.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii* ve Yaşam Döngüsü

C. reinhardtii, tipik olarak oval şekilli olup 10 µm boyunda ve 3 µm genişliğindedir. Bu türde bir hücre duvarı, bir kloroplast, ışığı algılayan bir "eye spot" (göz, stigma) ve göğüs vuruş tipi bir hareketle yüzebilecekleri iki ön flagella (kamçı, cilia) bulunur. Hücrenin anatomisi ve TEM görüntüsü Şekil 2.1'de verilmiştir.



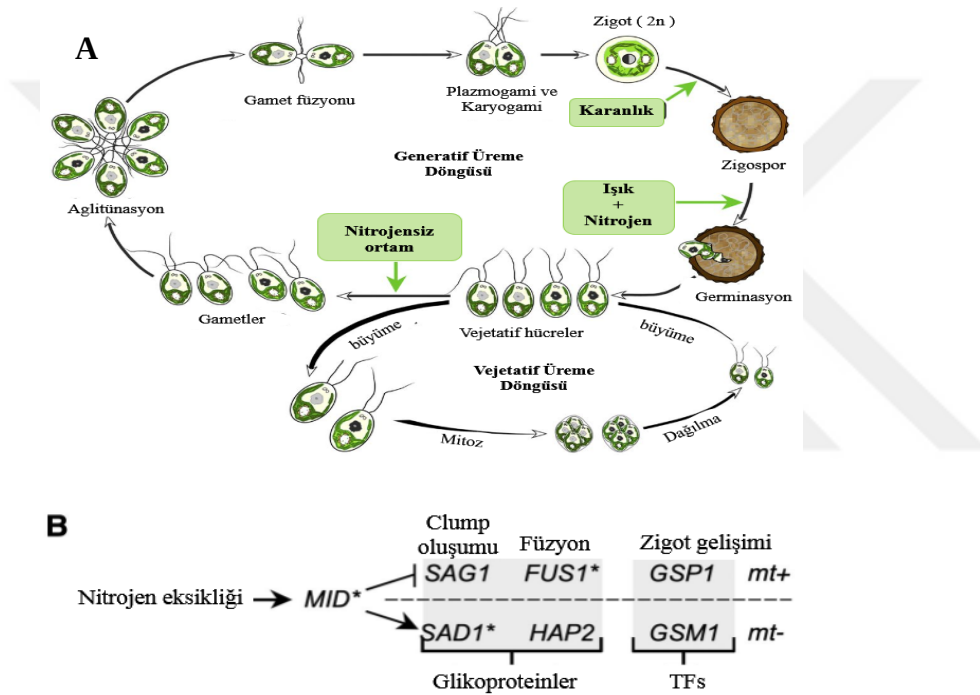
Şekil 2.1. *Chlamydomonas* anatomisi

A: Hücrenin TEM (Transmission electron micrograph) görüntüsü; **B:** TEM görüntüsüne göre şematize edilen hücre (Salomé ve Merchant 2019)

Optimum koşullar altında, *C. reinhardtii* o kadar hızlı büyür ki sayıları yaklaşık 8 saatte bir ikiye katlanabilir (Harris 2001). Ortam şartlarına bağlı olarak hem vejetatif hem de generatif üreme yeteneğine sahiptir. Olumsuz koşullarda gamet oluşturma ve üremeye gitme eğilimindedir. Bu durum, olumsuz şartlara adaptasyon ve hayatta kalma şansını arttırmayı amaçlamaktadır. Zigot oluştuğunda hala olumsuz şartlar devam ediyorsa mayozla gitmeden organizma dormansiye geçerek kendini koruma altına almaktadır. Heterotalik ve izogami eşeyli üreme tipine sahiptir. Yani çiftleşmede artı ve

eksi hücre tipine sahip olurlar. Artı ve eksi gametler arasında ancak ultra-strüktür düzeyde yapısal farklılıklar görünür, boyut ve yüzeysel görünüm bakımından benzerdir. *C. reinhardtii* türündeki MID geninin keşfi gametogenezde cinsel ifade kontrolünü anlamada önemli adım olmuştur. Şimdi aktif bir transkripsiyon faktörü olarak bilinen bu gen, mt^- (eksi çiftleşme tipi) lokusunda kodlanırken mt^+ (artı çiftleşme tipi) lokusunda kodlanmamaktadır ve bu gen gametik veya zigotik fazlarda kodlanmaktadır (Ferris vd. 2002). Farklı çiftleşme tipindeki gametler bir araya gelip birbirlerini tanıdıklarında aglütinasyon ve zigot oluşabilir.

Vegetatif ve generatif üreme döngüsü ile aglütinasyon, füzyon ve zigot gelişiminde yer alan genler Şekil 2.2’de şematize olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Chlamydomonas yaşam döngüsü ve gamet farklılaşması, aglütinasyon, füzyon, zigot gelişiminde fonksiyonu olan genler (Salomé ve Merchant 2019)

A: Chlamydomonas vegetatif ve generatif üreme döngüsü; **B:** Çiftleşme tipinin (mt^- ya da mt^+) bir fonksiyonu olarak gamet farklılaşması, aglütinasyon, füzyon ve zigot gelişiminde yer alan genler. SAD1, SAG1, FUS1 ve HAP2, gamet çiftleşme tipi tanıma için kritik olan glikoproteinleri kodlarken, GSTP1 ve GSTM1, zigot gelişimi için önemli olan transkripsiyon faktörlerini (TFs) kodlamaktadır. Mt ile bağlantılı genler yıldızlarla (*) gösterilmiştir

Eşeyli üreme süreci; gametogenez, aglütinasyon, çift oluşumu ve sinyal iletimi, hücre duvarı lizisi, çiftlerin aktivasyonu, hücre füzyonu, zigospor oluşumuyla olgunlaşma ve germinasyon olarak yedi basamak olarak gerçekleşmektedir (Harris vd. 2009).

I. Gametogenez:

C. reinhardtii'de gametogenez genellikle olumsuz çevresel koşullar tarafından tetiklenir ve laboratuvarında genellikle damıtılmış suya veya azotsuz ortama aktarılmasıyla indüklenir. *C. reinhardtii* için nitrojen eksikliği gametogenez en fazla indükleyen faktör olarak gösterilmiştir (Sager ve Granick 1954; Bernstein ve Jahn 1955). Işığın gametogenez kolaylaştırdığı, ancak ortamda azot tükenmesinin fotosentetik hızın ikincil etkisine bağlı olabileceği ve asetat ortamındaki koyu renkli yetişen hücrelerin azot bakımından eksik bırakıldığında cinsel olarak aktif hale gelebileceği belirtilmiştir (Sager ve Granick 1954). Daha sonra yapılan çalışmalar, azot eksikliği ile indüklenen pre-gametlerin çiftleşme için yetkin gametlere dönüştürülebilmesi için ışığa gereksinim duyduğunu göstermiştir (Treier vd. 1989; Beck ve Acker 1992). Gamet oluşumunda etkili spektrumunun Fototropin olarak bilinen mavi ışık reseptörleriyle tutarlı olduğu gösterilmiştir (Weissig ve Beck 1991). Gametogenezin bir tür hücre bölünmesi gerektirip gerektirmediği soru işareti olmuştur. Daha sonra yapılan bir çalışma erken G1 fazında azot bulunmayan ortama aktarılan artı hücrelerin 4 saat sonra bölünme geçirmeksizin gamet oluşturduğunu göstermiştir (Abe vd. 2005). Olgun gamet hücreleri uzun süre bölünmeden yaşayabilirler ancak nitrojen içeren ortama transfer edildiğinde mitotik bölünmeye devam edebilirler (Goodenough 2007). Üreme sürecindeki aşamalar aşağıdaki gibi yediye ayrılmaktadır.

I. Aglütinasyon:

Mt⁺ tipi ve mt⁻ tipi hücreler karıştırıldıktan sonra flagellalar ile adezyon yoluyla bir yapışma meydana gelir. Oluşan bu ilk yapışma zayıftır ve flagellalar boyunca herhangi bir yerden olabilir. Bireysel tek bir gamet karşı hücre tipine sahip olan hücrelerden birden fazlasına yapışabilir ve böylece hücre kümeleri oluşur (Harris 2009). Aglutinasyon reaksiyonu gametlere özgü olmakla birlikte bu reaksiyonda aktif olan moleküller glikoprotein yapısındaki aglutininlerdir. Aglutinin vejetatif hücrelerin flagellasında bulunmaz, hücre gövdesinin plazma membranındaki bir rezervuardan gamet flagellası üzerine taşınır.

II. Eşleşme ve sinyal iletimi:

Yapılan çalışmalar dibutiril cAMP'nin (Dibutiril Siklik Adensin Mono Fosfat) özellikle üç aglutinasyon tetikleyiciyi uyarır, bunlar: flagellar tip aktivasyonu, hücre duvarının lizisi ve çiftleşme yapılarının aktivasyonudur (Pasquale ve Goodenough 1987). cAMP hücre içi sinyal aktarımında görevli ikincil habercidir. Yabani tip hücrelerde, litik enzim hücre duvarının altındaki periplazmik boşlukta inaktif bir öncü protein olarak depolanır. Kinesin-2 motor proteininin kaybı nedeniyle flagellar düzenlemede sıcaklığa duyarlı bir kusura sahip olan *fla10* mutan sınırlayıcı sıcaklığa ulaştığında çiftleşme gerçekleşmez (Piperno vd. 1996). Pan ve Snell (2002) tarafından bu mutantla yapılan çalışmalar, çiftleşme sırasında flagella tarafından duyusal transdüksiyon için kinesin-2'nin gerekli olduğunu gösterdi. *C. reinhardtii*'de aglutinasyon flagella uçlarında bazı değişikliğe neden olur; flagella uçları genişler, dokuz mikrotübül ile terminal membranı arasında belirli bir bölgede bazı maddeler birikir. Hücre füzyonu gerçekleştikten sonra QFC (dört flagellalı hücre, dört flagellalı yapı) aşamasında, flagella normal morfolojisine dönmektedir (Crabbendam vd. 1984).

Yapılan bazı çalışmalar gerekli sinyal iletiminin ise flagella boyunca devam ettiğini göstermektedir ve anti-flagellar antikorlar da benzer şekilde flagella uçlarına taşınır (Goodenough ve Jurivich 1978; Hoffman ve Goodenough 1980). Uçlar birbirine yapışmaya başladıkça çiftler gruptan ayrılıp hücre füzyonuna giden diğer adımlara geçer. Bu aşamada, karşı cins hücrelerin yakın temas haline gelmesinin yanı sıra, aglütinin etkileşimleri ve flagellar adezyonda gamet aktivasyonuna yol açan cAMP bağımlı bir sinyal yolu başlatır.

III. Hücre duvarı lizisi:

Çiftleşme sırasında hücre füzyonuna hazırlanan gametler bu aşamada hücre duvarını döker. Hücre duvarı lizisi mt^+ ve mt^- arasındaki gamet flagellar aglütinasyon sinyali ile hücrelerde indüklenen hücre duvarı litik enziminin aktivitesinden kaynaklanır. *C. reinhardtii*'de hücre duvarı lizisi, flagellar tip aktivasyonunu da tetikleyen cAMP aracılı olarak gerçekleşir.

IV. Çiftleşme yapılarının aktivasyonu:

Mt^+ gamet tipinden mt^- gamete doğru birleşme için döllenme tübülü oluşur. Aktive olan hücre daha sonra düzensiz birçok mikrotübülden oluşan demet oluşturarak tübülün uzamasını sağlar. Bu esnada mt^- tipindeki hücrede belirli bir bölgedeki yüzeyde saçaklar şeklinde tübül temas bölgesi oluşturur. Tübülün uzaması mt^- hücreye ulaşana kadar devam eder böylece iki hücre tipi arasında stoplazmik köprü oluşur (Harris vd. 2009).

V. Hücre füzyonu:

Döllenme tübülü mt^- ile birleştiğinde tübül hızla kısalarak iki hücrenin apikal uçlarını bir araya getirir. Füzyon gerçekleştikten sonra QFC (dört flagellalı hücre ya da planozigot) olarak adlandırılan dört kamçılı yapı oluşur. Çiftleşme yapılarının aktivasyonundan hemen sonra, iki gamet arasında sitoplazmik süreklilik sağlamak için kaynaşırlar ve iki hücre bir QFC oluşturarak birleşir. Erken QFC aşamasındaki hücreler iki saat sonra yaklaşık otuz dakika boyunca flagella hücre içine çekilir ve kaybolur (Randall vd. 1967). Hücre füzyonu hem kısa vadede hemde uzun vadede etkileri olan hücre içi sinyaller üretir. Kısa vadede, diğer *Chlamydomonas* türlerinde döllenmede olduğu gibi, kaynaşmış gametler artık diğer gametlerle etkileşime giremez. Füzyon ayrıca gen transkripsiyonunu aktive eder (Ferris ve Goodenough 1987) ve zigotta yeni bir gelişimsel yol başlatır ve sonuçta iki artı ve iki eksi haploid hücre elde etmek için mayoza yol açar.

VI. Zigospore oluşumu, olgunlaşması ve çimlenmesi

Zigospore kütlesi sıvı ortamın yüzeyinde kutikulat tabaka (pelikül) olarak görülür. Sıvı besi ortamının yüzeyinde böyle bir yapının görülmesi çiftleşmeyi doğrular ve sonraki 24 saat içinde hacimde artış gözlenir. Klorofil parçalanmış gibi bir görünüm verir. Zigot kloroplastları sadece bir pirenoid içerir.

Normal laboratuvar koşullarında çiftleşmiş gametlerin %1-5'i mayotik zigot oluşturmaz ve diploid halde vegetatif olarak mitoz bölünme geçirir (Ebersold 1967).

Farklı özellikleri dikkate alındığında hem bitki hem de hayvan hücrelerinden bazı özellikler taşıdığı için hayvan, bitki ve insan bazlı moleküler ve hücresel süreç çalışmalarında güçlü bir model organizma olarak kullanılmaktadır.

2.1.2 Biyoteknolojide Model Organizma Olarak *C. reinhardtii*

Son yirmibeş yılda *C. reinhardtii*, çeşitli hücresel süreçlerle ilgili biyolojik sorulara cevap vermek için model organizma olarak başarıyla kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar bu organizmadan, biyolojideki temel süreçleri incelemek için güçlü bir model olmasını baz alarak “Yeşil Maya” veya “Fotosentetik Maya” olarak bahsetmiştir (Goodenough 1992; Rochaix 1995). *C. reinhardtii* genetik, organellerin biyogenezi, fotosentez, flagella birleşme ve fonksiyonu, çiftleşme ve gametogenez, hücre duvarı sentezi, fototaksi, sirkadiyen ritmi ve karbon, nitrojen ve sülfür metabolizması gibi hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin farklı konularının çözümlenmesinde model organizma olarak kullanılmıştır. Genom sekansının yapılmış olması, tek hücreli olması, üreme döngüsünün kısa olması model organizma olarak kullanılmasının temel sebeplerini oluşturmaktadır. Bitkiler ile kıyaslandığında yetiştirme için daha az alana ihtiyaç duyması, kısa jenerasyon süresine sahip olması, kloroplast ve mitokondriyal genom sekans dizilimine ek olarak (Maul 2002; Gray 1988) nükleer genom sekans diziliminin de yapılmış olması (Merchant 2007) bitkilerde model organizma olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır.

C. reinhardtii’nin fotosentetik işlevselliği ortamdaki karbon kaynakları ile değiştirilebildiğinden dolayı fotosentetik mutasyonların incelenmesine ya da karanlıkta büyümenin incelenmesine izin verir. Bunun yanında kloroplast genomu kolaylıkla homologus rekombinasyon ile değiştirilebilmektedir ve bu özellik kloroplast gen ekspresyonunun temel özelliklerini incelemek için kullanılmıştır (Manuell ve Mayfield 2006). Bir diğer biyoteknolojik uygulama da *C. reinhardtii* kloroplastından H₂ üretimidir. *C. reinhardtii*, hidrojen gazı, format ve etanol gibi metabolitler üreten bir anaerobik metabolizmaya uyarlanabilir yetenektedir.

C. reinhardtii’de çalışılan önemli konulardan biri de flagella yapısı olmuştur. Memelilerde cilia yapısının yine *C. reinhardtii* ile bulunması, memeliler için de model organizma olarak kullanılmaya sebebiyet vermiştir. Özetle bu organizmanın şu özellikleri güçlü bir model organizma olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Rochaix 1995);

- Jenerasyon süresinin kısa olması
- Büyümesinin hem hetotrofik, fototrofik hem de mikсотrofik olması
- Haploit kromozomlu olması
- Ökaryotik hücre tipine sahip ve mikroskopik canlı olması
- Endojen DNA’nın kloroplast, mitokondri ve nükleer genomlarına transfer edilebilmesi
- Toksik olmaması, virüs, prion gibi insan patojeni içermemesi
- Klasik genetik analizlere uyumluluğu
- Laboratuvar koşullarında kültürünün kolay ve ucuz olması.

2.2.Sekretuar Yolak ve Hücre İçi Salgı Vezikülleri

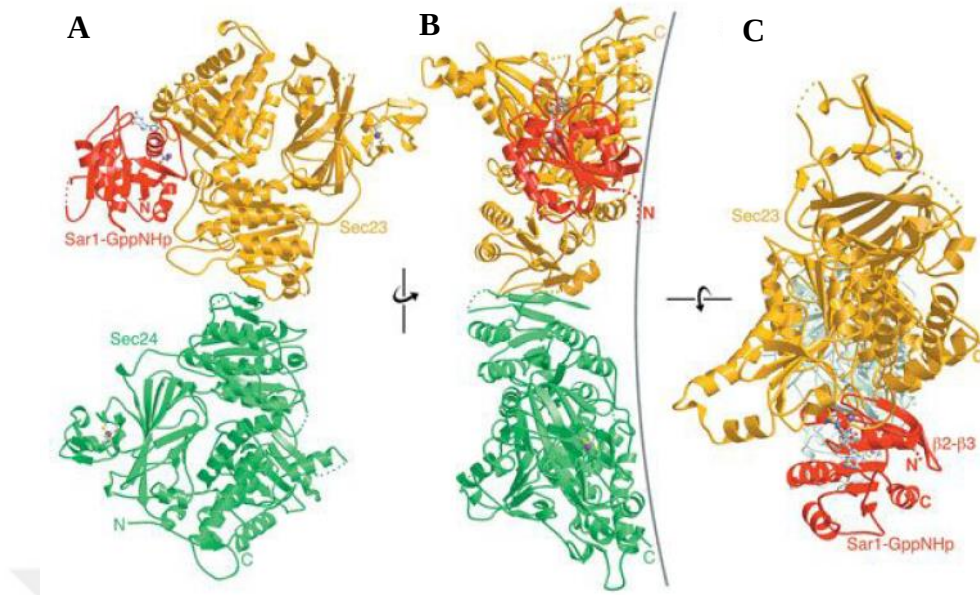
Sekretuar yol, çeşitli hücrel protein dizilerinin sentezlenmesi, katlanması ve iletilmesinden sorumludur. Salgı protein sentezi, yeni oluşan proteinleri doğru bir şekilde entegre etme, doğru translasyon sonrası modifikasyon ve katlama görevleriyle yüklenen ER’da (endoplazmik retikulum) başlar (Barlowe ve Miller 2013). Bir hücrenin proteinlerinin yaklaşık üçte biri hücrenin sınırları dışında veya hücrel zarların içine gömülü olarak işlev görür. Bu proteinlerin farklı nihai varış noktalarına zamansal ve mekansal hassasiyetle ulaşmasını sağlamak, hücrel fizyoloji için şarttır (Gomez-Navarro ve Miller 2016). Ökaryotik organizmalarda endo-membran sistemi bölümleri (ER, Golgi, Nükleer envelop, Vakuol/Lizozom, sekretuar vezikül ve hücre membranı) arasındaki taşıma Clathrin, COPI ve COPII olarak isimlendirilen farklı protein kaplama kompleksleri ile gerçekleştirilir (co-translational import). Taşımada görev alan COP veziküllerinin donör birimde oluşup, kargo proteinin diğer birimlere taşıdığı düşünülmektedir (Sato ve Nakano 2007). Salgı yolağı veziküllerinin sitoplazmaya bakan yüzeyleri belirli protein ile kaplıdır ve farklı kaplama proteinleri farklı kargoların taşınmasında görevlidir. Ökaryotik organizmalarda proteinlerin ER membranından geçişi, bu proteinlerin N-terminal bölgesinde bulunan Sinyal Peptidi tarafından gerçekleştirilmektedir. Sinyal peptidinin sinyal tanıma partikülü (Signal recognition particle-SRP) tarafından tanınmasından sonra SRP’nin ER üzerinde bulunan reseptörüne bağlanmasıyla proteinlerin ER’a transferlerini sağlamaktadır (Walter ve Blobel 1982; Walter vd. 1982).

2.2.1. COPII vezikülünün oluşum mekanizması

Hücre içi endo-membran sistemi içinde kalacak olan proteinler ER lümenine lokalize olurken, sistem membranına lokalize olması gereken proteinler ise ER membranına entegre olmaktadır. Proteinler daha sonra Golgi’den geçerek vakuol/lizozoma gönderilebilir, veziküller aracılığıyla hücre membranına taşınabilir ya da hücre dışına salgılanabilirler. ER-Golgi taşımacılığında anahtar rol COPII kompleksinin SEC24 alt birimi tarafından kargo molekülleri içindeki belirli sinyallerin tanınmasına dayanmaktadır (Miller vd. 2002, 2003; Lee vd. 2004).

ER’dan gelen protein, COPII olarak adlandırılan korunmuş bir sitoplazmik kat kompleksi tarafından taşınır (Lord vd. 2013). COPII kompleksinin oluşumunda bir dizi stoplazmik protein görev alır ve minimal üç sitozolik bileşenden, toplamda 5 farklı proteinden oluşmaktadır. Bunlar; GTPase-Sar1, Sec23/Sec24 kompleksi ve Sec13/Sec31 kompleksidir. *S. cerevisiae* Sec23/24–Sar1 kompleksinin kristalografik analizi, COPII vezikülün büyüklüğüne ve asidik-fosfolipid bileşimine uyacak şekilde içbükey ve pozitif yüklü bir membran-proksimal yüzeye sahip, 15 nm uzunluğunda, papyon şeklinde bir yapı olduğunu ortaya koymaktadır (Bi vd. 2002). Bahsi geçen papyon şeklindeki Sec23/24–Sar1 kompleksi Şekil 2.3’de verilmiştir.

COPII kompleksi, her biri esas olarak iki farklı SEC proteini ile bir araya getirilen bir iç ve dış kaplamadan oluşur: heterodimer Sec23/Sec24 proteinleri uygun proteinlerin transport edileceği COPII vezikülünün iç tabakasını oluştururken heterotetramer Sec13/Sec31 proteini dış kaplamayı oluşturur ve genellikle vezikül büyüklüğü ile sertliğini düzenlemekten sorumludur (Chen vd. 2013).



Şekil 2.3. *Saccharomyces cerevisiae*'de papyon şeklindeki Sec23/24–Sar1 kompleksi **A:** Sec23/24–Sar1 kompleksinin önden görünüşü; **B:** Sec23/24–Sar1 kompleksinin yandan görünüşü; **C:** Sec23/24–Sar1 kompleksinin yukarıdan görünüşü (Bi vd. 2002)

COPII veziküllerinin oluşturulması için GTPase Sar1, ER membranında bulunan GEF (guanine nucleotide exchange factor) Sec12 tarafından aktive edilmektedir (Nakano, Brada ve Schekman 1988). Sar1 kendisine GDP yerine GTP bağlanması ile aktifleşip ER membranına lokalize olmaktadır ve Sec23/Sec24 kompleksine bağlanarak kompleksin ER membranına lokalize olmasını sağlamaktadır (Kuehn, Herrmann ve Schekman 1998). SEC24 kargo proteinine bağlanan Sec23 ise Sar1'in GTPase aktivitesini uyarıcı proteindir (Yoshihisa vd. 1993; Matsuoka vd. 1998). Sar1-Sec23/24 ve Sec13/31 kompleksinin COPII örtüsünün oluşması için yeterli olduğu ve minimal COPII komponentleri olduğu düşünülmektedir. Fakat bunlardan başka proteinlerin de COPII oluşmasında görev aldığı düşünülmektedir. Minimal komplekste bulunan Sec24 kargo proteine bağlanarak COPII vezikülüne alınmasını sağlar. Sar1 GTPase'in de ayrıca kargoya bağlandığı düşünülmektedir (Giraud ve Maccioni 2003). COPII vezikülleri ER exit site (ERES) denen ribozomsuz bölgelerde oluşur. SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) ve SM (Sec1/Munc18-like) proteinleri de veziküllerin spesifik kompartımanlarla (bölge) füzyonunda rol almaktadır (Sudhof ve Rothman 2009).

2.2.2. SEC24A ile ilgili yapılan çalışmalar

Sekretuar yolda maya ve memelilerde toplam SEC24 paraloğu dört olarak belirtilmiş ve iki alt ünite altında değerlendirilmiştir. Bunlar SEC24A/B SEC24C/D'dir (Wendeler vd. 2007; Zanetti vd. 2011).

Her ne kadar Sar1, Sec23 veya Sec24'ün delesyonları mayada letal etkiye sahip olsa da (Lee vd. 2004), ER-Golgi transportunda geniş fonksiyonu ile tutarlı da olsa,

birkaç memeli COPII bileşenini kodlayan genlerdeki mutasyonlar genellikle belirli bir hücre tipi veya doku ile sınırlı olan fenotiplerle ilişkilendirilmiştir.

SEC24A'nın tam eksikliğinde farelerde normal gelişim gözlenmiştir. Bununla birlikte, aynı farelerde hücre yüzeyi LDL reseptör ekspresyonunu negatif olarak düzenleyen dolaşım faktörü olan PCSK9'un sekresyonunda seçici blokaja bağlı olarak belirgin şekilde plazma kolesterol düzeyinde azalma görüldüğü belirtilmektedir (Chen vd. 2013).

Arabidopsis ile yapılan ve özellikle endomembran taşımacılığında yer alan proteinlerdeki kusurların neden olabileceği fenotiplerin özgüllüğünü gösteren bir çalışmaya göre, SEC24A açıkça dev hücre oluşumu yolu ile hücre boyutunu düzenleyen bir role sahiptir (Qu ve Roeder 2014).

Golgi-membran markörlerini kısmen biriktiren bir *Arabidopsis thaliana* mutantını karakterize eden bir çalışmada; tespit edilen anormal fenotipin Sec24'ü kodlayan üç Arabidopsis paraloğundan biri olan Sec24A'daki bir missense (yanlış anlam) resesif mutasyonuna bağlı olduğu ve mutasyonun bu kritik bileşenin ER dışı aktarma bölgelerindeki dağılımını etkilediği tespit edilmiştir (Faso vd. 2009). Yine aynı çalışmada bir amino asit mutasyonu taşıyan *Arabidopsis* mutantı; Sec24A'nın ER çıkış sahalarına alınmasını etkilemiş ve bununla birlikte Golgi-membranlarının anormal tübüler kümelerinin oluşturulmasına neden olmuştur. *sec24A* knock-out edildiğinde letal olduğu için, mutant fenotipin *sec24A*'nın kısmi işlev kaybına bağlı olduğu belirtilmektedir. Bu çalışma, COPII kaplama proteinlerinin bitkilerdeki sadece ER protein çıkışı ile ilgili olarak ER ve Golgi-membran bütünlüğünü korumak için değil, aynı zamanda ER boru şekilli ağın bütünlüğünün korunmasına yardımcı olması için de önemli olduğunu göstermektedir (Faso vd. 2009).

SEC24A ve insan mide kanseri hücreleri arasındaki ilişkiye odaklanan bir diğer çalışmada, SEC24A'nın tümör olmayan dokuya kıyasla tümör dokusunda yüksek oranda eksprese olduğunu bulunmuştur (Lu vd. 2018).

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada kullanılan cihazların marka ve modelleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan cihazların marka ve modelleri

Cihaz Adı	Marka / Model
BioDrop	PT. INDOLAB UTAMA/ BİODROP DUO
PCR Makinesi	Bio-Rad / T100™
Agaroz jel elektroforez takımı	Fisher Scientific
Jel görüntüleme sistemi	Dnr Bio Imaging Systems / MiniLumi
Güç kaynağı	Fisher Scientific / Midi300V/4
Vorteks	DragonLab / MX-S
Hassas terazi	KERN PLJ 700-3CM
Santrifüj	Isolab / 603.02.001
Mikrodalga fırını	Vestel / MD 20 DB
Otoklav	TOMMY 5X-500E
Ultra steril ve streil su cihazı	Mes / Mp Minipure Mes13
Steril kabin	Tezsan- Class II A2
Binoküler Mikroskop	Euromex
Işık Mikroskobu	Primovert Zeiss
PCR cihazı	BioradThermalCycler

3.1. Besiyerleri ve Solüsyonlar

Katı besiyeri için %1,5 agar kullanılmıştır. Zigotlar için %4 agarlı TAP besiyeri kullanılmıştır. Sülfatsız besiyeri agar yerine %1,5 agaroz eklenerek hazırlanmıştır. Bütün içerikler eklendikten sonra ddH₂O ile son miktara göre besiyeri tamamlanmıştır. Tamamlanan besiyeri otoklavlama işlemine tabi tutulmuş olup (120 C basınç- 30 dakika) eğer katı ortam ise bir miktar soğuduktan sonra petrilere dağıtılıp, katılaştıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Petriye dökme işlemi steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Paromomisinli besiyeri için Paromomisin petriye dökme işleminden hemen önce yaklaşık 50°C’de eklenmiştir ve soğuduktan sonra +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Katı besiyerleri soğuyana kadar steril kabinde petri kapakları tam kapatılmadan bekletilmiştir. Kimyasallar Sigma markasıdır.

3.1.1. TAP besiyeri

1 lt için TAP besiyeri içeriği ve miktarları aşağıda verilmiştir (pH: 7)

Tris Base (örn. Trizma)	2,42	g
Fosfat Tampon II	1.0	ml
Solüsyon A	10.0	ml
Hunter's Trace Element	1.0	ml
*Glasiyal Asetik Asit	1.0	ml

Fosfat Tampon II (100 ml için)

K ₂ HPO ₄	10.8	g
KH ₂ PO ₄	5.6	g

Solüsyon A (500 ml için)

NH ₄ Cl	20.0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	5.0	g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2.5	g

3.1.2. TA besiyeri

Fosfatsız besiyeri olarak kullanılan TA besiyeri içeriği ve miktarları 1 lt için aşağıda verilmiştir.

Tris base	20.0	ml
KCl Solüsyon	1.0	ml
Hunter's Trace Element	1.0	ml
Solüsyon A	10.0	ml
Glasiyal Asetik Asit	1.0	ml

3.1.3. Azotsuz ortam SEM-N (SEM örnek hazırlama ve N-genel ortam için)

1 lt için Azotsuz Ortam SEM-N besiyeri içeriği ve miktarları aşağıda verilmiştir.

N-eksik Beijerinck's	20.0	ml
Fosfat minimal tampon	1.0	ml
Hunter's Trace Element	1.0	ml

N-eksik Beijerinck's (1 lt için)

CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0	g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2.0	g

Fosfat Minimal Tampon (1 lt için)

K ₂ HPO ₄	14,34	g
KH ₂ PO ₄	7,26	g

3.1.4. Sülfatsız besiyeri

Tris base	20.0	ml
-S Beijerinck	50.0	ml
Fosfat Tampon II	1.0	ml
Hunter's Trace Element	1.0	ml
GlasiyalAsetik Asit	1.0	ml

-S Beijerinck (1 lt için)

NH ₄ Cl	8.0	g
CaCl ₂ 2H ₂ O	1.0	g
MgCl ₂ 6H ₂ O	1.6	g

3.1.5. Paromomisinli besiyeri

100 mg paromomisin'e (Goldbio) 10 ml ddH₂O eklendikten sonra çözdürölüp stok çözelti hazırlanmıştır. Daha sonra 0,22 µm por büyüklüğüne sahip steril şırınga filtresinden (İsolab) geçirilmiştir.

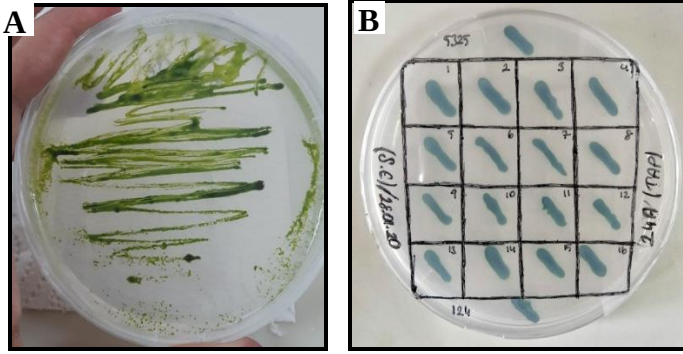
Otoklavlı ve %1,5 agarlı TAP besiyerine, petriye dökmeden önce paromomisin eklenmiştir. Paromomisin ekleme aşaması için besiyerinin yaklaşık 50°C olması beklenmiştir. 10 mg/ml stok paromomisin çözeltisinden 1 ml/lt oranında eklenmiş olup sonuç olarak besiyerindeki konsantrasyonu 10 mg/lt olarak hazırlanmıştır. Daha sonra petrilere dağıtılmıştır. Hazırlanan besiyeri +4°C buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.2. Chlamydomonas Suşlarının Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan suşlar ve mutantlar Chlamydomonas Center'dan alınmıştır. Chlamydomonas Center'dan edilen yer insersiyonun kesin olarak belirtilen yerde olduğuna dair veya insersiyona sahip olduğuna dair kesin bilgi vermemekte olup mesuliyet kabul etmemektedir. İnsersiyonel mutantın seçiminde Phytozome internet adresinden *Chlamydomonas reinhardtii* türü'nde SEC24A genine ait CLIP sayfasından güven derecesi en yüksek olan mutant seçilmiştir (Li vd. 2019).

3.3. sec24a Mutantından Klon Oluşturma

Chlamydomonas Center'dan gelen hücreler önce %1,5 agarlı TAP besiyerine ekilmiştir. 1 hafta büyütüldükten sonra ince uçlu uzun otoklavlanmış steril kürdan ucu ile az bir miktar alınarak %1,5 agarlı TAP besiyerine zikzaklar şeklinde çizim yapılmıştır. Hücreler 10 gün büyütüldükten sonra tek koloniler alınıp parçalara bölünen %1,5 agarlı TAP besiyerine dikkatlice karıştırılmadan transfer edilmiş ve büyütülmüştür. Şekil 3.1-A'da klon oluşturmak için ekim yapılan petride oluşan kolonlar, Şekil 3.1-B'de ise tek tek alınan kolonilerin TAP besiyerinde büyütüldüğü görülmektedir. Bir petri ilk önce 6 parçaya bölünüp 6 klon oluşturulmuştur. Daha sonra 1 numaralı klondan tekrar çizim yapıp, 16 parçaya bölünmüş olan TAP %1,5 agarlı katı besiyerine 16 adet klon oluşturulmuştur.



Şekil 3.1. Klon oluşturma

A: Çizim yapılarak oluşturulan kolon petrisi; **B:** Tek tek alınan klonların büyütülmesi

3.4. DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu Thermo Scientific™ GeneJET Bitki Genomik DNA Pürifikasyon Kiti ile gerçekleştirilmiştir (Katalog numarası: K0791). İzolasyonu gerçekleştirilmeden önce hücreler %1,5 agarlı TAP besiyerinde en az 1 hafta büyütülmüştür. Uygulanan izolasyon işlemi aşağıda maddelenmiştir;

- I. RNase-DNase içermeyen 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne 350 µl *Lysis Tampon A* eklendi. Ardından hücreler steril kabin içerisinde öze ile alınıp lysis A içerisinde karıştırır gibi yaparak dağıtıldı ve 20 saniye vortex yapıldı
- II. 50 µl *Lysis Tampon B* ile 20 µl *RNase A* eklendi ve 1 dakika vortex yapıldı
- III. 65°C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi ve 5 dakikada bir karıştırıldı
- IV. 130 µl *Precipitation Solution* eklenip hemen ardından tüp 3 defa alt-üst edildikten sonra 5 dakika buz üzerinde bekletildi
- V. 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj gerçekleştirildi
- VI. Süpernatant yeni bir RNase-DNase içermeyen steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 400 µl *Plantg DNA Binding Solution* ve 400 µl %96 *EtOH* eklendikten sonra iyice karıştırıldı
- VII. Tamamı Spin Column'a aktarıldı. 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra tüpteki sıvı döküldü
- VIII. 500 µl *Wash Tampon I* column üzerine eklendi ve 3 dakika 10.000 rpm santrifüj gerçekleştirildi. İçindeki sıvı döküldü ve column aynı tüpe tekrar yerleştirildi
- IX. 500 µl *Wash Tampon II* column üzerine eklendi ve 3 dakika 14.000 rpm santrifüj yapıldı. İçindeki sıvı döküldü ve column aynı tüpe tekrar yerleştirilip 1 dakika 14.000 rpm santrifüj yapıldı. Column yeni steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı
- X. 100 µl *Elution Tampon* column membranının tam ortasına eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi ardından 1 dakika 10.000 rpm santrifüj yapıldı

İzole edilen gDNA'lar -20°C'de depolanmıştır.

3.5. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu "NucleoSpin[®] Bitki RNA İzolasyon Kiti" ile gerçekleştirilmiştir. Kit protokolü aynen uygulanmış olup, ek olarak kit protokolünde

yer almayan enjektörleme işlemi yapılmıştır. İzolasyonu gerçekleştirilmeden önce hücreler %1,5 agarlı TAP besiyerinde en az 1 hafta büyütülmüştür. Uygulanan izolasyon işlemi aşağıda maddelenmiştir;

- I. RNase-DNase içermeyen 1,5 ml ependorf tüpüne 350 µl *RA1* ve 3,5 µl β -*merkaptoetanol* eklendi. Ardından hücreler steril kabin içerisinde öze ile alınıp ependorf içerisinde homojenize edildi ve 1 dakika şiddetli vortex yapıldı
- II. Ardından iğnesi 21G olan enjektör ile çekilip şiddetli şekilde tüpe geri bırakıldı. Enjektörleme işlemi 6 defa tekrarlandı
- III. Kapaksız ependorf tüpe *mor filtre* kullanılarak filtreden geçirildi ve ardından 11.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı
- IV. Altta kalan sıvı RNase-DNase içermeyen 1,5 ml ependorf tüpüne aktarıldı. Üzerine %70 EtOH'den 35 µl eklenerek hemen 5 defa alt üst edildi
- V. *Açık mavi filtre collection tüpüne* takıldı ve örnekler aktarıldı. 11.000 g hızda 30 saniye santrifüj uygulanıp örnekler filtreden geçirildi
- VI. *Açık mavi filtre* yeni steril kapaksız 2 ml tüpe takıldı üzerine 350 µl *MDB (Membrane Desalting Tampon)* eklendikten sonra 11.000 g'de 1 dakika santrifüj yapıldı
- VII. 95 µl *DNase reaction mixture* filtrenin tam ortasına eklendikten sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi
- VIII. İlk yıkama için; 200 µl *Tampon RAW2* eklendi ve 11.000 g'de 30 saniye santrifüj uygulandı
İkinci yıkama için; Yeni 2 ml collection tüpüne santrifüjden çıkan filtre (column) alındı. 600 il *Tampon RA3* eklendikten sonra 11.000 g hızda 30 saniye santrifüj uygulandı. Altta kalan sıvı döküldü ve kullanılan filtre tekrar takıldı. Üçüncü yıkama için; Filtrenin tam orasına 250 µl *Tampon RA3* eklendikten sonra 2 dakika 11.000 g hızda santrifüj yapıldı.
- IX. Üzerindeki filtre alınıp 1,5 ml steril yeni ependorf üzerine yerleştirildi.
- X. RNA'yı elüte etmek için 50 µl H₂O filtrenin tam merkezine dokunmadan eklendi. 11.000 g hızda 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra alttaki sıvı alınıp aynı filtreye tekrar eklendi.
Ardından 2. Elüsyon için; 11.000 g hızda 1 dakika santrifüj yapıldıktan sonra filtre atıldı ve RNA daha sonra kullanılmak üzere -80°C'de saklandı

İzolasyondan sonra Nanodrop cihazında RNA miktarı ng/ml olarak ölçülmüştür.

3.6. Mutant Genomundaki İnsersiyonun PCR ile Belirlenmesi

PCR analizinde *sec24a* mutantından klon 1, klon 2, klon 3 ve klon 4 kullanılmıştır. Yabanıl tip olarak ise CC-124 ve CC-5325 suşları analize dahil edilmiştir. Projeni analizlerinde ise tetrat 1'in dört projesi de analiz edilmiştir. Çizelge 3.2'deki PCR (Polymerase Chain Reaction- polimeraz zincir reaksiyonu) bileşenleri, kapaklı 1,5 ml steril ependorf tüpe DNA haricinde sırayla eklenmiştir. Daha sonra PCR tüplerine 11,5 µl dağıtılıp DNA örneklerinin eklenmesiyle toplam volüm 12,5 µl olarak analiz hazırlanmıştır. Qiagen markasının Taq DNA Polymerase and Taq PCR Core Kiti kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir.

Kontrol PCR OMJ282-OMJ284 primerleri ile gerçekleştirildi. Fakat OMJ primerleri farklı TM sıcaklıkları denenmesine rağmen (57°C ve 54°C) güvenilir çalışmadığı için başka primer kullanmaya karar verilmiştir.

Çizelge 3.2. PCR ve RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri

PCR/ RT-PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
H ₂ O	4,95
5X Q solüsyon	2,5
10X Tampon	1,25
dNTP	0,25
Forward (İleri) primer	1,25
Reverse (Geri) Primer	1,25
Taq DNA polimeraz	0,05
DNA ya da cDNA	1 ya da 2

Elimizde bulunan qSEC24B3utr-R ve qSEC24B3utr-F primerleri kullanılarak kontrol PCR gerçekleştirilmiştir. Chlamydomonas Center'ın alınan mutantlar için önerdiği spesifik SEC24A primeri ile ayrı bir PCR gerçekleştirildi. İnsersiyon bölgesini kapsayan bu primerler SP1-SEC24A-F ve SP2-SEC24A-R'dır. Analizlerde kullanılan primerlerin baz sekansları Çizelge 3.3'de verilmiştir. İnsersiyon bölgesinin ve kullanılan primerlerin SEC24A gen modeli üzerindeki yeri Şekil 3.2'de gösterilmiştir.

➤ Uygulanan PCR protokolü aşağıda verilmiştir. İnsersiyon bölgesini kapsayan SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan PCR analizi protokolü;

İlk denatürasyon	95 °C	5'	
Denatürasyon	95 °C	30"	
Primer bağlanması	58 °C	40"	
Uzama	72 °C	1' 45"	
Son uzama	72 °C	10'	

x39

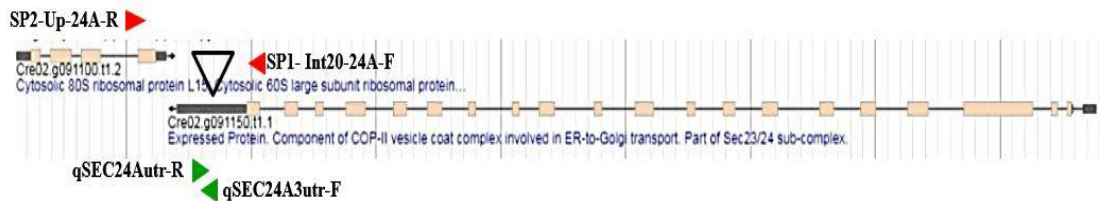
➤ Kontrol PCR analizi için qSEC24B3utr-R ve qSEC24B3utr-F primerleri ile uygulanan protokol;

İlk denatürasyon	95 °C	5'	
Denatürasyon	95 °C	30"	
Primer bağlanması	54 °C	40"	
Uzama	72 °C	1' 45"	
Son uzama	72 °C	10'	

x39

Çizelge 3.3. PCR ve RT- PCR analizlerinde kullanılan primerlerin baz sekansları

Primer Adı	Nükleotid Sekansı	Beklenen Ürün Büyük- lüğü (bp)	Kullanılan Analiz
SP1- Int20-24A-F	5' - GCTGCCTCCCTCTCTCTCTT-3'	1414	PCR
SP2-Up-24A-R	5' - CACTGTACAGGCAGCCATTG-3'		
qSEC24B3utr-F	5'-GGGCTCACGAAACAGAAGAA-3'	152	Kontrol PCR
qSEC24B3utr-R	5'-GCTGGTGTGTTGGTGGTGGTGTAAAG-3'		
OMJ282	5' - ATGCTTCTCTGCATCCGTCT -3'	1270	Kontrol PCR
OMJ284	5' - ATGTTTTACGTCCAGTCCGC -3'		
q-CBLP-F1	5'-CTTCTCGCCCATGACCAC -3'	105	Kontrol RT-PCR
q-CBLP-R1	5'-CCCACCAGGTTGTTCTTCAG-3'		
q-CBLP-F2	5'-CCGCTGTACAGGGTGGAG-3'	195	Kontrol RT-PCR
q-CBLP-R2	5'-CAAGATCTGGGACCTGGAGA-3'		
23A-E10-F	5'-GCCTACTTCTACGTGGTGGT-3'	769	Kontrol RT-PCR
23A-3utr-R	5'-TCAAACACTCCGCTACCCAT-3'		
qSEC24A3utr-F	5' - CACTGGGAAGGTCGAGGAAC-3'	153	RT-PCR
qSEC24A3utr-R	5' - CACTTCTCTCGCTGCATGTC-3'		

**Şekil 3.2.** İnsersiyon bölgesinin ve kullanılan primerlerin SEC24A gen modeli üzerindeki yeri

Kırmızı ok (►):İnsersiyon bölgesini belirlemek için yapılan PCR analizinde kullanılan SP1- Int20-24A-F ve SP2-Up-24A-R primerleri; **Yeşil ok (►):** RT-PCR analizinde kullanılan qSEC24A3utr-F ve qSEC24A3utr-R primerleri; **Siyah ok (▼):** İnsersiyon bölgesi

3.7. RT-PCR

RT-PCR analizlerinde yabancı suş olarak mutant ebeveyni olan CC-5325 ve yabancı tip CC-125 kullanılmıştır. *sec24a* mutant klonlarından ise 1 ve 2 numaralı klon seçilerek analiz edilmiştir.

cDNA Sentezi

cDNA (Komplementer DNA) sentezi Invitrogen- Superscript III Reverse Transcriptase protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Protokoldeki RNaseOUT kullanılmamıştır. Uygulanan cDNA sentezinin protokolü kısaca aşağıdaki gibidir (1 örnek için) ;

- I. Nükleazsız steril mikrosantrifüj tüpüne;
1 µl oligo(dT)₂₀ (50 µM)
300-500 ng arası RNA
1 µl 10 mM dNTP Mix
- II. 65°C’de 5 dakika daha sonrada buz üzerinde 1 dakika inkübe edildi
- III. Hazırlanan mix tüpe eklendi;
4 µl 5X First-Strand Tampon
1 µl 0,1M DDT
- IV. 1 µl Super Script™ III RT (200 units/ µl) eklendi
- V. Birkaç defa pipetleme ile alt üst edildi
- VI. 50°C’de 60 dakika ardından da 70°C’de 15 dakika inkübe edildi.

Elde edilen cDNA’lar -80°C’de depolanmıştır.

Uygulanan RT-PCR protokolü aşağıda verilmiştir.

- SEC24A gen ekspresyonunu analiz etmek için kullanılan q-24A-F/q-24A-R primerleri ile uygulanan RT-PCR protokolü;

İlk denatürasyon	95 °C	5'	} X35
Denatürasyon	95 °C	30"	
Primer bağlanması	57 °C	40"	
Uzama	72 °C	20"	
Son uzama	72 °C	5'	

- q-CBLP-F1/ q-CBLP-R1 q-CBLP-F2/q-CBLP-R2 ve primerleri ile uygulanan kontrol RT-PCR protokolü;

İlk denatürasyon	95 °C	5'	} X35
Denatürasyon	95 °C	30"	
Primer bağlanması	52 °C	40"	
			20

Uzama	72 °C	20 "
Son uzama	72 °C	5 '

RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction- Reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu) hazırlama ve reaksiyon bileşenleri PCR ile aynı olup sadece 1 µl DNA yerine 2 µl cDNA eklenmiştir. RT-PCR analizinde kullanılan primerlerin baz sekansları ve beklenen ürün büyüklükleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

3.8. Agaroz Jel Elektroferoz ve Örneklerin Yüklenmesi

➤ Tampon çözeltisi hazırlama

Elektroforezde tampon (tampon) çözeltisi olarak TAE (Tris Acetate EDTA) kullanılmıştır. Stok çözelti olarak 50X TAE tampon hazırlanmıştır. 1M Tris 242 g; Glasiyal asetik asit 57,1 ml; 0,5 M EDTA (pH: 8.0) bir miktar ddH₂O içerisinde eklenmiştir daha sonra ddH₂O ile 1 litreye tamamlanmıştır. Çalışmada 50X stok çözeltisinden 1X hazırlanıp kullanılmıştır.

➤ Agaroz Jel hazırlama

Agaroz jel hazırlamada 1X TAE tampon çözeltisi ve %1 olacak şekilde agaroz kullanılmıştır. Hazırlama işlemi erlende 100 ml 1X TAE tampon çözeltisi içerisinde 1 g agaroz tartılmış ve eklenmiştir. Mikrodalga fırında ara ara karıştırılarak tamamen şeffaf görüntü oluşana kadar ısıtılmıştır. Görüntüleme için 100 ml agaroz jel için 2 µl EtBr kullanılmıştır. EtBr agaroz jel el ile tutulacak kadar soğuyunca eklenmiş ve iyice dağıtılmıştır. Daha sonra tarakların yerleştirildiği elektroforez tepsisine baloncuk oluşturmada dökülmüştür. Katılaştıktan sonra taraklar dikkatlice çıkartılıp jel tankın içine yerleştirilmiştir ve üzerine 1X TAE tampon çözeltisi eklenmiştir.

➤ Örneklerin jele yüklenmesi ve yürütme

PCR ve RT-PCR ürünleri jele 4 µl olarak yüklenmiştir. Daha önce 1:5 oranında ddH₂O ile dilüe edilen 3 µl DNA Marker'a 2 µl dye (6X Loading Tampon; yükleme çözeltisi) eklenerek jele yüklenmiştir.

Yürütme 50 dakika 150 Volt olarak yapılmıştır.

3.9. Antibiyotik Direnci Testi

10 mg/ml Paromomisinli ve %1,5 agarlı katı TAP besiyeri kullanılmıştır. 16 adet klonun yanında, yabani tip suşlardan CC-124 ve mutantın ebeveyni olan CC-5325 yabani suşu kullanılmıştır. Klonlar ve yabani suşlar TAP besiyerinde 1 hafta büyütüldükten sonra, paromomisinli besiyerine ve karşılaştırmak için TAP katı besiyerine ekilmiştir. 1 hafta büyüdükten sonra fotoğrafları çekilip karşılaştırılmıştır.

3.10. Enzim Aktivite Testi

Sülfat ve fosfat hazırlanışı aşağıda verilmiştir;

X-PO₄ (5-bromo- 4-chloro 3-indolyl phosphate, Sigma) 0,01852 g tartılıp falkon tüpe eklenmiştir. Sonrasında buz üzerinde otoklavlı ddH₂O ile 5 ml'e tamamlanmıştır. 500 µl olacak şekilde ependorfların içerisine bölünerek folyoya sarılmıştır ve -20°C'de depolanmıştır. Çalışma konsantrasyonu 10 mM'dır.

X-SO₄ (FW 364,6) 0,01852 g tartılıp falkon tüp içerisine buz üzerinde 500 µl Tris-Cl (1M; pH: 7,5) eklenmiştir ve ddH₂O ile 5 ml olacak şekilde tamamlanmıştır. Çalışma konsantrasyonu 10 mM'dır.

sec24a klonları TAP %1,5 katı besiyerinde 1 hafta büyütülmüştür. Daha sonra sülfatsız besiyerine ve fosfatsız besiyerine 16 adet klonun yanında, yabancı tip suşlardan CC-124 ve mutantın ebeveyni olan CC-5325 suşu hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Bir hafta büyütüldükten sonra aktivite testlerine bakılmıştır. Fosfataz ve sülfataz eğer salgılanıyorsa hücrelerin bulunduklara agara da işleyeceği için üzerindeki fazla hücreler bir peçete yardımıyla alınmıştır. Büyütülen klonların ve yabancı suşların bulunduğu sülfatsız besiyerindeki hücrelere 10 µl sülfat ve fosfatsız besiyerindeki hücrelere 10 µl fosfat damlatılmıştır. Uygulamadan 30 dakika sonra, 1 saat sonra ve 24 saat sonra fotoğrafları çekilip değerlendirilmiştir.

3.11. Çaprazlama ve Tetratların Diseksiyonu

16 klon içerisinden klon 1 seçilmiştir ve CC-125 ile çaprazlanmıştır. Yabancıllardan ise CC-5325 ile CC-125 çaprazlanmıştır. Çaprazlama işlemleri için her suş ve seçilen 1 numaralı klon ayrı ayrı cam tüplere 1 ml azotsuz SEM-N sıvı besiyerine içine öze yardımıyla dağıtılmıştır. Hücreler ışık altında 0-16 saat azotsuz besiyerinde bekletilmiştir. 0-16 saat sonunda 2 ayrı cam tüpe 500 µl CC-125 eklenmiştir. Daha sonra bir tüpe 500 µl CC-5325 diğerine de *sec24a(k-1)* eklenmiştir. İlk 5-10 dakika, 25-30 dakika, 40 dakika gibi bazı aralıklarla aglütinasyon, hücre füzyonu, çift oluşumu ve QFC hücrelerin varlığının olup olmadığı tespit edilip fotoğraflar çekilmiştir.

Çaprazlamadan sonra yaklaşık 6 saat ışık altında bekleyen hücreler sonra %4 agar içerikli katı TAP besiyerine yayılmıştır. Yayma birkaç petriye yapılmıştır. Yayma işlemi yapılırken sıvı azotsuz ortamda çaprazlanan hücrelerden (CC-5325 x CC-125 ve *sec24a(k-1)* x CC-125) filtreli pipet ile 150 µl alınıp katı %4'lük TAP besiyerine aktarılmıştır. Hücreler %4 katı TAP besiyerine yayılırken sıvının petri kenarlarına gelmemesine dikkat edilmiştir. Zigot petrilere en az 6 gün karanlıkta bekletilmek üzere aliminyum folyolara sarılmış olup, 6 gün sonunda binoküler mikroskop altında oluşan tetratların her birinin diseksiyonu yapılmıştır. Diseksiyonu yapılan tetratlar ve projenileri numaralandırılıp %1,5 agarlı katı TAP besiyerine aktarıldı. Aktarılan projeni hücreleri 1 hafta büyütüldü.

Çaprazlama yapılmadan önce *sec24a(k-1)* için hücre anormallikleri incelenmiştir. Hücre anormallikleri azotsuz besiyerinde ve ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

3.12. Projeni Hücrelerinde Antibiyotik Direnci, Çiftleşme Tipleri ve Morfolojinin Belirlenmesi

- Antibiyotik direnci testi

%1,5 agarlı TAP katı besiyerinde 1 hafta büyütülen projeni (döl) hücreleri, paromomisinli %1,5 agarlı katı TAP besiyerine ve %1,5 agarlı TAP besiyerine ekim yapılmıştır. 1 hafta büyütülen hücrelerden paromomisine dayanıklı olanlar ve olmayanlar belirlenmiştir.

➤ Çiftleşme tipinin belirlenmesi

Çaprazlama öncesi hücreler 15 saat azotsuz SEM-N sıvı besiyerinde ışık altında bekletilmiştir. Tetratlardaki 4 projenin her biri hem mt^+ olan CC-125, hemde mt^- olan CC-5325 ile çaprazlanmıştır. Sonrasında tetratlarının her projesi 1:1 (500 μ l: 500 μ l) oranında hem CC-5325 hem de CC-125 ile ayrı cam tüplerde karıştırılmıştır. Işık mikroskobu altında aglütinasyon vb. generatif üreme aşamaları incelenmiştir. Aglütinasyon ya da zigot pelikülü, CC-125 ile çaprazlanan incelemede görüldü ise projeni mt^- olarak belirlenmiştir. Aglütinasyon ya da zigot pelikülü, CC-5325 ile çaprazlanan incelemede görüldüyse projeni mt^+ olarak belirlenmiştir. Zigot pelikülü çaprazlamadan en az 24 saat sonra incelenmiştir. 24 saatlik süreçte kültürler ışık altında bekletilmiştir.

➤ Morfoloji ve renk

Projenilerin %1,5 agarlı TAP besiyerinden, yine %1,5 agarlı TAP içeren petrilere ekimi sırasında açık yeşil ve koyu yeşil olarak renkleri belirlenmiştir. Morfoloji olarak ise uzayan ve sıvı bir yapıya sahip olanlar akışkan; sert ve ekim sırasında toplanan, dağılmayan bir yapıya sahip olanlar ise katı olarak nitelendirilmiştir.

3.13. Biyoinformatik Analizler

Çalışmada kullanılan protein sekansları ve Accession numaraları Çizelge 3.4’de verilmiştir. Protein sekansları *Chlamydomonas reinhardtii* ve *Volvox carteri* türleri için Phytozomev12.1 Bitki Genomik Kaynakları (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) veritabanından alınarak kullanılmıştır. Analizlerde bulunan *Arabidopsis thaliana*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Saccharomyces cerevisiae* türlerinin protein sekansları ise NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanından alınmıştır.

➤ Hizalama analizleri;

Protein sekansları UNIPROT (<https://www.uniprot.org/align/>) veritabanındaki hizalama ile analiz edilmiştir. Veritabanı hizalama analizlerinde CLUSTALO programını kullanmaktadır. Sonuçlar tablolaştırılmış ve benzerlik yüzdelere göre sıralanmıştır.

➤ Protein domain analizleri;

Protein domaini analizlerinde PFAM (<https://pfam.xfam.org/search/sequence#tabview=tab0>) veritabanı kullanılmıştır. Sekans arama seçeneğine protein sekansı yapııştırılmış ve sonuçlar daha sonra tablo haline getirilmiştir.

Çizelge 3.4. Biyoinformatik analizlerde kullanılan protein sekansları

Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; **Vc:** *Volvox carteri*; **At:** *Arabidopsis thaliana*; **Mm:** *Mus musculus*; **Hs:** *Homo sapiens*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*

Protein	Accession
CrSEC24A	Cre02.g091150.t1.1
CrSEC24B	Cre01.g035850.t1.2
ScSec24p	1M2V_B
Lst1p (SFB3p)	NP_011966.1
Iss1p (SFP2p)	P53953
AtSec24A	NP_187366.2
Atsec24B (CEF)	NP_001326943.1
AtSec24C	NP_001119101.5
HsSec24A	NP_068817.1
HsSec24B	AAI43269.1
HsSec24C	NP_04913.1
HsSec24D	NP_055637.2
MmSec24A	NP_780464.2
MmSec24B	NP_997092.1
MmSec24C	AAH40370.1
MmSec24D	NP_081411.2
VcSec24	Vocar.0001s1208.1
VcSEC24 (SF4)	Vocar.0001s0725.1
VcSEC24 (SFB2)	Vocar.0009s0279.1

➤ Protein sekonder yapı ve 3D analizleri;

Proteinin sekonder yapısının belirlenmesinde PHYRE2 programı kullanılmıştır (Kelley 2015). Protein sekansı analiz için programa gönderildikten 6 saat sonra

sonuçları mail olarak göndermektedir. Sonuç dosyasında; kristal yapısı çözümlenen proteinlerden analiz proteinine en fazla benzerliği olan proteinlerin sıralanması, gönderilen proteinin “.pdb” uzantılı belgesi vb. içerikler bulundurmaktadır. Ayrıca 3D yapı görüntüsü de gönderilen URL üzerinden alınabilmektedir.

Sekonder yapı analizinde PHYRE2 programının verdiği görüntü kullanılmıştır. Ayrıca verilen pdb belgesi, FirstGlance (<https://bioinformatics.org/firstglance/fgij/>) programına yüklendiğinde verilen sekonder yapı ile PHYRE2 programının verdiği sekonder yapı karşılaştırılıp güvenilirliği artırılmıştır. Proteinin sekonder yapısındaki heliks, coil vb. yapıların yüzde oranları FirstGlance sonucundan alınmıştır.

HsSec24D proteini ve ScSec24p için kullanılan 3D görüntüleri RCSB PDB (H.M. Berman vd. 2000) (<https://www.rcsb.org/>) veritabanı üzerinden alınmıştır. HsSec24D proteini için pdb kodu 3eg9 ve chain: B kullanılırken, ScSec24p için kullanılan pdb 1M2V chain: B'dir. Görüntüleme seçenekleri karşılaştırmanın kolay olması amacıyla sekonder yapı renklendirmeli olarak değiştirilmiş ve ardından da JSMOL görüntülemesi seçilerek, arka planı siyah olacak şekilde ekran görüntüsü alınmıştır.

➤ Protein lokalizasyon tahmini

Lokalizasyon tahmininde 3 farklı program kullanılmıştır. Bunlar; PredAlgo (Tardif vd. 2012), TargetP 1.1 (Emanuelsson vd. 2000) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP-1.1/index.php>) ve Phobius (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/phobius/>) programlarıdır. Analiz yapılırken protein sekansları kullanılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Biyoinformatik Bulgular

4.1.1. Hizalama analizi ve F-X-P motifinin belirlenmesi

C. reinhardtii SEC24A protein sekansı ile bazı diğer organizmalarda bulunan SEC24 sekansları hizalama yapılmıştır. Sonuçlara göre *Volvox carteri* SEC24 proteini (VcSEC24) %75.493 ile en fazla benzerlik gösteren olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). Ayrıca ScSec23p üzerindeki VFR (Valin-Fenilalanin-Arjinin) aminoasitlerinin Scsec24p proteini üzerindeki FLP (Fenilalanin-Lösin-Prolin) aminoasitlerinden özellikle korunmuş F-X-P aminoasitlerine bağlandığı bilinmektedir (Bi vd. 2002). VcSec24 proteini üzerinde bu aminoasitler hizalama sonunda değişim göstermemiş olup Şekil 4.1’de gösterilmiştir. *Volvox* iki hücre tipinden oluşan çok hücreli yeşil bir algler türüdür. Gonidium ve yaklaşık 2000 tane somatik olmak üzere iki farklı hücre tipine sahip olan *V. carteri*’de, *C. reinhardtii*’nin aksine üreme ve yüzme farklı hücreler tarafından gerçekleşmektedir. Üreme becerilerini yitiren ve jelatinimsi hücre dışı matris yüzeyinde tek tabakada bulunan somatik hücrelerin görevi yüzmek, *V. carteri*’yi ışık altında tutmak böylece fotosentez yapmaktır. Üreme, Gonidium adı verilen özel hücre tarafından gerçekleştirilir. Bölünme özelliğine sahip olan Gonidia hücreleri büyüktür ve flagella yapısı olmadığından dolayı yüzemaz. Somatik hücreler küçük ve flagella sahibi olması nedeniyle *C. reinhardtii*’ye oldukça benzemektedir (Miller 2010).

C. reinhardtii SEC24A protein sekansının heterodimerleri olan CrSEC23A, CrSEC23B ve paraloğu CrSEC24B ile yapılan hizalama sonucu ise sırasıyla; %12.974, %12,701 ve %35,133’dür. Diğer organizmalardaki SEC24 proteinleri ile yapılan hizalama sonuçlarına göre benzerlik yüzdeleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Sec23 proteinine bağlanma aminoasitleri ScSec23/24p kristal yapısında belirlendiği için ScSec24 ile yapılan hizalama sonucu Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekil 4.2’nin sonucuna göre ScSec24p üzerindeki FLP aminoasitleri CrSEC24A’da FVP olarak belirlenmiştir. CrSEC24A proteininin paraloğu olduğu için CrSEC24B ile yapılan hizalama sonucu Şekil 4.3’de verilmiştir. Şekil 4.3’de görüldüğü gibi FVP aminoasitleri CrSEC24B’de FAP olarak değişim göstermektedir. CrSEC24A 3D konformasyonunu oluştururken baz alınan HsSec24D proteininde FLP aminoasitleri FVP olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak ScSec24p’de görülen FLP aminoasitleri; CrSEC24A, CrSEC24B, VcSec24, HsSec24B proteinlerinde F-X-P motifi olarak korunmaktadır.

CrSEC24A VcSEC24	1 1	MTNQPGYGAPR---PFFPQGGVFPAPGMMLQGAPGG-GFFPFGPFGMLFPFGMPFFPG-- MYPPFSYGARPPYPGAPFPFGGMFPFGGMFPFFPFGAAGFFFP-PLGGAPFGMPFLPGGG * * * * *	53 59
CrSEC24A VcSEC24	54 60	-----PPGMAPPFGMPPFPAPYGMFPFGPFGMFPFGPQG-----MPFPFGPPAMQPGM PPGAQPLGMFPFGMPSAPF----FRPQGPPGAVGPAGPSVPGGMMPFPFGPPGV----- * * * * *	103 110
CrSEC24A VcSEC24	104 111	PFGHSMGGAQPPHFGQMGPSPAPRPPAPFPFGSFGGAPGMPQPGAPFPFGMPGMPFFPG PQGPGSASQMGP-----GSVAGAFFPFGPFGGMP-----PFPFGPAGRPMPFPFG * * * * *	163 168
CrSEC24A VcSEC24	164 169	PFGMQPQARPPFGMFPFGPFGMAFMGMPFPFGPFGMAPFPFGPFGMAPFPFGPFGMP PPGVPG-----MPA--FVPGMFGMPFPFGPGIPGKAP-FGPPGMPGMP-----PFPFGMP * * * * *	223 205
CrSEC24A VcSEC24	224 206	GMPPA-PAGFHAPGVFPFGPFGGFPFGPFGMVGMFPFGMAGYDFYSG-QRMMEQFESLTL GMFPFGPFGFHTAGAPPLS-----GGPGRHGMQFPFGGYDPIYAAQQLAEQFESLTV * * * * *	261 259
CrSEC24A VcSEC24	282 260	GAAGPG--QPEGVDPAFLPRPVGEALERALTAKSPGDPANCSPDNMFMNTINAIPIVSTALK GPAGPGAMPDGVDPGALARPVGQQLARALAPQPADPGNCSPDNMFMNTINAIPIVSTALK * * * * *	339 319
CrSEC24A VcSEC24	340 320	ARMLPLGVVHPMADEFYGRQVFPVQLSSAGIVRCRCRTYMNPFQIQTWDAGARFKCNV TRMALPLGVVHPMADEFYGRQVFPVQLSSAGIVRCRCRTYMNPFQIQTWDAGARFKCNV * * * * *	399 379
CrSEC24A VcSEC24	400 380	CAMLINEIPVEYFSSLDQNGRRRDADEPFLSQGTVEYVAPADYMWSPMPPEVYFFCIDVS CSMLNEIPVEYFSSLDHNGRRRDADEPFLSQGTVEYVAPADYMWSPMPPEVYFFCIDVS * * * * *	459 439
CrSEC24A VcSEC24	460 440	YAAVASGAVATTAAAIKACLDQLPGDERTLVGFLTFDSSLHFYNLKASLTQFQMLVUTEL YSAVASGMVAIVAAAIKSCLDLPGDERTLVGFLTFDSSLHFYNLKASLTQFQMLVUTEL * * * * *	519 499
CrSEC24A VcSEC24	520 500	DDPFVFLPDDLLVNLRESRQVVEALLDALPNNFTAGTSVVESAMGPAQAAMVSSHIGGK DDPFVFLPDDLLVNLRESRAVVDALLDALPNNFTGTAVCECSMGPAQAAMVSSHIGGK * * * * *	579 559
CrSEC24A VcSEC24	580 560	LLLFQSSVPSLGVGRVKNRNPASAYGTEREPGLRNPDDPFYKRYAAECRSVQITVDVFAM LLLFQSSVPSLGVGRVKNRNPASAYGTEREPALRNPDDPFYKRYAAECRSVQITVDVFAM * * * * *	639 619
CrSEC24A VcSEC24	640 620	AMQYTDLASLAAIPRYTCGELYYPGFMAARDGKTLAEITHNLTRTAWEAVMRVCBK SMQYCDLASLAAIPRYTCGELYYPGFMAARDGKTLAEITHNLTRTAWEAVMRVCBK * * * * *	699 679
CrSEC24A VcSEC24	700 680	GLRISAFHGHFFNRSTDLLALPTCDPKAFAMEIAHEEGVVPQGFAYVQCALLYTNSNGE GLRISAFHGHFFNRSTDLLALPTCDPKAFAMEIAHEEGVVPQGMAYVQCALLYTNSNGE * * * * *	759 739
CrSEC24A VcSEC24	760 740	RRIRVHTMAVPIVSELADMFAATDAGAMTTMAKLSVEKYLSSRLDETRQSLHARLSGAL RRIRVHTMAVPIVSELSDLYNNTDAGAMSCMLAKLSVEKYLSSRLDETRQSLHARLSGAL * * * * *	819 799
CrSEC24A VcSEC24	820 800	KEFRIMNANAALRTPNKLIFFETKYKLPITWTLGLMKCAAFRGGAQDVNADERIAVGHFLM KEFRIMNANAALRTPNKLIFFETKYKLPITWTLGLMKCAAFRGGAQDVNSDERIAVGHFLM * * * * *	879 859
CrSEC24A VcSEC24	880 860	AGGVEAVARLAYPTAYALHDPSGPGWMEQQDGSVPVPAAVPLSAAVLQDGGVYLIDIGRV AGGVDAVARLVYPAALHDPSGPGWMEQQDGSVPVPLPTVPLTMAALVDGGAYLLDTGRV * * * * *	939 919
CrSEC24A VcSEC24	940 920	FVLWLGRAMSPQWCVEVFGTDPLSLPQDTSAVIVEPGRDTPMSGRVTTLLRALRAGRPLH FVLWVGRATSPQWCVEVFGTDPLSLPQDTSAVLVEPGRDAPMSRRVNAVLRITLRAKRLH * * * * *	999 979
CrSEC24A VcSEC24	1000 980	QQVEFVVRQGSPLPHVLPYLVEDRSPSTQSYTDYMSVLHKAVLAK QQVEFVVRQGSGLDAHVLPHYFVEDRSPSTQSYTEYMLHKAVMAK * * * * *	1044 1024

Şekil 4.1. CrSEC24A ile VcSec24 protein sekansı hizalama sonucu

Her renk farklı domaini göstermektedir; **Yeşil:** Sec23/Sec24 Zinc Finger; **Kırmızı:** Sec23 Alpha Beta Trunk Domain; **Mavi:** Sec23/Sec24 Beta Sandwich Domain; **Sarı:** Sec23/Sec24 Helical Domain; **Mor:** Gelsoline Repeat Domain; Ok ile işaretlenen *S. cerevisiae*'de Sec23p'e bağlanma bölgesi olan FLP aminoasitleri *Volvox carteri* Sec24 proteininde FVP olarak belirlenmiştir

Çizelge 4.1. CrSEC24A ile bazı organizmaların protein sekansının hizalama sonuçları
Cr: *Chlamydomonas reinhardtii*; **Vc:** *Volvox carteri*; **At:** *Arabidopsis thaliana*; **Mm:** *Mus musculus*; **Hs:** *Homo sapiens*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*

Organizma / Protein	Hizalama Benzerliği (%)	Eşleşen Aynı Aminoasit	Eşleşen Benzer Aminoasit
VcSEC24	75,493	804	93
AtSec24A	40,237	441	273
CrSEC24B	35,133	397	362
VcSEC24 (SF4)	32,947	370	276
AtSec24C	32	360	286
AtSec24B	31,342	362	282
MmSec24A	31,09	365	303
HsSec24A	29,655	344	318
HsSec24C	29,649	388	279
MmSec24C	28,584	333	299
HsSec24D	28,265	316	299
MmSec24D	27,986	314	302
MmSec24B	26,007	345	306
ScSec24p	25,551	278	300
HsSec24B	25,092	341	307
ScIss1	22,837	356	279
ScLst1	18,771	209	311
CrSEC23A	12,974	147	232
CrSEC23B	12,701	174	214
VcSEC24(SFB2)	10,973	150	219

CrSEC24A	ScSEC24	1	MYNQPGYCAPRPFFPQGGVPPAPGMMQLQCAPGGGFPFGPPGMFLPPGMPFPFGPPGMAPP	60
		1	-----MSHHKKRVYPOAQLQY	0
CrSEC24A		61	GMPPFPAPYGMPPPPGPPGMPFPFGPQGMPPFPFGPPAMQPQGMFPGHSMGGAAQPPHPPGQM	120
ScSEC24		1	-----MSHHKKRVYPOAQLQY	16
CrSEC24A		121	G---MPSGAP----RPPAPPPPGSFGGAPGMPQPGAPPPPGMGMPFPFGPPGMPQPARP	173
ScSEC24		17	GQNATPLQQAQFMFPQDFAAGMSYQGMGMPQGAIVPSMGQQQFLTPAQEQ-LHQQID-	74
CrSEC24A		174	PGMPFPFGPPGMAPMGMPFPFGPPGMAPFPFGPPGMAPFPFGPPGMPQPPGMPGMPAPAGFH	233
ScSEC24		75	-----QATTSMNDMH-----LHNVP-L-VDPNAYM	97
CrSEC24A		234	APGVPPPPGMPGGPPFPQGMV/GMPFPFMNAGYDFYSGQR--MMEQFESLTLGAAGPGQPEG	291
ScSEC24		98	QGVVFPVQMGITPLQQQQQP----MAAPAYGQPSAAMGQNMRAFMNQLVIFDILLTEL---PPP	150
CrSEC24A		292	VDPASLP-RPVGEALERALTAAHSPGDPAHSPDNMRMTINAIPVSTALKARMPPLPLGVVV	350
ScSEC24		151	ITDLTLPPPLVIPP-----RMLVPSSELSNASPDYIRSTLNAVFKNSLLKSKLFLGLVI	207
CrSEC24A		351	HPMADEFYGRQVFPVVLQSSAGIIVRCRCRCRTYNNPFIQWTDAGRRFKCNVCMALNIEIPEVEI	410
ScSEC24		208	RPYQHLYYDDI-DPPFLNEDGLIVRCRCRCRTYNNPFIQWTDAGRRFKCNVCMALNIEIPEVEI	266
CrSEC24A		411	FSSLDQNGRRRDERPELSQGTVEYVAPADYVVRPMPPEVYFFCIDVSYAAVASGAVAT	470
ScSEC24		267	DQSDPNK--PKSRYDRNEIKCAVMEYMAPEYTLRQPPATYCFCLIDVSYAAVASGAVAT	324
CrSEC24A		471	TAAAIKACLDQLPG-DERTLVGFLTFDSSLHFYNLKA-----SLTQPMILVUTELDDP	522
ScSEC24		325	TINTLQNLDSIPNHDERTRISILCVDNATHYFKIPLDSENNESAQDQNNMMDIADLEP	384
CrSEC24A		523	FVPLPDDLLVNLRESQVVEALLDALPNNFAGTSVVEASAMGPAQAAFMVSSHIGSKLL	582
ScSEC24		385	FLPRPNSMVVSLKACRQNIETLLIKIPQIFQSNLIINFALGPALKSAYHLIGVVGKIIIV	444
CrSEC24A		583	FQSSVPSSLGVGRVKNRENPSAYGTERE-PGLRNPDPDFYKRYAAECRSRQVITVDVFAMAM	641
ScSEC24		445	VSGTLFNLGIGIKLQRRNESGVVNTSKETAQLLSCQDSFYKNFTIDCSKVQITVDVFLASE	504
CrSEC24A		642	QVTDLASLAAIPRYTCGELYVYVPGFMAARDG--TKLTAEITHNLTRPTAWEAVTVRVCCK	699
ScSEC24		505	DYMDVASLNLRSRTAGQTHFYPGFSGLNPNDIVKFSSTEFAKHIMDFCMETVATARGST	564
CrSEC24A		700	GLRISAFHGHHFNRSDTLALPTCDPKAFAMEIAHEEGVVPQGFAYVQCALLYTNSNGE	759
ScSEC24		565	GLRMSRFYGHFFNRSDTLALPTCDPKAFAMEIAHEEGVVPQGFAYVQCALLYTNSNGE	623
CrSEC24A		760	RRIRVHTMAVPIVSELADMFATDAGAMITMMAKLSVEKYLSSRLDETRQSLHARLSGAL	819
ScSEC24		624	RRIRITITLAMPPTTESLAEVYASADQLAIASFYNSKAVEKALNSSLDARVLINKSVQDIL	683
CrSEC24A		820	KEFRIMNANAALRTPNKLIFPETYKYLPIWTLGLMKCAAFRGAKDVNADERIAVGHFLM	879
ScSEC24		684	ATYKKEIVVSNATAGGAPLRLCANLRMFPLLMHSLTKHMAFRSGIVPDS--HRASALNNLE	741
CrSEC24A		880	AGGVEAVARLAYPTAYALHDPSPGFWGMEQQ-----DGSVFPVPAAVPLSAAVLODGGVYL	933
ScSEC24		742	SLPLKYLIIKNIYPDVYSLHDMADAEAGLPVQTEDEATGTVLPQPINATSSLFERYGLYL	801
CrSEC24A		934	IDTGRVFLVWLGRAMSPQWCVVEFGTDPLS-LPQDTSAVTVEPGRDTEMSGRVITTLRAL	992
ScSEC24		802	IDTGNELFLWMMGSDAVPALVDFVGTQDIFDIPGKQELPVV--ENSEFNQRVNNIINQL	859
CrSEC24A		993	RAGRPL--HQQVFVVRQGSPLP-----HVLPLYVEDRSPSTQSYTDYVMS	1036
ScSEC24		860	RNHDDVITVYQSLYIVRGASLSEFPVNHASAREVATLRLNASTVLEKILNNESYREFLQI	919
CrSEC24A		1037	LHKAVLAK	1044
ScSEC24		920	MKARIS-K	926

Şekil 4.2. CrSEC24A ile ScSec24p protein sekansı hizalama sonucu

Her renk farklı domaini göstermektedir. **Yeşil:** Sec23/Sec24 ZincFinger; **Kırmızı:** Sec23 Alpha Beta Trunk Domain; **Mavi:** Beta Sandwich Domain; **Sarı:** Helical Domain; Gelsoline Repeat Domain; **Mor:** Gelsoline Repeat Domain; Ok ile işaretlenen *S. cerevisiae*'de Sec23p'e bağlanma bölgesi olan FLP aminoasitleri *C. reinhardtii* SEC24A proteininde FVP olarak belirlenmiştir

[illegible]

Şekil 4.3. CrSEC24A ile CrSEC24B protein sekansı hizalama sonucu

Her renk farklı domaini göstermektedir. **Yeşil:** Sec23/Sec24 Zinc Finger; **Kırmızı:** Sec23 Alpha Beta Trunk Domain; **Mavi:** Beta Sandwich Domain; **Sarı:** Helical Domain; Gelsoline Repeat Domain; **Mor:** Gelsoline Repeat Domain; Ok ile işaretlenen *S. cerevisiae*'de Sec23p'e bağlanma bölgesi olan FLP aminoasitleri *C. reinhardtii* SEC24A proteininde FVP olarak belirlenirken SEC24B proteininde FAP olarak belirlenmiştir

CrSEC24A	1	MYNQPGYGAPRPPFPQGGVPPAPGMLQGAPEGGGFPFGPMPLPFGMPFPFGPP-----	55
HsSEC24D	1	-MSQQGIYAT-PPYSQ-----PQPGIGLSPPHYG-HYGDPSTASPTGMMKAGPLGATAT	53
CrSEC24A	56	-GMAPPGMPPPP-APYGMPPPPGPPGMPPPPGPQGMPPPPGPPAMQPGCMFPFGHSMGGAQ	113
HsSEC24D	54	RGMLPFGPPPPGPPHGFQNGA-HATGHP-----PQRFBGPPFVNNVASSHAPYQPS---AQ	105
CrSEC24A	114	PPHPGQMGPDSGAP--RPPAPPPPGSFGGAPGMPQPGAPPFGPMGMPFP---GPPGMO	168
HsSEC24D	106	SSYPGPISTSSVTQLGSQLSAMQINSYSGMAPPSSQGGPLSATSLSLTTPRPPQPSILQ	165
CrSEC24A	169	PQARPPGMPPPP---GPPGMAPMGMPPPPGPPGMAPPPGPPGMAPPPGPPGMPGMPG	225
HsSEC24D	166	PGSQ--VLPPPTTLNGPGASFLPL-----PMYRPDGLSGP	199
CrSEC24A	226	PPAPAGFHAP-----GVPPPPGMPGPPPPQPGMVGMPPPM	260
HsSEC24D	200	PPNNAQYQPPPLPGQTLGAGVPPQQANSQPQAGQLSYGPGGFPQAGMAG---PPQ-	254
CrSEC24A	261	NAGYDPYSGORMMEQFESLTLAGAGPGQPEGVDPAFLPRPVGEAL-----	306
HsSEC24D	255	-----PQKLDPSIPSPIQVIENDRASRGQVYTAINT	287
CrSEC24A	307	-----RALTAHSPGDPANCSFDMNMTINAIPVSTALKARMLPLGVVVHMADEFY-G	359
HsSEC24D	298	RGQIPLVITDCMIGQGNASPRFIRCTTYCFCTSDMAKQAQIPLAAVIRKPFATIPSNE	347
CrSEC24A	360	RQVFWQLSSAGIIVECRPCRTYQIPFIQWTDAGRRFKCNVCAMLINEIPVEVFSSLDQNGR	419
HsSEC24D	348	SPLYLVNNGESGPFVACNCRKATMCPMTQPIEGGRRYQCGFCNCVNDVPPFTFQHLDHGR	407
CrSEC24A	420	RRDADERPELSQGTVEVVPADVMV--RPEMPVYFFCIVSYAAVASGAVATTAARAKA	477
HsSEC24D	408	RLDHYEKPELSGSEYVATLDYCRKSKPPNPPAFIFMIDVSYSNIRKNGLVKLICEELRT	467
CrSEC24A	478	CLDQLPGDER-----TLWGFLTFDSSSLHFYNLKASLTQPGMLVVTLEDDEP---DDLLV	532
HsSEC24D	468	NLEKIPKEEQEETSARVGFITYNKVLHFFNVKSNLAQPGQAVVDVGEVFPFLDGFIV	527
CrSEC24A	533	NLRESRQVVEALLDALPNFAGTSVSVESAMGPALQAAM--VSSHIGGKLLLFQSSVPSL	590
HsSEC24D	528	NYQESQSVIHNLDDQIPDMFADSNENETVFAPVIQAGMEALKAADCCKLFTFSSSLPTA	587
CrSEC24A	591	-GVGRVKNRENENSAVGTETREPLENPDPPFYKRYAAECRSVQITVDVFAMAMQVTDLASL	649
HsSEC24D	588	EAPGKLNRDDKLVNTDKEKILFQPGQTNVYDSLAKDCVAHGCSVTLFLFSPQYVDVASL	647
CrSEC24A	650	AAIPRYTQEGELYVYPGFMAARDGKLTAEITHNLTRPTAWEAVMVRVCSKGLRISAFHCH	709
HsSEC24D	648	GLVPQLTGGTLYKYNMFQMLDRQQFLNLRNDIEKKIGFDALMRVRSITGFRADIFGG	707
CrSEC24A	710	FFNRSTDLLALPTCDPKAFAMEIAHEEGVWQPGFAYVQCALLYTNSNGERRIRVHTMAV	769
HsSEC24D	708	ILMNNTTIVEMAAIDCDKAVTVEFKHDDKLSDDSGALITQCAVLYTTISGQRRIRIRNLSL	767
CrSEC24A	770	ETVSELADMFAATDAGAMTITMAKLSVEKYLSSRLDETRQSLHARLSGALKEFRIMNANA	829
HsSEC24D	768	NCSSQLADLYKSCETDALINFFAKSAFKAVLHQPLKVIREILVNQTAHMLACRYKN--CA	825
CrSEC24A	830	ALRTPNKLIFFETTYKYLPIWTLGLMKCAAFRGGAKDVNADERIAGVHFLMAGGVEAVARL	889
HsSEC24D	826	SPSAASQLILPDSMKVLPVYMNCLLNKCVLLS-RPEISTDERAYQRQLVMTMGVADSOLF	884
CrSEC24A	890	AYPTAYALHDPSPGFWGMEQQDGSVFPAAVFLSAAVLDGGVYLIDTGRVFLWLGRAMS	949
HsSEC24D	885	FYPQLLPITILD-----VKSTMLPAAVRCSESLSEEGLFLANGLRMLFLWLGVSSE	936
CrSEC24A	950	PCNCEVEFGTDPLSLRQDTSVAVTVERGRDTEMGRVITLLRALRAGRPLHQQVFWVRQGS	1009
HsSEC24D	937	PBLIQSIFNVPSFAHIL--NTDMITLLPEVGNFYSQQLRMIMGIQQRKPYSMKLTITVKQRE	994
CrSEC24A	1010	PLEPHVLPVLVEDRSP-STQSYTDMVMSLHKAVLAK--	1044
HsSEC24D	995	QPMVFRQFLVEDKGLYGGSSYVDFLOCVHKEICQLLN	1032

Şekil 4.4. CrSEC24A ile HsSec24D protein sekansı hizalama sonucu

Her renk farklı domaini göstermektedir; **Yeşil**: Sec23/Sec24 ZincFinger; **Kırmızı**: Sec23 Alpha Beta Trunk Domain; **Mavi**: Sec23/Sec24 Beta Sandwich Domain; **Sarı**: Sec23/Sec24 Helical Domain; **Mor**: Gelsoline Repeat Domain; Ok ile işaretlenen *S. cerevisiae*'de Sec23p'e bağlanma bölgesi olan FLP aminoasitleri *H. sapiens* Sec24D proteininde FVP olarak belirlenmiştir

4.1.2. Protein domain analizi

Diğer organizmalardaki Sec24 proteinleri ve CrSEC24A proteininin domain yapısı Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı organizmalara ait SEC24 ortologlarının domain analizi

ZF: Sec23/Sec24 Zinc Finger Domain; **Sec23_trunk:** Sec23/Sec24 Alpha Beta Trunk Domain; **BS:** Sec23/Sec24 Beta Sandwich Domain; **H:** Sec23/Sec24 Helical Domain; **GR:** Sec23/Sec24 Gelsoline Repeat Domain (PFAM); **Cr:** *Chlamydomonas reinhardtii*; **Vc:** *Volvox carteri*; **At:** *Arabidopsis thaliana*; **Mm:** *Mus musculus*; **Hs:** *Homo sapiens*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*

Protein	Domain Yapısı	Aminoasit sayısı
CrSEC24A		1044
CrSEC24B		1071
ScSec24p		926
Lst1p		929
Iss1p		876
AtSec24A		1038
Atsec24B		1096
AtSec24C		1080
HsSec24A		1093
HsSec24B		1298
HsSec24C		1094
HsSec24D		1032
MmSec24A		1090
MmSec24B		1251
MmSec24C		1096
MmSec24D		1032
VcSEC24		1024

Diğer bir deyişle protein alanı, protein zincirinin geri kalanından bağımsız gelişebilen ve fonksiyonel olabilen, protein tersiyer yapısının korunmuş bir parçasıdır. Bir domain farklı proteinlerin yapısında görülebilir. Çoğu protein birkaç yapısal

domainden oluşur. Domainler genellikle işlevsel birimleri oluşturur. CrSEC24A proteininde PFAM veri tabanına göre 5 domain yapısı olduğu tahmin edilmektedir. Bunlar sırasıyla; Sec23/Sec24 Zinc Finger Domaini, Sec23/Sec24 Alpha Beta Trunk Domaini, Sec23/Sec24 Beta Sandwich Domaini, Sec23/Sec24 Helical Domaini, Sec23/Sec24 Gelsoline Repeat Domaini'dir.

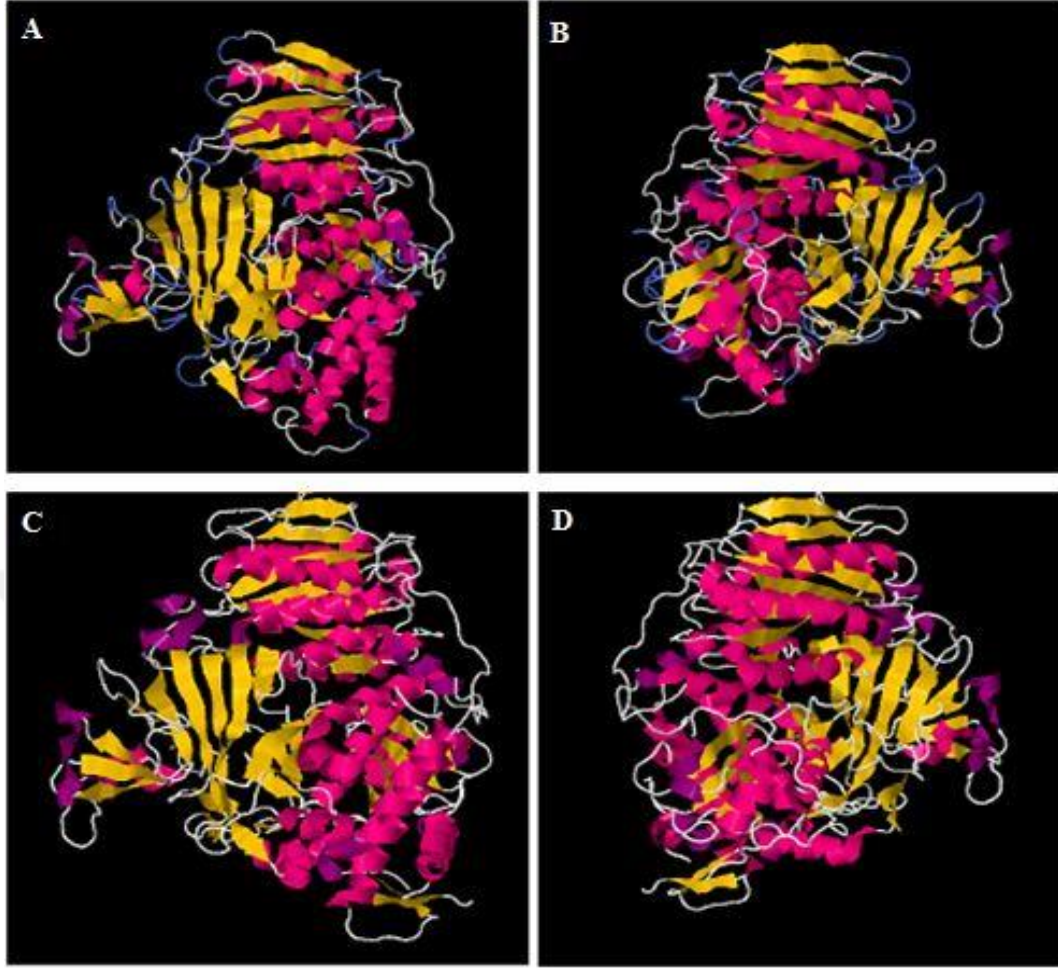
4.1.3. Protein 3D yapı konformasyonu ve F-X-P motifinin 3D yapıda belirlenmesi

Oluşturulan *C. reinhardtii* SEC24A proteininin 3D görüntüleri homoloji görüntüleridir. Phyre2 programının oluşturduğu pdb dosyası First Glance programında görüntülendiğinde elde edilen sekonder yapı bilgisi, toplam heliks yapısını %31,6 (%27,7 α -heliks, %3,9 3_{10} heliks, %0 π -heliks) olarak belirlemiştir. Ayrıca %19,4 β -strand, %12,8 Turns (dönüş) yapısı ve %36,2 Coil yapısı belirlenmiştir. Belirlenen sekonder yapıların 3D görüntüsü Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5. CrSEC24A proteininin sekonder yapısına göre renklendirilmiş 3D görüntüsü
Pembe: α -Heliks; **Mor:** 3_{10} heliks; **Sarı:** β -strand; **Mavi:** Turns; **Beyaz:** Coil yapısını gösterir (FirstGlance)

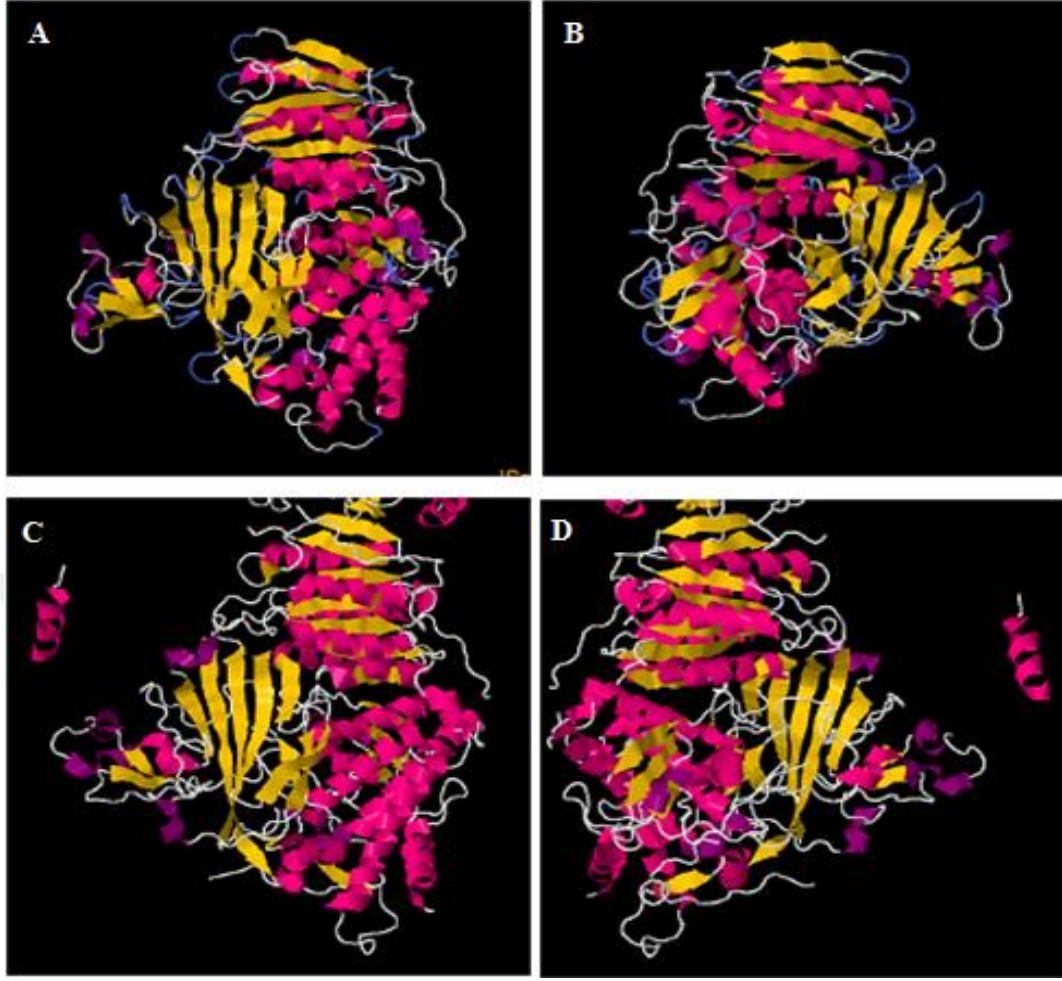
Phyre2 programı oluşturduğu görüntüyü %100 güven derecesi belirterek ve HsSec24D proteinini baz alarak yapılandırmıştır. Konformasyonda kullanılan HsSec24D proteininin pdb numarası 3eg9'dur. Bu proteinin kristal yapısında B zincirini model almış olup, Chain B olarak belirtmektedir. HsSec24D ve CrSEC24A proteinlerinin görüntüleri Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. CrSEC24A ve HsSec24D proteinlerinin 3D konformasyonunun karşılaştırması

A: CrSEC24A proteininin önden görünüşü; **B:** CrSEC24A proteininin (180°) arkadan görünüşü; **C:** HsSec24D proteininin önden görünüşü; **D:** HsSec24D proteininin (180°) arkadan görünüşü; **Pembe, Mor;** α -Heliks **Sarı;** β -strand; **Beyaz;** Coil yapısını gösterir (Phyre2)

Şekil 4.6'ya göre HsSec24D ile CrSEC24A proteinleri arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. ScSec24p ile CrSEC24A modellemesinin karşılaştırılmasında da büyük farklılıklar görülmemiştir (Şekil 4.7) .

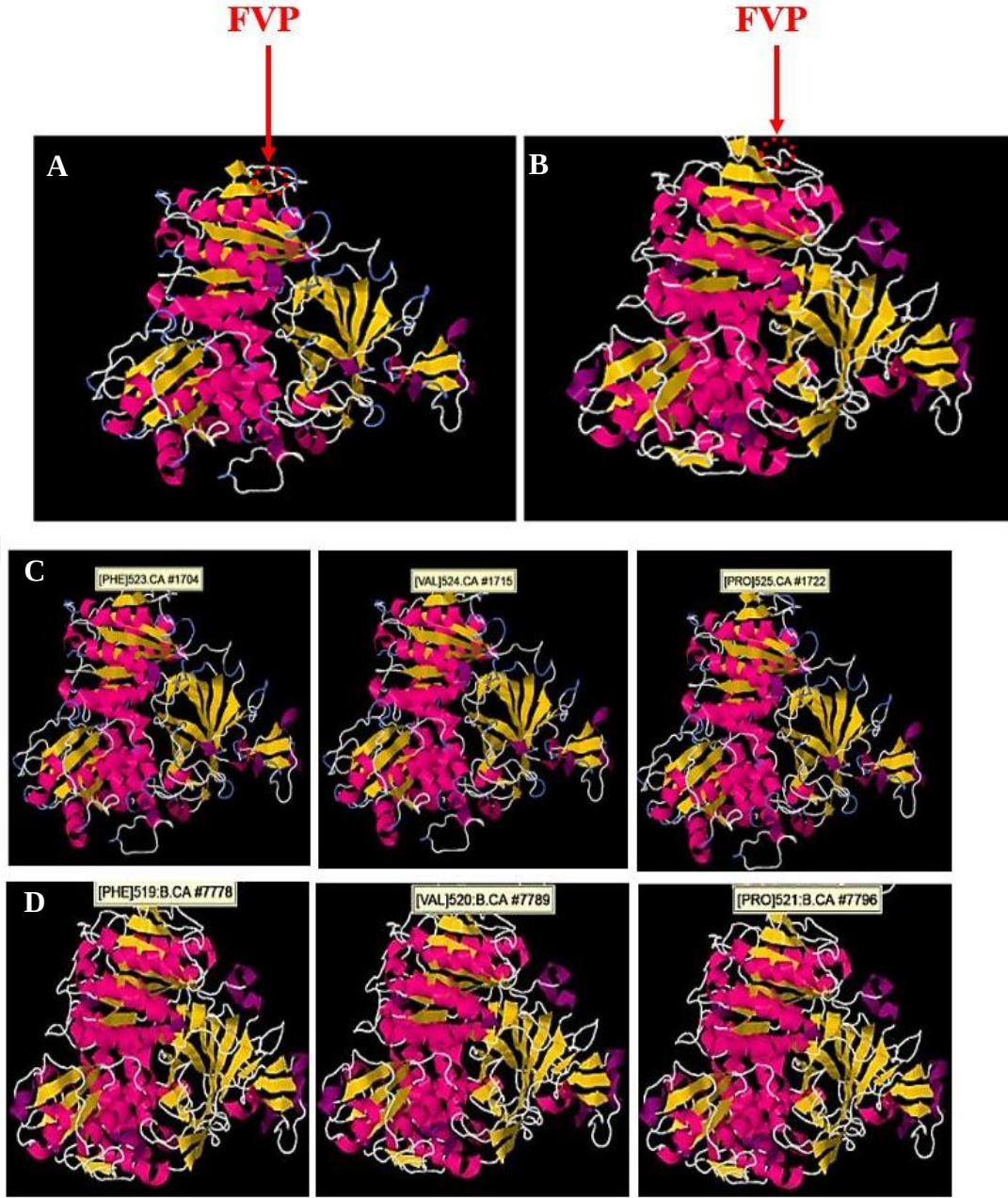


Şekil 4.7. CrSEC24A ve ScSec24p proteinlerinin 3D konformasyonunun karşılaştırması

A: CrSEC24A proteininin önden görünüşü; **B:** CrSEC24A proteininin (180°) arkadan görünüşü; **C:** ScSec24p önden görünüşü; **D:** ScSec24p (180°) arkadan görünüşü
Pembe, Mor; α -Heliks **Sarı;** β -strand; **Beyaz;** Coil yapısını gösterir (Phyre2)

Sonuç olarak CrSEC24A proteininin predikte edilen sekonder yapısı coil yapılar göz önüne alınmadan incelendiğinde en fazla heliks yapısının görüldüğü ve bunu β strand yapısının takip ettiği açıktır. Ayrıca Şekil 4.6 ya da Şekil 4.7’de görüldüğü üzere, β strand yapıları ard arda gelerek β - sheet yapılarını oluşturmaktadır.

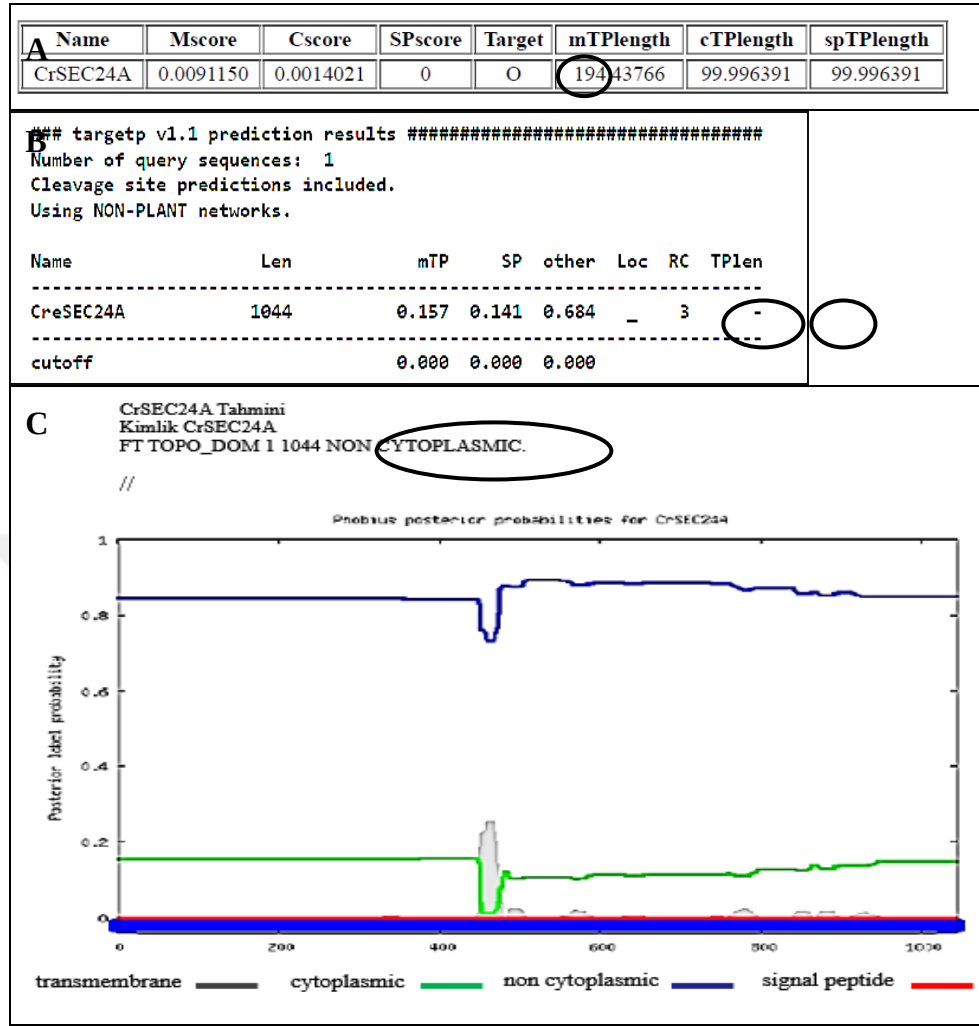
Sekonder yapıların oluşturduğu 3D görüntüsü üzerinde, *S.cerevisiae* kristal yapısının çözümlenmesiyle gösterilmiş olan F-X-P motifi analizi yapılan crsec24a proteininde ve HsSec24D proteini üzerinde Şekil 4.8’de gösterilmiştir. F-X-P motifi *S. cerevisiae*’de FLP aminoasitleri olarak görülmektedir. Bu aminoasitler Sec24p üzerinde bulunmaktadır ve Sec23p üzerindeki VFR aminoasitlerine bağlanmaktadır.



Şekil 4.8. CrSEC24A proteini tahmini konformasyon 3D görüntüsü ve kristal yapısı çözümlenmiş HsSec24D protein 3D görüntüsü üzerinde F-X-P motifinin belirlenmesi
A-C: CrSEC24A proteini üzerinde FVP olarak belirlenen F-X-P motifi; **B-D:** HsSec24D (pdb: 3eg9b) proteini üzerinde FVP olarak belirlenen F-X-P motifi

4.1.4. Protein lokalizasyon analizi

Protein lokalizasyonunu tahmin etmek için kullanılan Predalgo, TargetP 1.1, Phobius veritabanlarının analiz sonuçları Şekil 4.9’de verilmiştir. Verilen sonuçlara göre protein sekansının stabil bir lokalizasyonu belirlenememiş olup gerçekten bir taşıma proteini olması muhtemeldir.



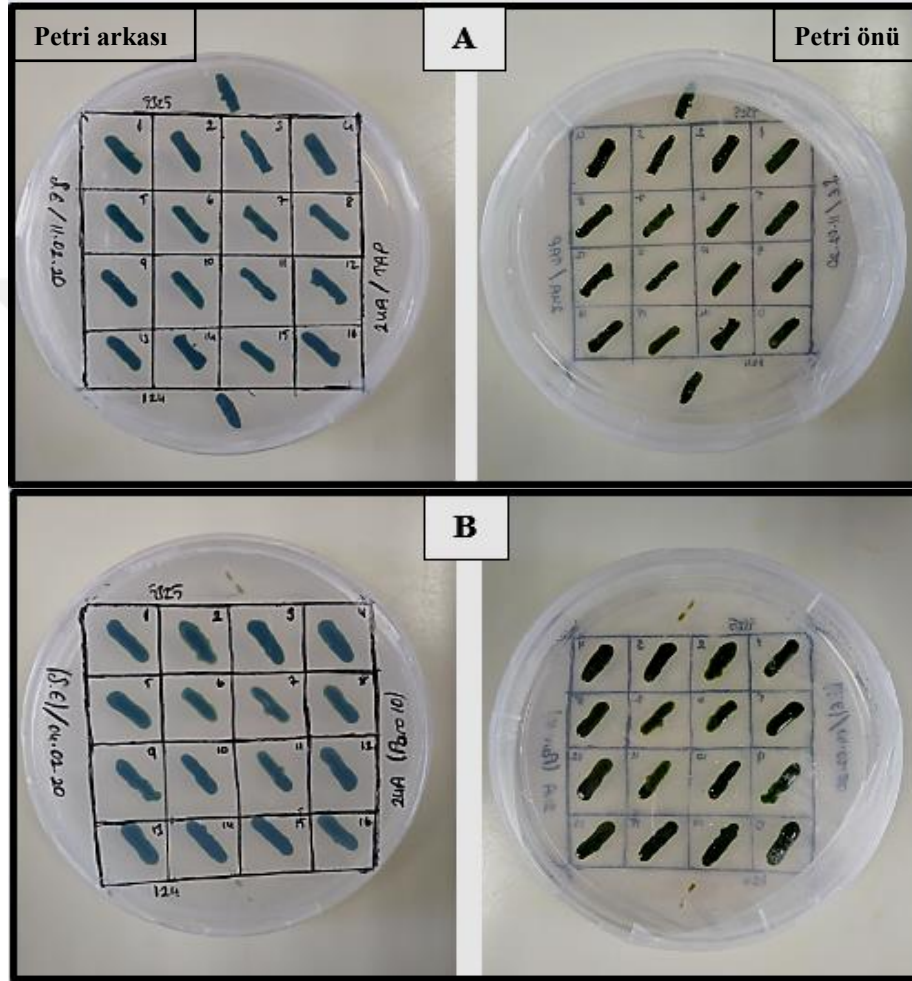
Şekil 4.9. CrSEC24A protein lokalizasyon tahmini

A: Predalgo programı analiz sonucu ‘O’ yani ‘diğer’ sınıfındadır. Mitokondrion (M), kloroplast (C) ve salgı yolu (SP) (sırasıyla Cscore, Mscore ve SPscore) olmak üzere üç grupta analiz yapar. Üç skor belirli bir sınırın altında olduğunda protein "diğer" (O) kategorisine, aksi takdirde en yüksek puana (hedef sütun) sahip bölmeye atanır. Bu sınırlar mitokondrion için 0.42, kloroplast için 0.41 ve sekretuar yolak için 0.14 olarak verilmektedir. Her bölme için, taşıma peptid (TP) dizisinin uzunluğu da tahmin edilir (mitokondrion, kloroplast ve sekretuar yolak için uzunluk sırasıyla mTPlength, cTPlength, and spTPlength olarak verilmiştir) ; **B:** TargetP 1.1 program sonucuna göre protein sekansı ‘diğer’ sınıfındadır. Program en yüksek puanın bulunduğu kategoriye göre sınıflandırmaktadır; **C:** Phobius programına göre protein sekansı stoplazmik olmayan gruptadır

4.2. DeneySEL Bulgular

4.2.1. Paromomisin direnci

CC-5325 ve CC-125 suşları ile birlikte 16 adet farklı klonun katı TAP besiyerinde büyüme ve gelişmelerinde herhangi bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.10-A).



Şekil 4.10. Paromomisin direnci testi

A: TAP besiyeri; **B:** Paromomisin direnci testi; 5325 ve 124 yabancı tip suşlardır.

1-16 numaraları verilen hücrelerin her biri *sec24a* mutantının farklı klonlarıdır ve hücre ekiminden 1 hafta sonra fotoğraf çekimi yapılmıştır. Petriler soldan sağa 1’den 16’ya kadar numaralandırılmıştır

Paromomisin direnci testinde bir haftanın sonunda mutant klonların tamamı hayatta kalırken yabancıllardan 124 ve mutantların ebeveyni olan 5325 ölmüştür (Şekil 4.10-B). Mutantların hayatta kalması insersiyon kasetinin mutant genomuna yerleşmiş olduğunu göstermektedir. İnsersiyon kasetinin tamamından ziyade sadece antibiyotik direnç genlerinin genoma yerleşmiş olma ihtimali göz edilmemelidir. Bu yüzden elimizdeki bu bulgudan mutantların insersiyon kasetinin tamamını içerdiği sonucuna

varılamamaktadır. Sonuç olarak 16 klonun tamamının paromomisin direnci göstermesinden dolayı mutant olduğu sonucuna varılmıştır.

4.2.2. Arilsülfataz ve alkali fosfataz aktivitesi

ARS (Arilsülfataz) veya ALP (Alkali fosfataz) enzimlerinin hücre dışına salgılanabilmesi için sekretuar (salgı) yolağından geçmesi gerekmektedir. *C. reinhardtii*'de bunların taşınmasında hangi gen ya da proteinlerin işlevsel ya da esansiyel olduğu bilinmemektedir. Bu aktivite testinde, *C. reinhardtii*'deki *SEC24A* geninde bulunan insersiyonun ARS ve ALP enzimlerini taşımada etkisinin olup olmadığı ve varsa hangi yönde olabileceği konusunda yönlendirici olması amaçlanmıştır. ARS sülfat grubu ile aromatik halka yapısı arasındaki bağı, genel bileşiklerle hidrolize edebilen bir enzimdir. ALP ise çeşitli moleküllerden fosfat gruplarının koparılmasını sağlamaktadır. Adından da anlaşılacağı gibi alkali fosfataz, en etkili alkali ortamlarda defosforilasyon işlemini göstermektedir. Enzimler aktivitelerini gerçekleştirdiklerinde mavi renk oluşturmaktadır.

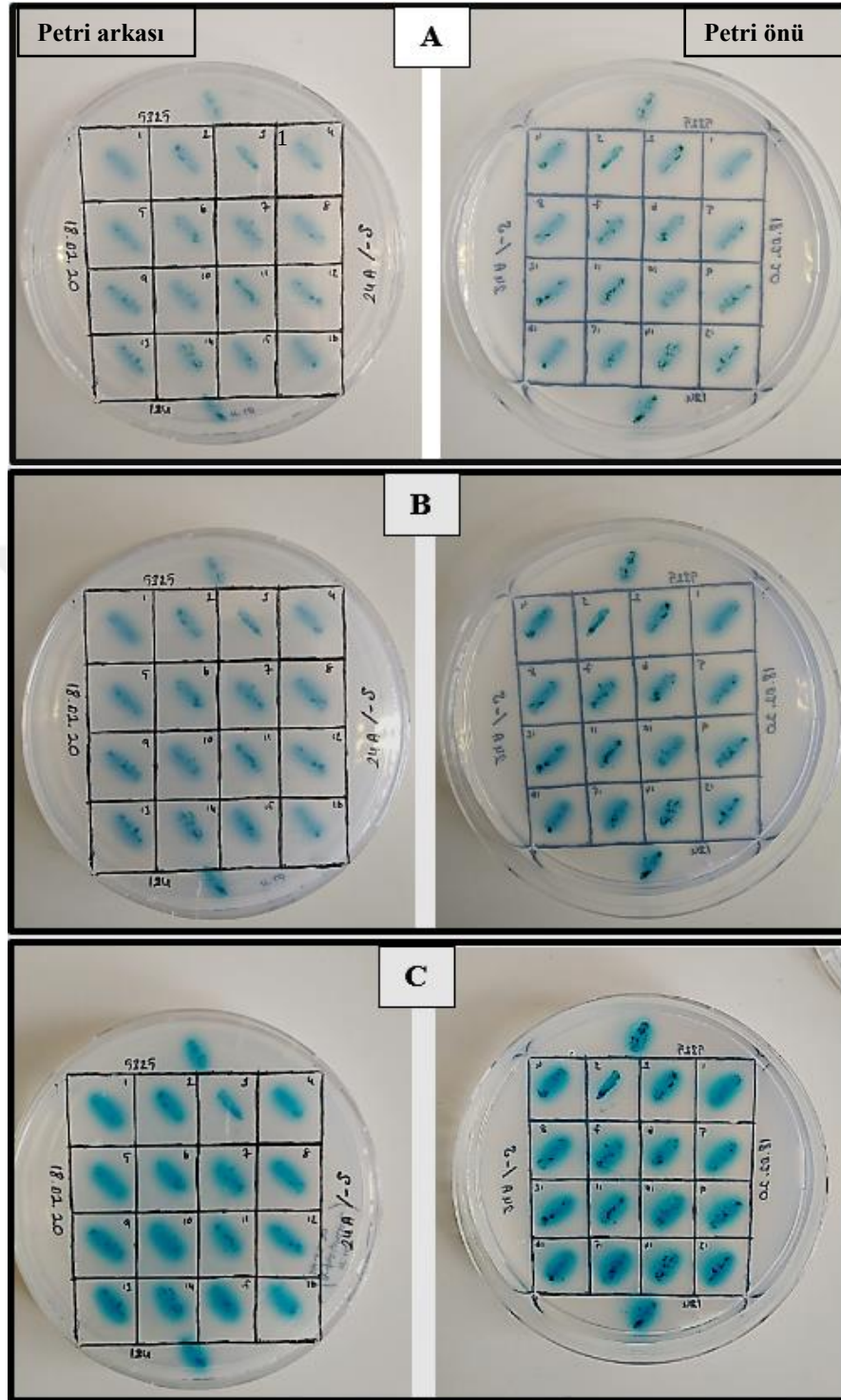
Şekil 4.11'de ARS aktivitesi gösterilmiştir. ARS aktivitesinde yabanıl ve mutant klonları arasında herhangi bir aktivite farklılığı görülmemiştir. Yine Şekil 4.11'de görüldüğü gibi 30 dakika, 1 saat ve 24 saat içinde görülen ARS aktiviteleri farklıdır. En az 30 dakikada, daha sonra 1 saatte en fazla ise 24 saat sonra aktivite gözlenmiştir.

Şekil 4.12'de görüldüğü üzere, ARS aktivitesinde de olduğu gibi zamanla artan bir ALP aktivitesi vardır. Fakat CC-5325 ebeveyn suşu ve 3 numaralı klon üç zamanlı ölçümde de en fazla ALP aktivitesi gösteren klon olarak gözlemlenmiştir. 3 numara haricinde diğer mutant klonlarında ebeveyn olan CC-5325 suşundan daha az aktivite görülmesi mutasyonun ALP enziminin dışarıya salgılanmasında azalmaya neden olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.10' görülen klon 3'ün paromomisine direnci ve yapılan PCR analizi insersiyon kasetine sahip olduğunu doğrulamaktadır. Bu durumda; 3 numaralı *sec24a* klonundaki ALP enzim aktivitesinde, ebeveyne kıyasla herhangi bir azalma görülmemesinin sebebi klonun süpresör mutasyona uğrama ihtimali ile açıklanabilir. Bu klon ilerideki çalışmalarımızda daha detaylı çalışılacaktır.

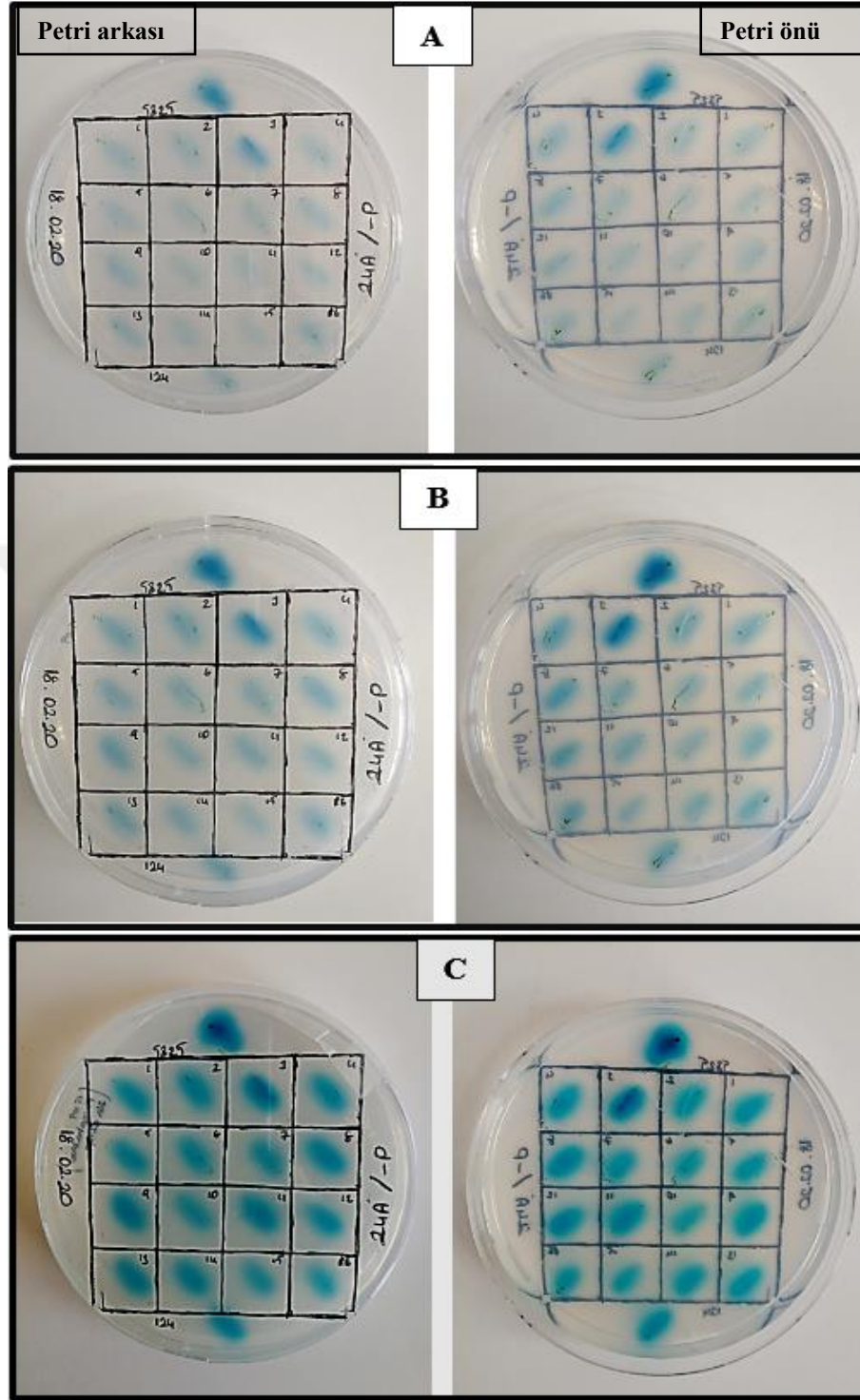
Sonuç olarak elimizdeki bulgulara göre; *sec24a* klonlarının sahip olduğu mutasyonun, hücre dışına salgılanması için sekretuar yoldan geçmesi gereken ALP enziminin taşınmasında azaltıcı yönde etkili olabileceği kanısına varılmıştır. Bu sonuca şekil 4.12'de ALP testinde CC-5325 ebeveyn suşundaki aktivitenin fazla olması ve mutant klonlarının (3 numaralı klon hariç) aktivitedeki azalmasının bariz olarak görülmesi ile varılmıştır. Mutasyon ARS aktivitesini etkilememiştir.

Enzim aktivite testi 2 defa tekrarlanmış olup benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır.



Şekil 4.11. Arilsülfataz aktivite testi

A: Sülfat uygulamasından 30 dakika sonra; **B:** Sülfat uygulamasından 1 saat sonra; **C:** Sülfat uygulamasından 24 saat sonra; 5325 ve 124 yabancı tip suşlardır. 1-16 numaraları verilen hücrelerin her biri *sec24a* mutantının farklı klonlarıdır ve petrilere soldan sağa 1'den 16'ya kadar numaralandırılmıştır

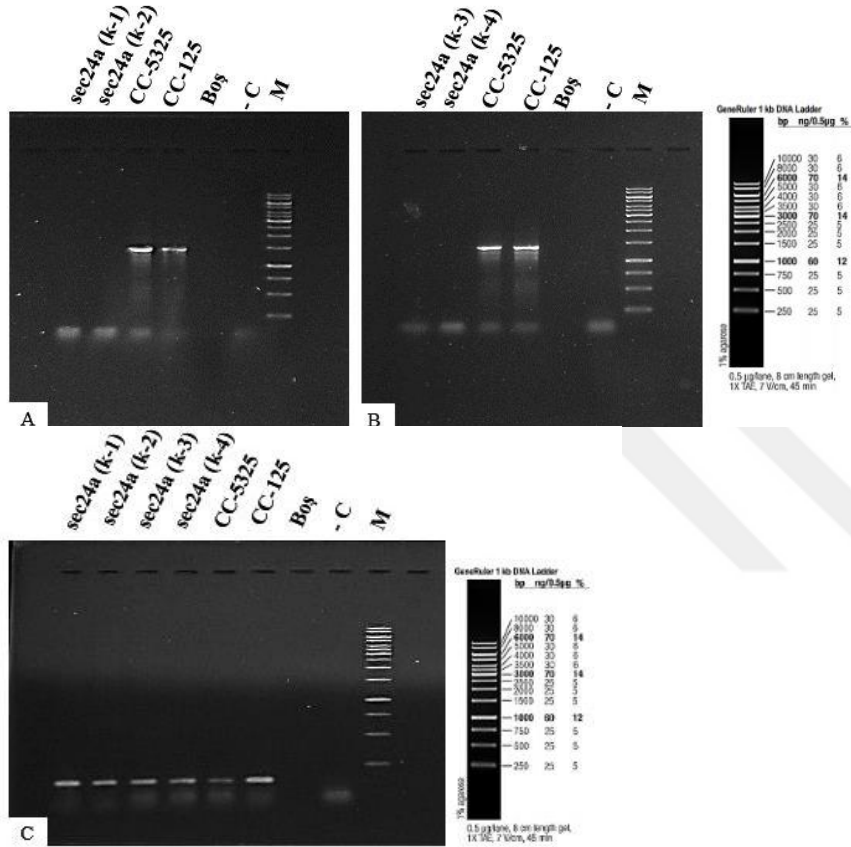


Şekil 4.12. Alkalen fosfataz aktivite testi

A: Alkalen fosfataz uygulamasından 30 dakika sonra; **B:** Alkalen fosfataz uygulamasından 1 saat sonra; **C:** Alkalen fosfataz uygulamasından 24 saat sonra; 5325 ve 124 yabancı tip suşlardır. 1-16 numaraları verilen hücrelerin her biri *sec24a* mutantının farklı klonlarıdır ve petriler soldan sağa 1'den 16'ya kadar numaralandırılmıştır

4.2.3. Klonlarda insersiyon bölgesinin PCR analizi

PCR ürünü beklendiği gibi ebeveyn CC-5325 ve yabancı suş CC-125'te ≈ 1414 bp olarak elde edilmiştir (Şekil 4.13). Mutant klonlarında yapılan analizde ürün elde edilmemesi, klonlardaki *SEC24A* geninin 3'UTR bölgesinde insersiyon kasetine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.13-A). Bunun aksine kontrol PCR analizinde her dört mutant klonun (k-1, k-2, k-3, k-4) ve yabancı suş CC-125 ile ebeveyn CC-5325 suşunun ürün vermesi, analizde bulunan klonlardaki *SEC24A* geninin 3'UTR bölgesinde insersiyon kasetine sahip olduğunu doğrulamaktadır. Şekil 4.13-A,B,C aynı anda izole edilen genomik DNA ile yapılan PCR analiz sonuçlarını göstermektedir.



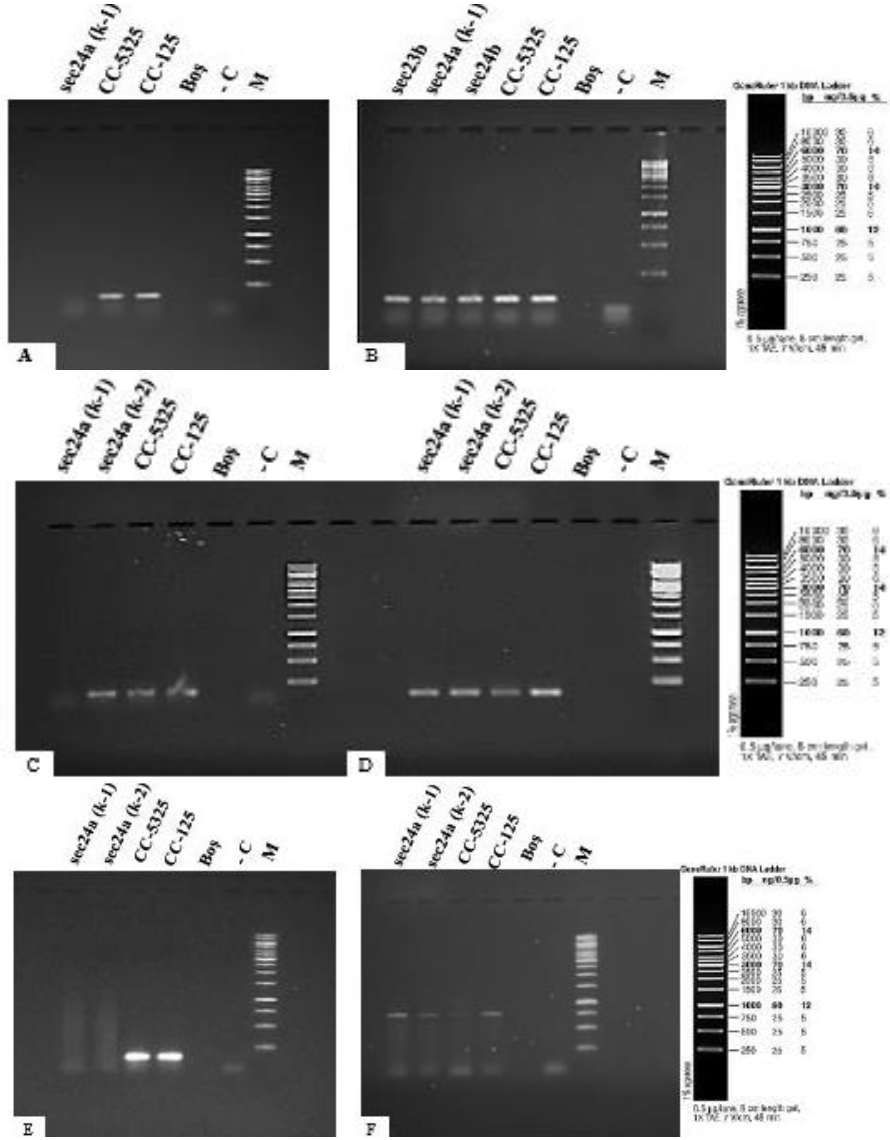
Şekil 4.13. *sec24a* mutantında insersiyonun belirlenmesi için yapılan PCR analizi sonucu

A,B: 1414 bp, *sec24a* klonlarının insersiyon bölgesini kapsayan SP1-Int20-24A ve SP2-Up-24A-R primerleri ile yapılan PCR analiz sonuçları; **C:** 152 bp, qSEC24B3utr-F ve qSEC24B3utr-R primerleri ile yapılan kontrol PCR analizi; ***sec24a* (k-1):** *C. reinhardtii sec24a* mutanlığı klon 1; ***sec24a* (k-2):** *C. reinhardtii sec24a* mutanlığı klon 2; ***sec24a* (k-3):** *C. reinhardtii sec24a* mutanlığı klon 3; ***sec24a* (k-4):** *C. reinhardtii sec24a* mutanlığı klon 4; **CC-5325:** ebeveyn suş; **CC-125:** yabancı suş; **-C:** Negatif kontrol; **M:** DNA Ladder

sec24a(k-1) ve *sec24a(k-2)* klonları için PCR analizi iki defa tekrarlanmış olup benzer sonuçlar elde edilmiştir.

4.2.4. Klonların RT-PCR analizi

İnserisyonun meydana getirdiği mutasyonun, *sec24a* hücrelerinde ekspresyonunun varlığını etkileyip etkilemediğini belirlemek amacıyla RT-PCR analizi yapılmıştır. Elde edilen bulgu Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.14. RT-PCR analizi sonucu

A,C,E: 153 bp, *sec24a* mutantına özel inserisyon bölgesini kapsayan qSEC24A3utr-F ve qSEC24A3utr-R primerleri ile yapılan RT-PCR, 153 bp; **B:** 105 bp, qCBLP-F1/qCBLP-R1 primerleri ile yapılan kontrol RT-PCR; **D:** 195 bp, qCBLP-F2/qCBLP-R2 primerleri ile yapılan tekerrür kontrol RT-PCR; **F:** 769 bp, 23A-E10-F/23A-3utr-R primerleri ile yapılan kontrol RT-PCR; ***sec24a(k-1)*:** *C. reinhardtii sec24a* klon 1; ***sec24a(k-2)*:** *C. reinhardtii sec24a* klon 2; **CC-5325:** ebeveyn suş; **CC-125:** yabancı suş; **-C:** Negatif kontrol; **M:** DNA Ladder; E ve F biyolojik tekrar yani farklı RNA

izolasyonu ile elde edilen sonuçtur. **sec23a ve sec24b**: farklı gen bölgelerinde insersiyon bulunan başka mutantlardır

Kontrol için qCBLP-F1 ve qCBLP-R1, qCBLP-F2/qCBLP-R2 ve 23A-E10-F/23A-3utr-R primeriyle uygulanan RT-PCR sonucunda CC-125 ile CC-5325 yabancı suşları ve *sec24a* klonları için ekspresyonun varlığı Şekil 4.14'de görülmektedir. Fakat SEC24A geninin ekspresyonunu belirlemek için tasarlanan primerlerle yapılan RT-PCR analizinde *sec24a(k-1)* klonunda ekspresyonun olmadığı açıkça görülmektedir.

sec24a(k-2) klonunda Şekil 4.14-C'de ekspresyon görülmesinin nedeni kontaminasyon olarak tahmin edilmektedir. Bu yüzden tekrardan RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak RT-PCR biyolojik olarak tekrarlanmıştır. Tekrar sonucunda ise ekspresyon görülmemiştir (Şekil 4.14-E). Bu durum deneyi herhangi bir şüpheye düşürmemiş olup, deneylerin tamamı (çaprazlama vb.) *sec24a(k-1)* klonu üzerinden yapılmıştır. *sec24a(k-1)* klonu için ilk biyolojik tekrardan iki tekerrür (Şekil 4.14-A,C), ikinci biyolojik tekrardan da bir kez (Şekil 4.14-E) olmak üzere toplamda üç RT-PCR analizi yapılmıştır. Bütün sonuçlarda ise elde edilen bulgu aynıdır ve hiçbirinde ekspresyon gözlemlenmemiştir.

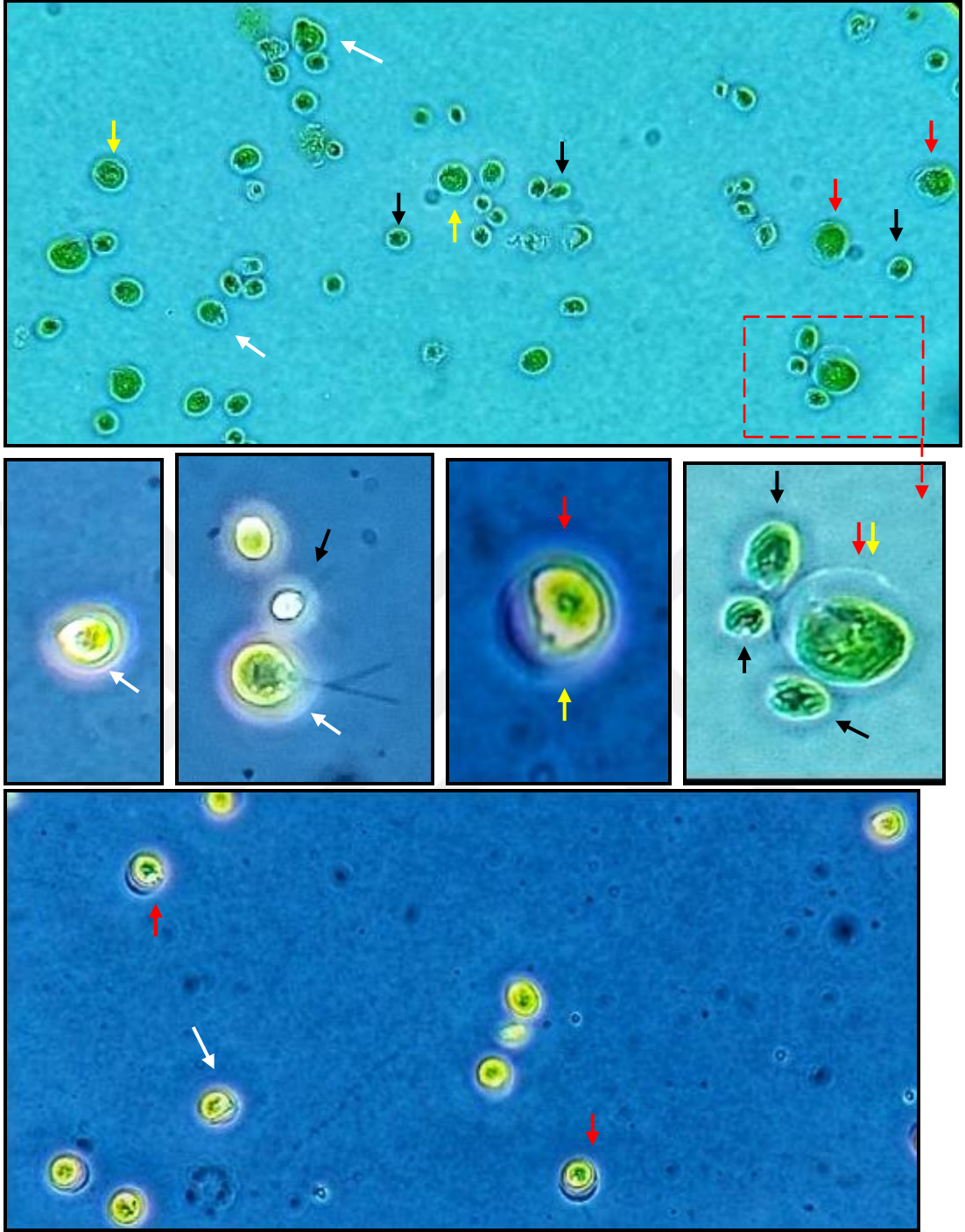
4.2.5. *sec24a* mutantının hücre yapısı ve anormallikleri

Hücrelerin incelenmesinde *sec24a(k-1)* hücreleri kullanılmıştır. Mikroskop altında incelenen hücrelerde bazı anormallikler fark edilmiştir. Hücrelerin boyutlarının heterojen olmasının yanında genellikle tam yuvarlak ve büyük bir yapıya sahip olması bu anormalliklerden birisidir. Bazı büyük hücrelerin etrafında şeffaf balon benzeri bir yapı bulunmaktadır (Şekil 4.15- kırmızı ok ile işaretlenmiştir). Bunun normalden daha kalın bir çeper veya glikoprotein tabakası olduğu düşünülmektedir.

Küçük olan hücrelerde böyle bir yapı gözlemlenmemiştir. Bahsi geçen boyutları farklı küçük hücreler ve büyük hücreler Şekil 4.15-A ve yakınlaştırılmış bir kesiti olan Şekil 4.15-C,D'deki mikroskop görüntüsünde açıkça görülmektedir. Kategorize edecek olursak üç hücre tipi gözlemlenmiştir. Bunlar; küçük hücreler, büyük hücreler, büyük ve etrafında balon benzeri yapı bulunan hücrelerdir. Bunların yanında üçgenimsi ve şekil olarak bozuk olan hücreler de gözlemlenmiştir.

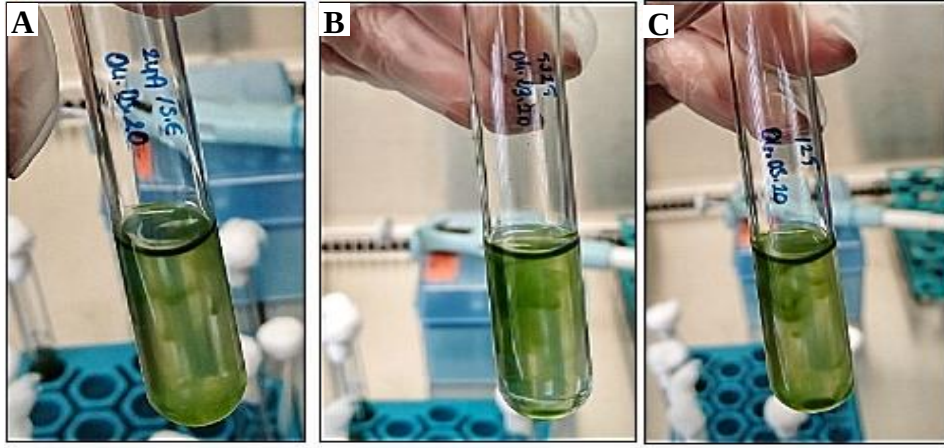
C. reinhardtii'nin generatif üremesinde flagella hareket aktivitesinin işlevi büyük olduğundan dolayı *sec24a* hücrelerindeki şekil anormalliklerinin dışında hareket kabiliyeti de incelenmiştir. Şekil 4.16'de görüldüğü gibi hücreler azotsuz sıvı TAP besiyerinde bekletilmiştir. Tüpler sarsılmadan çökme olup olmadığı incelenmiştir.

Mutantın ebeveyn yabancı suşu 5325 ve çaprazlamalarda kullanılan karşı çiftleşme türüne ait olan CC-125 yabancı suşu da incelenmiştir. Şekil 4.16-B'de CC-5325 hücreleri yoğun olarak deney tüpünün üst ve orta alanlarında asılı görülürken, *sec24a*'da genel olarak tüpün tamamında asılı hücreler görülmüştür (Şekil 4.16-A) . Fakat az da olsa tüpün üstünde bulunan hücreler daha fazladır. Bu durum mutasyonun *sec24a* hücrelerinde azotsuz ortamda flagellaların yüzmesindeki aktiviteyi etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 4.15. *sec24a(k-1)* hücre yapı ve anormalliklerini gösteren farklı alanlardan alınmış mikroskop görüntüleri

Her anormallik farklı renk ok ile gösterilmiştir. **Kırmızı:** etrafında balon benzeri yapı bulunan büyük hücreler; **Sarı:** büyük olan hücreler; **Beyaz:** Şekil olarak anormal ya da üçgenimsi hücreler; **Siyah:** küçük hücreler



Şekil:4.16. Hücrelerin flagella hareket aktifliği

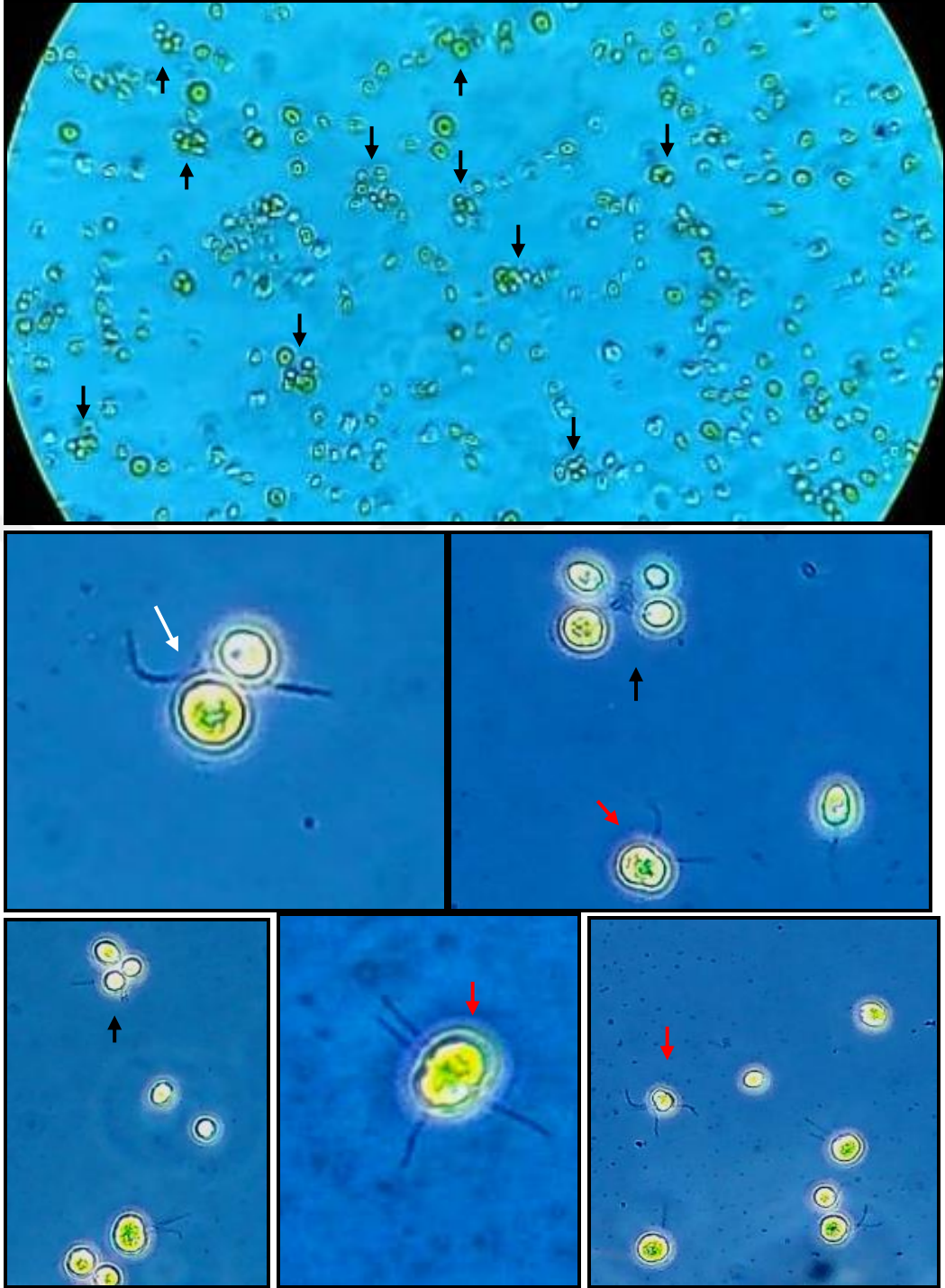
A: *sec24a(k-1)* hücreleri 13 saat sonra; **B:** CC-5325 hücreleri 13 saat sonra; **C:** CC-125 hücreleri 13 saat sonra; Azotsuz SEM-N besiyeri kullanılmıştır

4.2.6. *sec24a* mutantının çaprazlama ve zigotik yeteneklerinin incelenmesi

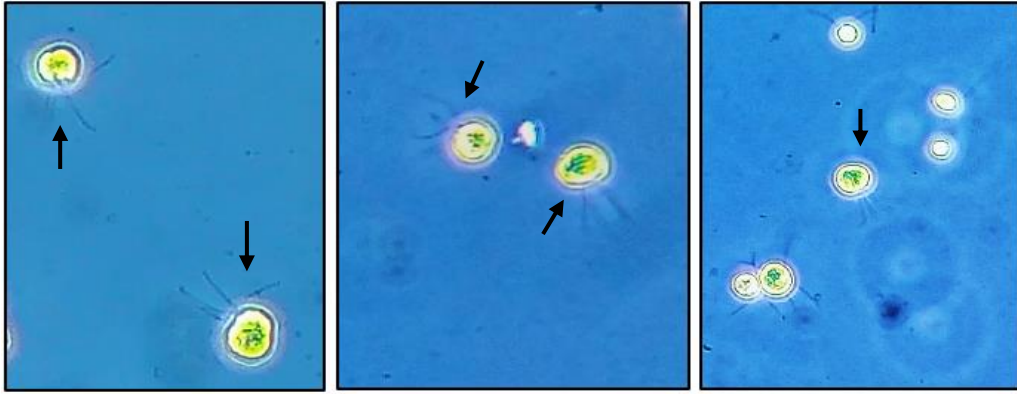
Mutanta ait generatif üreme aşamalarından bazılarını gösteren mikroskop görüntülerinin kesitleri Şekil 4.17’de verilmiştir. Şekil 4.17-A Şekil 4.17-C ve Şekil 4.17-D üzerinde siyah ok ile işaretlenen hücrelerde de görüldüğü üzere aglütinasyonda herhangi bir aksaklık saptanmamıştır. Fakat aglütinasyonu oluşturan grupların küçük olması dikkat çekmiştir. Şekil 4.17-A’da görülen aglütinasyon gruplarının kesinlikle hücre kümesi ya da birbirine yapışan bir grup hücre olmadığı mikroskop görüntüsündeki toplu halde olan hücrelerin titreşiminden ve flagellar etkileşimlerinin görülmesinden anlaşılmaktadır. Aglütinasyon sırasında hücrelerin çift oluşturmada önce birbirlerini tanımlamak için uyguladıkları aglütinasyondaki flagellar etkileşim Şekil 4.17-C’de çok net şekilde görülmektedir. Çift oluşumunda herhangi bir anormallikle karşılaşılmamıştır. Çift oluşumunda oluşan flagellar adezyon Şekil 4.17-B’de gösterilmiştir.

Çaprazlama sonrası oluşan QFC hücreleri Şekil 4.18’de gösterilmiştir. QFC oluşumunun gözlenmesi *sec24a(k-1)* mutant genomunun sahip olduğu *SEC24A* geni 3’UTR bölgesindeki insersiyonun zigot oluşumunu ve füzyonunu etkilemediğini göstermektedir.

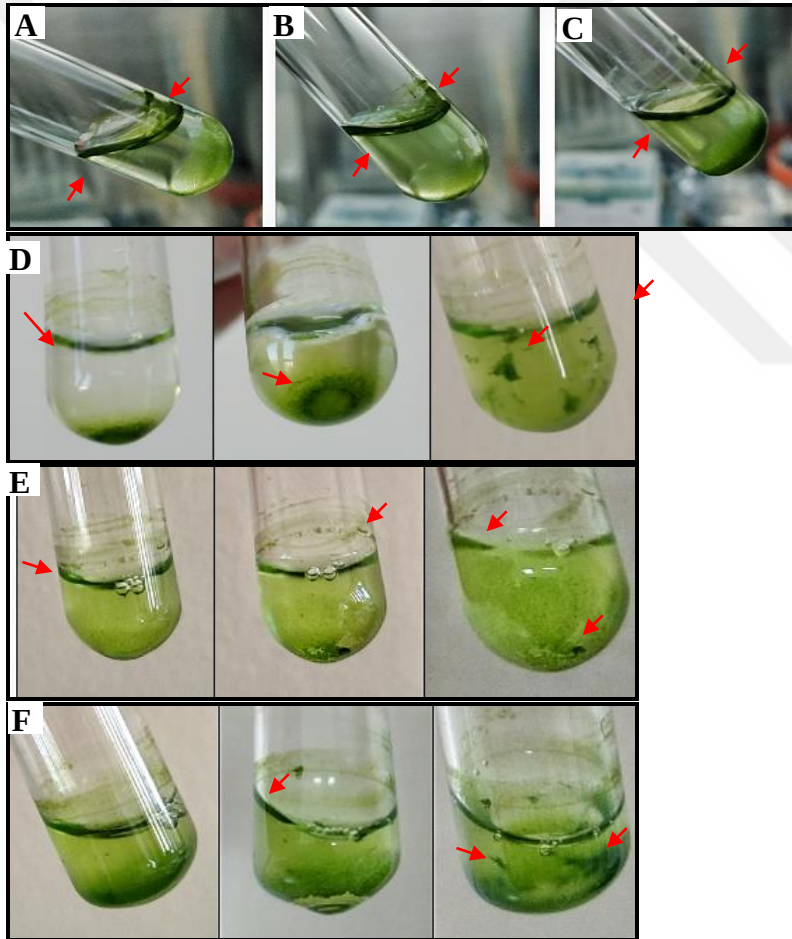
Zigot oluşumu gerçekleştiğinde sıvı besiyerinde pelikül adı verilen kutikulat bir tabaka oluşmaktadır. Deney tüplerinde azotsuz SEM-N besiyerinde *sec24a(k-1)* ve CC-125 çaprazlaması gerçekleştirildikten sonra pelikül tabakasının bulunup bulunmadığı gözlemlenmiştir. Gözlemlenen zigot pelikül görüntüleri Şekil 4.19’da gösterilmektedir.



Şekil 4.17. *crsec24(k-1)* mutant klonu ve CC-125 yabancı suşu çaprazlama sonrası bazı generatif evre mikroskop görüntüleri
Aşamalar farklı renk oklar ile gösterilmiştir. **Siyah:** Küçük grupların aglütinasyonları; **Kırmızı:** Füzyon yapan hücreler; **Beyaz:** Flagellar adezyon ve çift oluşumu



Şekil 4.18. *crsec24(k-1)* mutanlığı ve CC-125 yabancı suşu çaprazlama sonrası oluşan dört flagellalı hücre görüntüleri (A-C)
Dört flagellaya sahip olan hücreler ok ile gösterilmiştir



Şekil 4.19. Çaprazlama sonrası pelikül tabakası
A: *sec24a(k-1)* ile CC-125 çaprazlandıktan 5 saat sonra; **B:** CC-5325 ile CC-125 çaprazlandıktan 5 saat sonra; **C:** CC-124 ile CC-125 çaprazlandıktan 5 saat sonra; **D:** *sec24a(k-1)* ile CC-125 çaprazlandıktan 24 saat sonra; **E:** CC-5325 ile CC-125 çaprazlandıktan 24 saat sonra; **F:** CC-124 ile CC-125 çaprazlandıktan 24 saat sonra

4.2.7. Projenilerin analizleri

Projeni sayıları tam olduğu düşünülen tetratların projeni hücrelerinin analizleri Çizelge 4.3’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Tam tetrat oldukları tahmin edilen projeni hücrelerinin çiftleşme tipi belirleme, fenotipik, morfolojik ve insersiyon analizleri

Tetrat/ Projeni		CC-125 (mt+) ile aglutinasyon ve pelikül	CC-5325 (mt-) ile aglutinasyon ve pelikül	Mt / Mt ⁺	Paromomi- sin direnci	Renk	Koloni Morfolo- jisi	İnsersiyon Varlığı (PCR)
T E T R A T 1	P ₁	✓		-	Hassas	Koyu yeşil	Katı	insersiyon yok
	P ₂		✓	+	Dirençli	Açık yeşil	Akışkan	insersiyon var
	P ₃	✓		-	Hassas	Koyu yeşil	Katı	insersiyon yok
	P ₄		✓	+	Dirençli	Açık yeşil	Katı	insersiyon var
T E T R A T 2	P ₁		✓	+	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	
	P ₂	✓		-	Hassas	Açık yeşil	Akışkan	
	P ₃	✓		-	Hassas	Açık yeşil	Akışkan	
	P ₄	✓		-	Hassas	Açık yeşil	Akışkan	
T E T R A T 3	P ₁		✓	+	Hassas	Açık yeşil	Katı	
	P ₂	✓		-	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	
	P ₃	✓		-	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	
	P ₄		✓	+	Hassas	Açık yeşil	Katı	
T E T R A T 4	P ₁	✓		-	Dirençli	Açık yeşil	Katı	
	P ₂		✓	+	Hassas	Açık yeşil	Katı	
	P ₃	✓		-	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	
	P ₄		✓	+	Hassas	Koyu yeşil	Katı	
T E T R A T 5	P ₁		✓	+	Hassas	Açık yeşil	Katı	
	P ₂	✓		-	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	
	P ₃	✓		-	Hassas	Açık yeşil	Akışkan	
	P ₄		✓	+	Dirençli	Koyu yeşil	Katı	

Tetratların hücre diseksiyonunda 4 ya da 8'li projeni hücreleri beklenmektedir. Bazı zigotların oluşturduğu projeni sayıları farklı bulunmuştur. Bunun nedeni tetrat oluşturmaya rağmen oluşan projeni hücrelerinden bazılarının ölmesi olabilir. Hatta kalan hücreler mitoz geçirerek hücre sayısını artırmış olabilir. Bu nedenle 1'den 5'e kadar tetratlarda projeni sayıları tam olmasına rağmen; 6'dan 8'e kadar bulunan tetratlarda ise eksik ya da fazla sayıda projeni hücresi analiz edilmiştir. Projeni sayıları tam olmayan tetratların analizleri ise Çizelge 4.4'de verilmiştir.

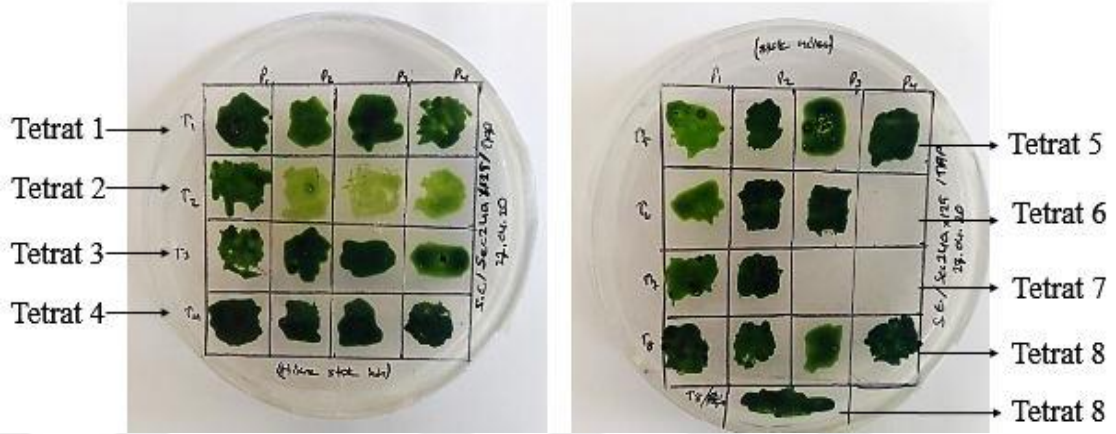
Çizelge 4.4. Tam olmayan tetrat projeni hücrelerinin fenotipik, morfolojik analizleri

Tetrat/ Projeni		Paromomisin direnci	Renk	Morfoloji
T E T R A T 6	P ₁	Hassas	Açık yeşil	Katı
	P ₂	Dirençli	Koyu yeşil	Katı
	P ₃	Hassas	Koyu yeşil	Katı
T E T R A T 7	P ₁	Hassas	Açık yeşil	Katı
	P ₂	Dirençli	Koyu yeşil	Katı
T E T R A T 8	P ₁	Dirençli	Koyu yeşil	Katı
	P ₂	Dirençli	Koyu yeşil	Katı
	P ₃	Hassas	Açık yeşil	Akışkan
	P ₄	Dirençli	Koyu yeşil	Katı
	P ₅	Dirençli	Koyu yeşil	Katı

4.2.8. Projenilerin renk ve morfolojisi

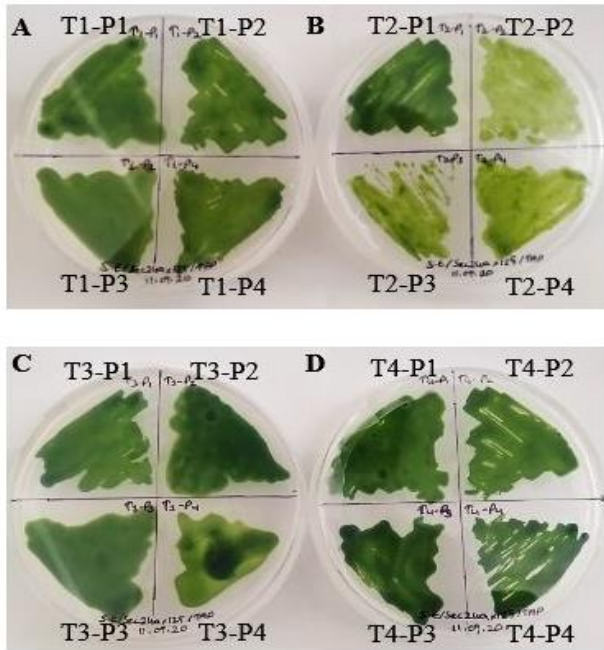
Tetratların projeniler arası renk farklılıkları Şekil 4.20'de verilmiştir. Açık ve koyu yeşil olmak üzere tetratların projenileri kendi içinde sınıflandırılmıştır. Ayrıca morfoloji olarak da akışkan ve katı olmak üzere sınıflandırılmıştır. Açık yeşil akışkan ya da açık yeşil katı projeni bulunurken, katı ve akışkan projeni ile hiç

karşılaşılmamıştır. Şekilde 4.20’de bütün tetratların projeni renkleri görülürken, Şekil 4.21’de T₁, T₂, T₃ve T₄’ün projenilerinin renkleri daha detaylı görülmektedir.



Şekil 4.20. Tetratların projeniler arası renk farklılıkları

Fotoğraf üzerindeki ‘T’ harfi tetratları, ‘P’ harfi ise projenileri temsil etmektedir.

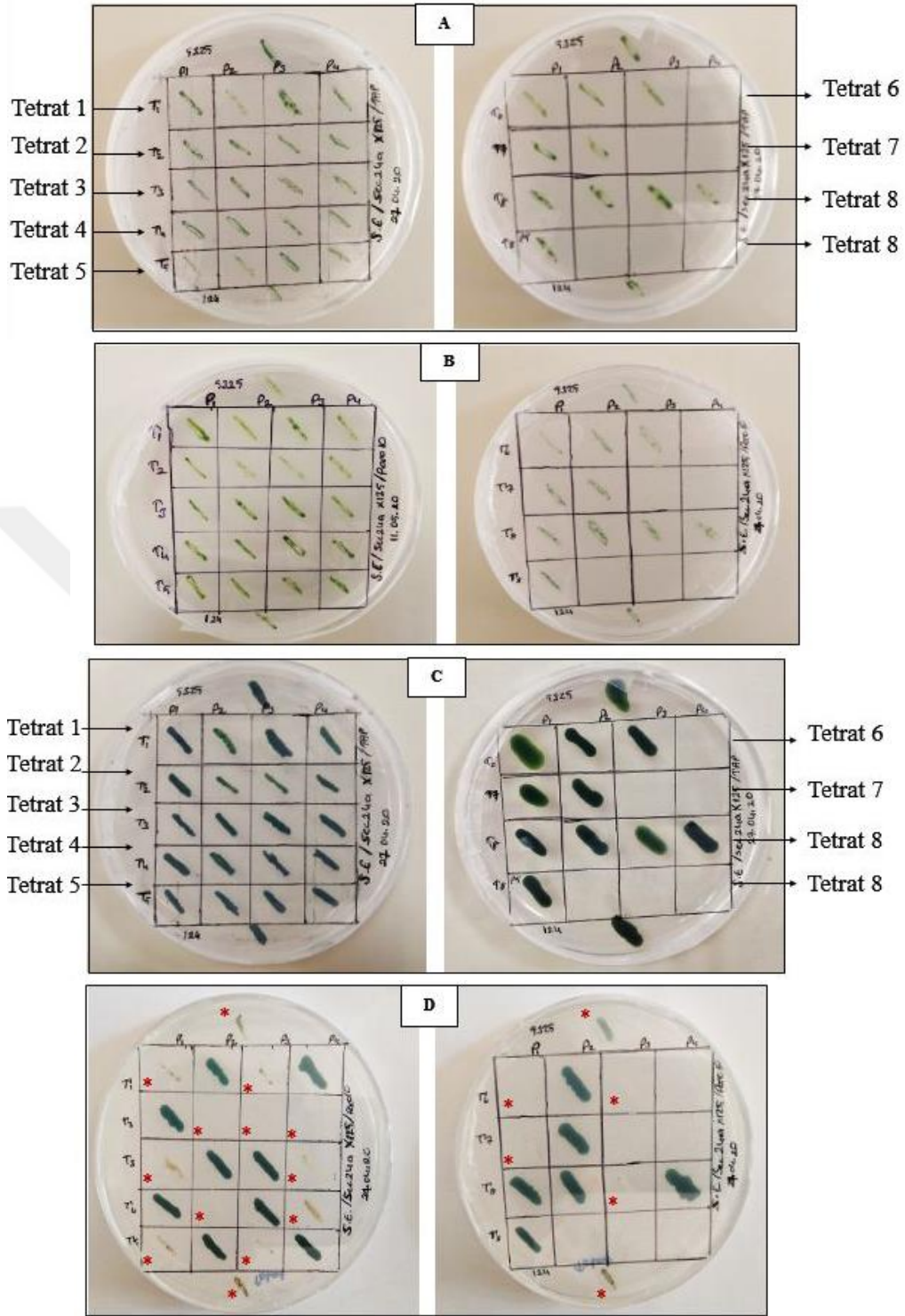


Şekil 4.21. Tetrat 1 ve tetrat 2’nin projeniler arası renk farklılıkları

Fotoğraf üzerindeki ‘T’ harfi tetratları, ‘P’ harfi ise projenileri temsil etmektedir

4.2.9. Projenilerin paromomisin direnci

Projenilere yapılan antibiyotik direnci testi Şekil 4.22’de verilmiştir.



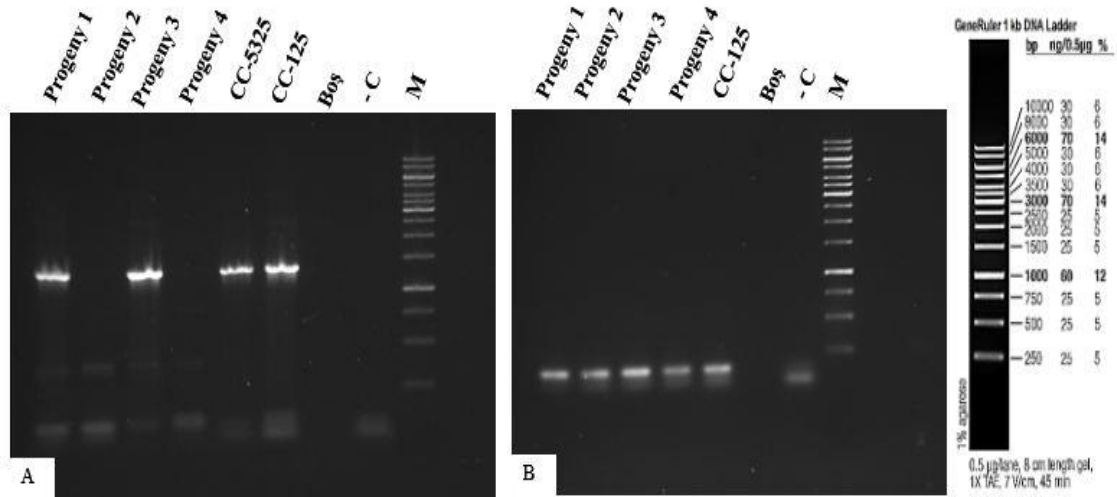
Şekil 4.22. Projenilerin antibiyotik direnci testi

A: TAP besiyeri ekimin ilk günü; **B:** Paromomisinli besiyeri ekimin ilk günü; **C:** TAP besiyeri 20 gün sonra; **D:** Paromomisinli besiyeri 20 gün sonra, hassas olan projeni hücreleri yıldız (*) ile işaretlenmiştir; Fotoğraf üzerindeki ‘‘T’’ harfi tetratları, ‘‘P’’ harfi ise projenileri temsil etmektedir. Soldan sağa 1’den başlayarak projeniler numaralandırılmıştır. İlk beş tetrat tam projeni sayısı içerdiği tahmin edilenlerdir

Kontrol olarak TAP besiyerine yapılan ekim paromomisinli besiyeri hücre ekimiyle aynı zamanda yapılmıştır. Ekimin yapıldığı gün (Şekil 4.22-A,B) ve 20 gün sonra (Şekil 4.22-C,D) çekilen fotoğrafları Şekil 4.22’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre tam tetratlar değerlendirmeye alındığında, tetrat 2 haricinde diğerlerinin bütün projenilerinde %50 antibiyotik direnci belirlenmiştir. Antibiyotik direnci olmayan projeni hücreleri ölmüştür ve Şekil 4.22-D’de kırmızı yıldız (*) ile işaretlenmiştir. Bu projenilerin kesinlikle mayoz ürünü olduklarını söylemek %50 antibiyotik direnci sonucu ve diğer sonuçların desteğiyle mümkündür.

4.2.10. Projenilerin insersiyon bölgesinin PCR analizi

Daha önce CC-125 ile çaprazlaması yapılan *sec24a(k-1)* hücrelerinden oluşan ve disekte edilen T₁’in projenilerinde insersiyonunun belirlenmesi için yapılan PCR analizi Şekil 4.23’de verilmiştir. Analiz sonucuna göre T₁’in projenilerinde beklendiği gibi %50 oranında insersiyon varlığı tespit edilmiştir. Projeni 2 ve projeni 4’de insersiyon varlığı görülürken, projeni 1 ve projeni 3’de insersiyon yoktur. Elde edilen bulgu paromomisin direnci testi ile uyumludur (Çizelge 4.3).



Şekil 4.23. Tetrat 1 projeni hücrelerinde insersiyonunun belirlenmesi için yapılan PCR analizi sonucu

A: İnsersiyon bölgesini kapsayan SP1-Int20-24A ve SP2-Up-24A-R primerleri ile yapılan PCR analiz sonucu, 1414 bp; **B:** qSEC24B3utr-F ve qSEC24B3utr-R primerleri ile yapılan kontrol PCR analiz sonucu, 152 bp; **CC-5325:** ebeveyn suş; **CC-125:** yabancı suş; **-C:** Negatif kontrol; **M:** DNA Ladder

6. SONUÇLAR

Oluşan klonların hiçbirinde TAP besiyerinde yaşamsal olarak ebeveyn suş CC-5325'e kıyasla bariz bir farklılık görülmemiştir (Şekil 4.10-A). Bu sonuca dayanarak *sec24a* mutant genomunun sahip olduğu insersiyon TAP besiyerinde letal bir etkiye neden olmamıştır. İnsersiyon kasetinin, *sec24a(k-1)*, *sec24a(k-2)* *sec24a(k-3)* ve *sec24a(k-4)* klonlarında *SEC24A* geninin 3'UTR bölgesinde olduğu doğrulandığından bu dört klon için bu bölgedeki insersiyon letal etkiye sahip değildir. Diğer klonlar için paromomisin direnci belirlenmiştir fakat insersiyonun beklenen bölgede yani *SEC24A* geni 3'UTR bölgesinde olup olmadığı bilinmemektedir. İlerleyen çalışmalarda gerek duyulması halinde diğer klonlarda da insersiyon belirlenebilir.

Paromomisin direnci testine göre seçilen 16 klon da insersiyon kasetine sahiptir (Şekil 4.10-B). Fakat PCR analizi sadece *sec24a(k-1)*, *sec24a(k-2)* *sec24a(k-3)* ve *sec24a(k-4)* mutant klonları ile yapılmıştır (Şekil 4.13). Sonuç olarak paromomisin ve PCR analizi verilerinin ortak sonuçlarına göre; *sec24a(k-1)*, *sec24a(k-2)* *sec24a(k-3)* ve *sec24a(k-4)* mutant klonlarının genomunda *SEC24A* geninin 3'UTR bölgesinde insersiyonun varlığı tespit edilmiştir. Gen şeması ve insersiyon bölgesini kapsayan primerler Şekil 3.2'de verilmiştir.

İnsersiyonun ALP enziminin hücre dışına salgılanmasında azalmaya neden olduğu gözlemlenmiş olup aktivite testi sonuçları Şekil.4.12'de görülmektedir. ALP enzim testinde bütün klonların (*sec24a(k-3)* hariç) ebeveyn suş CC-5325'e kıyasla enzim aktivitesinin azaldığı açıkça Şekil 4.12'de görülmektedir. *sec24a(k-3)* klonunun, *sec24a(k-1)*, *sec24a(k-2)* ve *sec24a(k-4)* ile aynı bölgede insersiyona sahip olmasına rağmen ALP enzim aktivitesinde azalış göstermemesi dikkat çekmiştir. Bu durum *sec24a(k-3)* klonunun süpresör mutasyona uğrama ihtimali ile açıklanabilir. Bu klon ilerideki çalışmalarımızda daha detaylı çalışılacaktır. ARS enzim aktivitesinde ebeveyn suşa kıyasla hiçbir artış ya da azalış görülmemiştir. Sonuç olarak insersiyon ALP enziminin hücre dışına salgılanmasını azaltıcı yönde etkilerken, ARS enziminin hücre dışına salgılanmasını etkilememiştir.

sec24a(k-1)'in RT-PCR analizi sonucundaki (Şekil 4.14-A,E) *SEC24A* gen ekspresyonu görülmemektedir. Bunun sebebi RT-PCR için kullanılan primerlerin 3'UTR'daki insersiyon bölgesini çevrelediğinden dolayı mutantta ürün oluşmamasıdır. Bu sonuç mutantın mRNA'sında 3'UTR'da insersiyon olduğunu kanıtlamaktadır; mutantta normal mRNA bulunmamaktadır. 3'UTR'daki insersiyonun genin kodlayan bölgesinin dışında olmasından dolayı protein sekansına etki etmeyeceği düşünülebilir. Fakat literatürde 3'UTR'daki mutasyonların gen ekspresyonunu etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Klonlardaki ALP enzim aktivitesi sonuçları bu ihtimaller ile değerlendirildiğinde; ekspresyonunun azalması ALP enziminin hücre dışına salgılanmasında azalmaya neden olmuştur. Bu sonuçlar *C. reinhardtii*'de *SEC24A* geninin ALP enziminin sekretuar yolla taşınmasında görevli olduğu hipotezini desteklemektedir.

İnsersiyonun Şekil 4.15'de görülen hücre bozukluklarına neden olduğu düşünülmektedir. Hücre dışında şeffaf balon benzeri yapı gözlemlenmiştir. Şekil 4.15'de kırmızı ok ile işaretlenen bu yapının normalden daha kalın bir çeper veya glikoprotein tabakası olduğu düşünülmektedir. Bunun yanında gözlemlenen üçgenimsi

anormal hücreler vardır. İnsersiyon hücre duvarına katılan bazı proteinlerin dışarıya salgılanmasını etkilemiş olabilir.

sec24a(k-1) ile CC-125 yabanıl suşunun çaprazlama sonrası; çiftleşmedeki flagellar aktivasyonda, hücre füzyonunda, çift oluşumu ile çift oluşumu sırasındaki flagellar etkileşiminde herhangi normal olmayan bir durum gözlemlenmemiştir. *sec24a(k-1)*'in sahip olduğu insersiyon, belirtilen generatif üreme aşamalarını olumsuz etkilememiştir. Bu aşamaların net olarak görüldüğü mikroskop görüntüleri Şekil 4.17'de verilmiştir. İnsersiyon zigot oluşumunu engellememiştir. Bunu kanıtlayan zigot pelikülü Şekil 4.19'da, QFC görüntüleri ise Şekil 4.19'da verilmiştir.

Zigot oluşumunu etkilemeyen insersiyon mayoz bölünmeyi de etkilememiş olup Şekil 4.22'de tetratların projeni hücreleri görülmektedir. Yine aynı görüntüdeki paromomisin direnci testine göre, tam projeniye (4 projeniye) sahip olduğu tahmin edilen (tetrat 1, tetrat 2, tetrat 3, tetrat 4 ve tetrat 5) tetrat 2 haricindeki bütün tetratların paromomisin testi %50 oranında dirençli, %50 oranında hassas gözlemlenmiştir. Elimizdeki projeni hücrelerinin mayoz olduğundan emin olmak adına Paromomisin direncinin yanında Mt (mating type, çiftleşme tipi) belirleme sonuçları da değerlendirilmelidir. Çaprazlamada kullanılan *sec24a(k-1)*'in Mt⁻ olduğu bilinmektedir. Bu durumda mayoz bölünmede paromomisine dayanıklı ve Mt⁺ hücrelerin varlığı görüldüğü için elimizdeki tetratların mayoz ürünü olduğu belirlenmiştir. Bahsi geçen Mt⁺ ve paromomisine dayanıklı olan hücreler Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelge 4.3'de görüldüğü üzere tetrat 1'in projeni 2 ve projeni 4 hücrelerinde; hem PCR hem de paromomisin testi sonucuna göre insersiyonun bulunması ve *sec24a(k-1)*'in Mt⁻ olmasının aksine bu projenilerin Mt⁺ olması mayoz bölünmenin gerçekleştiğini kanıtlamaktadır.

Projenilerdeki gözlemlenen renk farklılıklarının insersiyona bağlı olmadığı düşünülmektedir. Bunu destekleyen Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilen analiz sonuçlarında görüldüğü üzere paromomisine hassas projelerde (örneğin; tetrat 4, projeni 2) de dayanıklı projenilerde (örneğin; tetrat 4, projeni 1) de açık yeşil renk görülmektedir.

Sonuçlar özetlenecek olursa; insersiyon letal etki yaratmamıştır. Normal şartlarda *sec24a* mutantının bütün klonları yaşamsal faaliyetlerine ebeveyne kıyasla farklılık olmadan devam edebilmiştir. İnsersiyon ARS enziminin hücre dışına salgılanmasını etkilemezken, ALP enziminin hücre dışına salgılanmasını azaltmıştır. *SEC24A* geni *C. reinhardtii*'de ALP enziminin sekretuar yoldan hücre dışına salgılanmasında görev almaktadır. İnsersiyon çaprazlamadaki aglütinasyonu, çift oluşumunu, flagellar etkileşimi, füzyonu ve QFC oluşumunu son olarak da mayoz bölünmeyi etkilememiştir.

İlerleyen çalışmalarda *sec24a* mutantından BC3 (Geriye çaprazlama 3) elde edilip projeni testleri uygulanarak üzerinde çalışılmaya devam edilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Abe, J., Kubo, T., Saito, T., & Matsuda, Y. 2005. There gulatory networks of gene expression during the sexual differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*, as analyzed by mutants for gametogenesis. *Plant & Cell Physiology*, 46(2): 312–316.
- Barlowe, C. 1994. COPII: A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77(6): 895–907.
- Barlowe, C. 2003. Molecular Recognition of Cargo by the COPII Complex. *Cell*, 114(4): 395–397.
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2):383–410.
- Beck, C. F., & Acker, A. 1992. Gametic Differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 98(3): 822–826.
- Berman, H. M. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1): 235–242.
- BERNSTEIN, E., & JAHN, T. L. 1955. Certain Aspects of the Sexuality of Two Species of *Chlamydomonas*. *The Journal of Protozoology*, 2(3): 81–85.
- Bi, X., Corpina, R. A., & Goldberg, J. 2002. Structure of the Sec23/24–Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature*, 419(6904): 271–277.
- Chen, X.-W., Wang, H., Bajaj, K., Zhang, P., Meng, Z.-X., Ma, D., Ginsburg, D. 2013. SEC24A deficiency lowers plasma cholesterol through reduced PCSK9 secretion. *ELife*, 2.
- Crabbendam, K. J., Nanninga, N., Musgrave, A., & van den Ende, H. 1984. Flagellar tip activation in vis-à-vis pairs of *Chlamydomonas eugametos*. *Archives of Microbiology*, 138(3): 220–223.
- Ebersold, W. T. 1967. *Chlamydomonas reinhardtii*: Heterozygous Diploid Strains. *Science*, 157(3787), 447–449.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. 2000. Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4): 1005–1016.
- Faso, C., Chen, Y.-N., Tamura, K., Held, M., Zemelis, S., Marti, L., Brandizzi, F. 2009. A Missense Mutation in the Arabidopsis COPII Coat Protein Sec24A Induces the Formation of Clusters of the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus. *The Plant Cell*, 21(11): 3655–3671.

- Ferris, P. J., & Goodenough, U. W. 1987. Transcription of novel genes, including a gene linked to the mating-type locus, induced by *Chlamydomonas* fertilization. *Molecular and Cellular Biology*, 7(7): 2360–2366.
- Ferris, P. J., Armbrust, E. V., & Goodenough, U. W. 2002. Genetic structure of the mating-type locus of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics*, 160(1): 181–200.
- Gilmore, R., Blobel, G., & Walter, P. 1982. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. I. Detection in the microsomal membrane of a receptor for the signal recognition particle. *The Journal of Cell Biology*, 95(2): 463–469.
- Giraud, C. G., & Maccioni, H. J. F. 2003. Endoplasmic Reticulum Export of Glycosyltransferases Depends on Interaction of a Cytoplasmic Dibasic Motif with Sar1. *Molecular Biology of the Cell*, 14(9): 3753–3766.
- Gomez-Navarro, N., & Miller, E. A. 2016. COP-coated vesicles. *Current Biology*, 26(2): R54–R57.
- Goodenough U. W. 1992. Greenyeast. *Cell*, 70(4): 533–538.
- Goodenough, U. W., & Jurivich, D. 1978. Tipping and mating-structure activation induced in *Chlamydomonas* gametes by flagellar membrane antisera. *The Journal of Cell Biology*, 79(3): 680–693.
- Goodenough, U., Lin, H., & Lee, J.-H. 2007. Sex determination in *Chlamydomonas*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3): 350–361.
- Gray, M. W., & Boer, P. H. 1988. Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 319(1193): 135–147.
- Harris, E. H. 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 363–406.
- Harris, E. H., Stern, D. B., & Witman, G. B. 2009. The Sexual Cycle. In *The Chlamydomonas Sourcebook* (pp. 119–157). Elsevier.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., & Carvalho, I. S. 2013. Microalgae taxonomy and breeding. In *Biofuel crops: production, physiology and genetics* (pp. 44–53). Wallingford: CABI.
- Hoffman, J., & Goodenough, U. 1980. Experimental dissection of flagellar surface motility in *chlamydomonas*. *The Journal of Cell Biology*, 86(2): 656–665.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6): 845–858.

- Kuehn, M. J., Herrmann, J. M., & Schekman, R. 1998. COPII–cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles. *Nature*, 391(6663): 187–190.
- Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. 2004. Bi-directional protein transport between the er and golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1): 87–123.
- Letourneur, F., Gaynor, E. C., Hennecke, S., Démollière, C., Duden, R., Emr, S. D., ... Cosson, P. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell*, 79(7): 1199–1207.
- Li, X., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R. E., Saroussi, S., Meyer, M. T., Jonikas, M. C. 2019. A genome-wide algal mutant library and functional screen identifies genes required for eukaryotic photo synthesis. *Nature Genetics*, 51(4): 627–635.
- Lord, C., Ferro-Novick, S., & Miller, E. A. 2013. The Highly Conserved COPII Coat Complex Sorts Cargo from the Endoplasmic Reticulum and Targets It to the Golgi. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(2): a013367–a013367.
- Lu, M., Wang, W., Zhang, S., & Li, Y. 2018. SEC24A stimulate soncogenicity of human gastric cancer cells. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(8): 4044–4051.
- Manuell, A. L., & Mayfield, S. P. 2006. A bright future for Chlamydomonas. In *Genome Biology* (Vol. 7).
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., & Yeung, T. 1998. COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. *Cell*, 93(2): 263–275.
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., & Yeung, T. 1998. COPII-Coated Vesicle Formation Reconstituted with Purified Coat Proteins and Chemically Defined Liposomes. *Cell*, 93(2): 263–275.
- Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., De Pamphilis, C. W., Miller, W., Harris, E. H., & Stern, D. B. 2002. The Chlamydomonas reinhardtii Plastid Chromosome. *The Plant Cell*, 14(11): 2659–2679.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., Witman, G. B., ... Grossman, A. R. 2007. The Chlamydomonas Genome Reveals the Evolution of Key Animal and Plant Functions. *Science*, 318(5848): 245–250.
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C. S., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. 2003. Multiple Cargo Binding Sites on the COPII Subunit Sec24p Ensure Capture of Diverse Membrane Proteins into Transport Vesicles. *Cell*, 114(4): 497–509.

- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., & Schekman, R. 2002. Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *The EMBO Journal*, 21(22): 6105–6113.
- Miller, S. M. 2010. Volvox, Chlamydomonas, Evolution of Multicellularity. 3(9):65
- Nakano, A., Brada, D., & Schekman, R. 1988. A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *The Journal of Cell Biology*, 107(3): 851–863.
- Pagano, A., Letourneur, F., Garcia-Estefania, D., Carpentier, J.-L., Orci, L., & Paccaud, J.-P. (1999). Sec24 Proteins and Sorting at the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12): 7833–7840.
- Pasquale, S. M., & Goodenough, U. W. 1987. Cyclic AMP functions as a primary sexual signal in gametes of Chlamydomonas reinhardtii. *The Journal of Cell Biology*, 105(5): 2279–2292.
- Piperno, G., Mead, K., & Henderson, S. 1996. Inner dynein arms but not outer dynein arms require the activity of kinesin homologue protein KHP1(FLA10) to reach the distal part of flagella in Chlamydomonas. *The Journal of Cell Biology*, 133(2): 371–379.
- Qu, X., Chatty, P. R., & Roeder, A. H. K. 2014. Endomembrane Trafficking Protein SEC24A Regulates Cell Size Patterning in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 166(4): 1877–1890.
- Randall, J., Cavalier-Smith, T., Mcvittie, A., Warr, J. R., & Hopkins, J. M. 1968. Developmental and Control Processes in the Basal Bodies and Flagella of Chlamydomonas reinhardtii. In *Developmental Biology* (pp. 43–83). Elsevier.
- Rochaix, J.-D. 1995. Chlamydomonas reinhardtii as the Photosynthetic Yeast. *Annual Review of Genetics*, 29(1): 209–230.
- Sager, R., & Granick, S. 1954. Nutritional control of sexuality in chlamydomonas reinhardtii. *The Journal of General Physiology*, 37(6): 729–742.
- Salomé, P. A., & Merchant, S. S. 2019. A Series of Fortunate Events: Introducing Chlamydomonas as a Reference Organism. *The Plant Cell*, 31(8): 1682–1707.
- Sato, K. 2004. COPII Coat Assembly and Selective Export from the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biochemistry*, 136(6): 755–760.
- Sato, K., & Nakano, A. 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Letters*, 581(11): 2076–2082.

- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., & Schekman, R. 2000. Lst1p and Sec24p Cooperate in Sorting of the Plasma Membrane Atpase into Copii Vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology*, 151(5): 973–984.
- Sudhof, T. C., & Rothman, J. E. 2009. Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science*, 323(5913): 474–477.
- Tang, B. L., Kausalya, J., Low, D. Y. H., Lock, M. L., & Hong, W. 1999. A Family of Mammalian Proteins Homologous to Yeast Sec24p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(3): 679–684.
- Tardif, M., Atteia, A., Specht, M., Cogne, G., Rolland, N., Brugière, S., ... Cournac, L. 2012. PredAlgo: A New Subcellular Localization Prediction Tool Dedicated to Green Algae *Molecular Biology and Evolution*, 29(12): 3625–3639.
- Treier, U., Fuchs, S., Weber, M., Wakarchuk, W. W., & Beck, C. F. 1989. Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*: light dependence and gene expression patterns. *Archives of Microbiology*, 152(6): 572–577.
- Walter, P., & Blobel, G. 1982. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Biochemical Society Symposium*, 47: 183–191.
- Waters, M. G., Serafini, T., & Rothman, J. E. 1991. “Coatomer”: a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. *Nature*, 349(6306): 248–251.
- Weissig, H., & Beck, C. F. 1991. Action Spectrum for the Light-Dependent Step in Gametic Differentiation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 97(1): 118–121.
- Wendeler, M. W., Paccaud, J., & Hauri, H. 2007. Role of Sec24 isoforms in selective export of membrane proteins from the endoplasmic reticulum. *EMBO Reports*, 8(3): 258–264.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., & Schekman, R. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*, 259(5100): 1466–1468.
- Zanetti, G., Pahuja, K. B., Studer, S., Shim, S., & Schekman, R. 2012. COPII and the regulation of protein sorting in mammals. *Nature Cell Biology*, 14(1): 20–28.

8. EKLER

ÖZGEÇMİŞ

SEVİNÇ EVREN
sevinccevren@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2020	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Enzim ve Mikrobiyal Biyoteknoloji BD, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2013-2017	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya

PROJELER

1. Araştırmacı, 2019- 2020. Chlamydomonas reinhardtii’de COPII Vezikül Altbirimi SEC24A İnsersiyonel Mutantlarının Genetik Linkaj ve Fenotipik Analizleri. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FYL-2019-4902. (12.662,27 ₺).