

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE SEC24B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sibel KALA

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE SEC24B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sibel KALA

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

TEMMUZ 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE *SEC24B* İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sibel KALA

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2019-4903 nolu proje ile desteklenmiştir**

TEMMUZ 2020


T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**CHLAMYDOMONAS REINHARDTII' DE SEC24B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sibel KALA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY



ÖZET

***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE *SEC24B* İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Sibel KALA

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Temmuz 2020; 71 sayfa

COPII, endoplazmik retikulumun (ER) membranında oluşan küçük membran veziküllerinin oluşturulmasından sorumlu olan yüksek oranda korunmuş bir protein grubudur. Bu protein grubunun bileşenlerinden biri olan SEC24 proteini COPII vezikül oluşumunda yer alan, ER membranında bulunan taşınacak kargo proteinine bağlanmadan sorumlu birincil alt bileşen olarak kabul edilmektedir. *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) genomunda COPII vezikül oluşumunda rol alması olasılığı olan iki *SEC24* gen modeli (*SEC24A*- *SEC24B*) mevcuttur. Bu tez çalışmasında henüz literatürde çalışılmamış bir konu olan *C. reinhardtii*'de *SEC24B* genin mutasyon analizi yapılarak, bu genin fonksiyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. *C. reinhardtii*'nin *sec24b* mutant suşu bu çalışmada kullanılmıştır. İnsersiyon bölgesinin varlığını belirlemek için *sec24b* mutant suşu klonlarından genomik DNA izole edilmiş ve insersiyonun bulunduğu bölge PZR ile çoğaltılmıştır. Genetik bağlantının belirlenmesi için mutant suş yabancı tiple çaprazlanmış ve projenide paromomisin dayanıklılık fenotipi testi yapılmıştır. *SEC24B* mRNA'sının bulunup bulunmadığı RT-PZR yapılarak belirlenmiştir. *sec24b* mutant suşu klonlarında sekresyon işlevinin olup olmadığını belirlemek için arilsülfataz ve alkalin fosfataz aktivitelerinin kolorimetrik olarak testi yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda *sec24b* mutant suşunun genomunda tek bir insersiyon varlığı tespit edilmiştir ve projenin %50'si paromomisine dayanıklıdır. Paromomisine dayanıklı projenilerde gendeki insersiyonun varlığı tespit edilmiştir. *SEC24B* proteininde mutasyon olan projenilerde ER'dan Golgi'ye protein transferinde problem olduğundan projenide normal hücrelere oranla daha yavaş büyüyen hücrelerin olduğu görülmüştür. Yapılan bu tez çalışması ile elde edilen veriler *C. reinhardtii*'nin *SEC24B* genin fonksiyonu üzerine literatüre bilgi kaynağı sağlandığı düşünülmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: COPII Vezikül Taşınımı, *Chlamydomonas reinhardtii*, Hücre İçi Trafik, *SEC24B* Geni, Sekratuar Yolak

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

ABSTRACT

GENETIC LINKAGE AND PHENOTYPIC ANALYSIS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII SEC24B INSERTIONAL MUTANTS

Sibel KALA

MSc

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

July 2020; 71 pages

COPII is a highly conserved protein group which is responsible for small membrane vesicles formation in the membrane of the endoplasmic reticulum. *SEC24* gene is one of the components of COPII protein group and involved in the formation of COPII vesicles. *SEC24* gene is considered as the primary subcomponent responsible for binding to the cargo protein which is located in ER membrane. There are two *SEC24* gene models in the *Chlamydomonas reinhardtii* genome that are possible to play a role in the formation of COPII vesicles. These gene models are: *SEC24A* and *SEC24B*. In this thesis we aimed to determine the function of *SEC24B* gene in *C. reinhardtii* with genetic linkage and phenotypic characterization which is not studied in literature before. *sec24b* mutant strain of *C. reinhardtii* was used in this study. To determine the region of the insertion site, genomic DNA from the *sec24b* mutant strain clones was isolated and the site where the insertion was located was amplified by PCR. To determine the genetic linkage, the mutant strain was crossed with the wild type and the progeny were tested for paromomycin resistance phenotype. Presence of *SEC24B* mRNA is determined by RT-PCR. Arylsulfatase and alkaline phosphatase activities tested colorimetrically determine whether there is a secretion function in *sec24b* mutant strain clones. As a result of these studies, a single insertion was detected in the genome of the *sec24b* mutant strain and 50% of the progeny was resistant to paromomycin. The presence of insertion in the gene has been determined in the progeny which are resistant to paromomycin. We hypothesize that in the mutant progeny, due to a problem in the transfer of proteins from ER to Golgi cells grow slower than normal cells. The data obtained in this thesis is aimed to provide information about the function of *C. reinhardtii SEC24B* gene to the literature.

KEYWORDS: COPII Vesicle Transport, *Chlamydomonas reinhardtii*, Intracellular Trafficking, *SEC24B* Gene, Secretory Pathway

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Assoc. Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Emre AKSOY

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca her zaman yanımda olan desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez süreci boyunca ihtiyacım olduğunda her zaman yanımda olan bilgilerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Gülsen BAYRAK ve Arş. Gör. Büşra ARIKAN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim süremde aynı laboratuarda birlikte çalışma şansı bulduğum Sevinç EVREN ve Özgül MUSUL' a deneyler sırasındaki yardımları ve eğlenceli bir ortam sağladıkları için teşekkür ederim.

Yüksek öğretimimde hayatıma giren maddi ve manevi ve her zaman yanımda olan çok değerli dostlarım Ayşegül PULAT, Ayşenur Ezgi KANDAZ ve Özge CİN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenim sürecimde arkadaş olarak kazandığım, her zaman yanımda olan Şükran YILDIZ, Alparslan KARABENİZ' e teşekkür ederim.

Bu tezin hazırlanmasında destek veren Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Tüm öğrenim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, tüm zorlukların üstesinden gelebilme mi sağlayan, daha ileri gidebilme için beni cesaretlendirip yol gösteren, akademik kariyerim için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, canım aileme teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	2
2.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 'nin Taksonomisi ve Hücresel Yapısı	5
2.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ' nin Yaşam Döngüsü.....	6
2.3. CopII Vezikül Oluşumu ve Taşınımı	9
2.4. Sec24 Proteini.....	12
2.5. Diğer Organizmalarda Sec24 Geni ve SEC24B Geni Üzerine Yapılan Önceki Çalışmalar	12
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1. Alg Kültürü	16
3.2. DeneYlerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	17
3.3. Kültür Ortamları ve Hazırlanışı.....	19
3.4. Tek Klon Oluşturma	21
3.5. Paromomisin Direnç Testi.....	22
3.6. Arilsülfataz Enzim Aktivitesinin Kolorimetrik Tayini	22
3.7. Alkelen Fosfataz Enzim Aktivitesinin Kolorimetrik Tayini	22
3.8. Hücre Sayımı.....	23
3.9. Genomik DNA İzolasyonu.....	23
3.10. DNA Örneklerinin Kalitatif Tayini	24
3.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Ters Transkriptaz (RT-PZR) Kullanılan Primerler	24
3.12. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	25
3.13. RNA İzolasyonu	27
3.14. RNA Örneklerinin Miktarının Belirlenmesi	28

3.15. RNA Örneklerinin Kalitatif Tayini	28
3.16. Komplementer Deoksiribonükleik Asit (cDNA) Sentezi	28
3.17. RT-PZR	28
3.18. PZR ve RT-PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi	30
3.19. Zigot Oluşumu.....	30
3.20. Tetrad Analizleri.....	31
3.21. Biyoinformatik Analizlerin Gerçekleştirilmesi.....	31
3.21.1. <i>C. reinhardtii</i> 'nin SEC24B proteinin tahmini homoloji modellemesinin belirlenmesi	32
3.21.2. <i>C. reinhardtii</i> 'nin SEC24B proteinin olası hücre içi lokalizasyonun belirlenmesi	32
3.21.3. SEC24 ortologlarının tahmini domain bölgelerinin belirlenmesi	28
3.21.4. <i>C. reinhardtii</i> 'nin SEC24B proteininin diğer organizmalardaki ortologlarına benzerlik derecesinin belirlenmesi	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	34
4.1. Bioinformatik Veri Tabanlarının Tahmini Sonuçları	34
4.1.1. Protein dizilerinin hizalanması sonuçları	34
4.1.2. <i>C. reinhardtii</i> 'nin SEC24B proteininin hücre içi lokalizasyon sonucu.....	9
4.1.3. Protein homoloji modellemesi sonucu (Üç boyutlu yapısı)	40
4.1.4. SEC24 ortologlarının tahmini domain bölgelerinin sonucu.....	42
4.2. Deneysel Çalışmalar	44
4.2.1. Arilsülfataz enzim aktivitesi sonucu	44
4.2.2. Alkelen fosfataz enzim aktivitesi sonucu	45
4.2.3. Paromomisin direnci testi sonucu.....	46
4.2.4. Hücre sayımı sonucu	47
4.2.5. PZR ve RT-PZR sonuçları	48
4.2.6. <i>sec24b</i> mutantının hücre yapısının sonuçları	50
4.2.7. <i>sec24b</i> mutantının eşeyli üreme döngüsünün sonuçları	52
4.2.8. Tetrad analiz sonucu.....	56
6. SONUÇLAR	63
7. KAYNAKLAR	65

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas Reinhardtii*’de *Sec24B* İnsersiyonel Mutantlarının Genetik Bağlantı 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

Sibel KALA

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%: Yüzde

°C: Santigrat derece

μ: Mikrolitre

∞: Sonsuz

V: Volt

μm: Mikrometre

Kısaltmalar

ALP: Alkalen Fosfataz

ARS: Arilsülfataz

cAMP: Dibutiril Siklik Adensin Mono Fosfat

cDNA: Komplementer Deoksiribonükleik Asit

ddH₂O: Çift Distile Su

dH₂O: Distile Su

dk: Dakika

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP: Deoksinükleotid Trifosfat

EDTA: Etilendiamin Tetra Asetik Asit

ER: Endoplazmik Retikulum

g: Gram

GEF: Guanin Nükleotit Değişim Faktörü

kb: Kilobaz

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

M: Molar

mg: Miligram

ml: Mililitre

mM: Milimolar

NCBI: National Center for Biotechnology Information

ng: Nanogram

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

QFC: Quadriflagellat Hücre (Dört Kamçılı Hücre)

RNA: Ribo Nükleik asit

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

RT-PZR: Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SNARE: Soluble N-Ethylmaleimide-Sensitive Factor (NSF) Attachment Protein Receptor

SRP: Signal Recognition Particle

TAE: Tris-Asetik Asit-Edta

Taq: Thermus Aquaticus

TGN: Trans-Golgi Ağı

Tm: Erime Sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. COPI, COPII ve klatrin veziküllerin hücre trafikteki yolu (Banifacino ve Glick).....	2
Şekil 2.1. <i>C. reinhardtii</i> 'nin hücre yapısının gösterimi (Nikelsen ve Kück 2000)	6
Şekil 2.2. <i>C. reinhardtii</i> 'nin zigot oluşum aşamaları (Wang ve Snell 2003).....	7
Şekil 2.3. <i>C. reinhardtii</i> 'nin eşeyli üremesinin döngüsü.....	8
Şekil 2.4. COPII vezikül oluşumu (Lu ve Kim 2020)	11
Şekil 2.5. Sar1-Sec23-Sec24 kompleksinin yapısı	13
Şekil 3.1. <i>C. reinhardtii</i> SEC24B geni ve insersiyon haritası.....	16
Şekil 3.2. <i>sec24b</i> mutant suşundan klon oluşturulması	22
Şekil 3.3. Alken fosfataz enzim kolorimetrik tayini	23
Şekil 3.4. SEC24B geninin klonlanmasında kullanılan primerlerinin gösterimi	25
Şekil 3.5. <i>C. reinhardtii</i> suşlarının TAP azot içermeyen sıvı besi ortamına alınması.....	31
Şekil 4.1. <i>C. reinhardtii</i> 'de SEC24B ve SEC24A protein dizilerinin hizalanması.....	35
Şekil 4.2. CrSEC24B ve VcSEC24 protein dizilerinin hizalanması	36
Şekil 4.3. CrSEC24B ve AtSec24B protein dizilerinin hizalanması.....	37
Şekil 4.4. CrSEC24B ve ScSec24p protein dizilerinin hizalanması.....	38
Şekil 4.5. <i>C. reinhardtii</i> 'de SEC24B ve <i>Homo sapiens</i> ' de SEC24D protein dizilerinin hizalanması.....	39
Şekil 4.6. CrSEC24B proteininin hücre içi yerinin olası sonuçları	40
Şekil 4.7. <i>C. reinhardtii</i> SEC24B proteinine ait tahmini 3D konformasyonu ve <i>H. sapiens</i> 'deki c3eg9b pdb kodlu (Sec24D) proteininin kristal yapısı	41
Şekil 4.8. <i>C. reinhardtii</i> 'de SEC24B ve <i>H. sapiens</i> SEC24D proteinlerinin SEC23 proteinine bağlandığı FXP motif dizisinin tahmini yerinin 3D konformasyonundaki görüntüsü.....	42
Şekil 4.9. Arilsülfataz aktivite testi sonucu	44
Şekil 4.10. Alkelen fosfataz aktivite testi sonucu	45

Şekil 4.11. Paromomisin direnç fenotipik testi.....	46
Şekil 4.12. <i>sec24b</i> mutantının ve yabanıl tip (CC124, CC125) suşlarının hücre sayımı ile oluşturulan büyüme eğrisi grafiği	47
Şekil 4.13. Mutant klonları (<i>sec24b</i> (k-5), <i>sec24b</i> (k-6)) ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125) PZR görüntüleri.....	48
Şekil 4.14. Mutant klonları (<i>sec24b</i> (k-5), <i>sec24b</i> (k-6)) ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125) PZR görüntüleri.....	49
Şekil 4.15. Mutant klonları (<i>sec24b</i> (k-5), <i>sec24b</i> (k-6)) ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125) RT-PZR görüntüleri.....	49
Şekil 4.16. Mutant klonları (<i>sec24b</i> (k-5), <i>sec24b</i> (k-6)) ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125) RT-PZR görüntüleri.....	50
Şekil 4.17. <i>sec24b</i> mutantının, azot içermeyen TAP sıvı besi yerinde 13 saat bekletildikten sonra ışık mikroskobu altında görüntülenen fotoğrafları	51
Şekil 4.18. Azotsuz TAP sıvı besi yerinde 13 saat bırakılan <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin flagella hareketleri.....	52
Şekil 4.19. Yabanıl tip suşların (CC125ve CC124) ışık mikroskobu altındaki eşeyli üreme aşamalarından bazıları.....	53
Şekil 4.20. <i>sec24b</i> mutantının ışık mikroskobu altındaki eşeyli üreme aşamalarından bazıları.....	53
Şekil 4.21. <i>sec24b</i> mutantının ışık mikroskobu altındaki eşeyli üreme döngüsü	54
Şekil 4.22. <i>sec24b</i> mutantı ve CC124, CC5325 yabanıl tip suşlarının CC125 yabanıl tip suş ile çaprazlandıktan 1 gün sonraki zigot peleti görüntüsü.....	55
Şekil 4.23. Tetradlardaki küçük projenilerin görüntüleri.....	56
Şekil 4.24. Tetradların fenotipik paromomisin direnç testi	57
Şekil 4.25. T ₁ ,T ₂ ve T ₃ TAP besi yerinde 7 gün büyütülmüş görüntüsü.....	57
Şekil 4.26. Projenilerin fenotipik paromomisin direnç testi sonucu görüntüsü.....	58
Şekil 4.27. T ₂ 'nin PZR sonuçları	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı organizmalarda bulunan Sec24 homologları.....	13
Çizelge 3.1. Cihaz listesi ve kullanım amaçları.....	16
Çizelge 3.2. TAP katı ve sıvı formlarının içeriği.....	19
Çizelge 3.3. Azot içermeyen SEM besi yerinin sıvı formunun içeriği	20
Çizelge 3.4. TAP fosfat içermeyen besi yerinin katı formunun içeriği	20
Çizelge 3.5. TAP sülfat içermeyen besi yerinin katı formunun içeriği	21
Çizelge 3.6. TAP paromomisin besi yerinin katı formunun içeriği.....	21
Çizelge 3.7. PZR ve RT-PZR kullanılan primerler.....	24
Çizelge 3.8. PZR bileşenleri (QIGAEN)	25
Çizelge 3.9. PZR bileşenleri (AMPLIQON)	26
Çizelge 3.10. SP1-Int6-24B F ve SP2-9E-24B-R primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü koşulları	26
Çizelge 3.11. SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü koşulları	26
Çizelge 3.12. SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü koşulları	27
Çizelge 3.13. RT-PZR bileşenleri.....	29
Çizelge 3.14. qCBLP-F1 ve qCBLP-R1 primerleri ile yapılan RT-PZR analizi protokolü koşulları.....	29
Çizelge 3.15. SEC24B-E6F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi protokolü koşulları	30
Çizelge 3.16. 23A-E10-F ve 23A-3utr-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi protokolü koşulları	30
Çizelge 3.17. Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan proteinlerin erişim numaraları ..	32
Çizelge 4.1. <i>C. reinhardtii</i> ' de paraloglarının Clustal Omega ile hizalama sonuçları....	34
Çizelge 4.2. Organizmalardaki protein domain bölgelerinin Pfam veri tabanının tahmini sonuçları	43

Çizelge 4.3. Tetrad analiz sonuçları.....	59
--	----

1. GİRİŞ

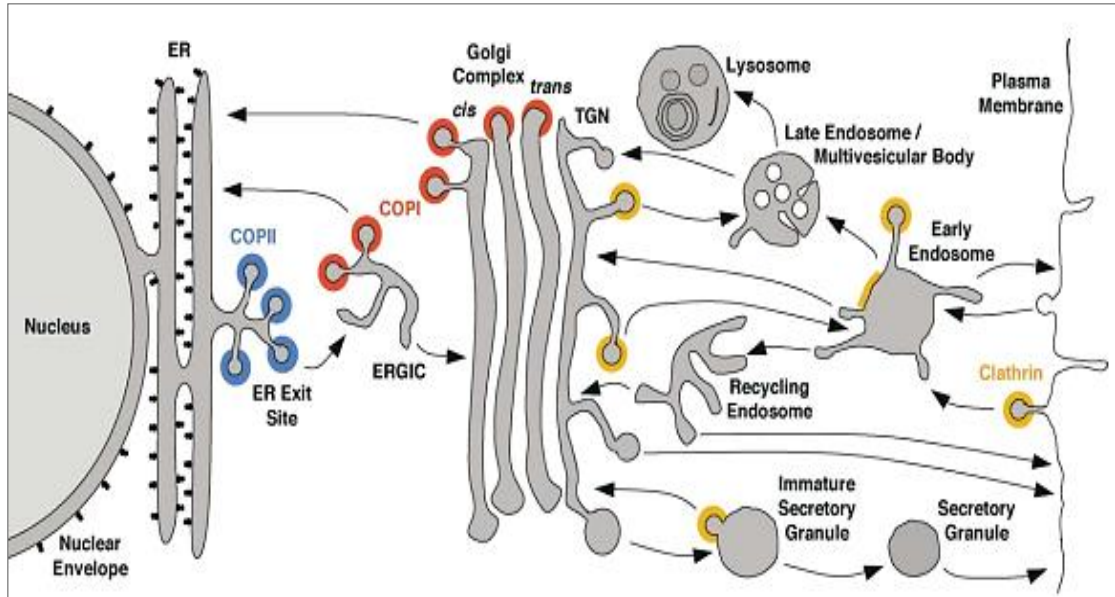
Hücre biyolojisinin temel amaçlarından biri hücrelerin moleküler düzeyde nasıl organize olduğunu anlamaktır. Bu organizasyonun temel bir parçası ökaryotik salgı yolağı ve bu yolağı oluşturan organelleri içermektedir (Barlowe 1988). Ökaryotik hücrelerdeki salgı yolağı, çok çeşitli proteinlerin, kompleks karbonhidratların ve lipitlerin biyogenezinden ve hücre içi dağılımından sorumludur. Salgı yolundaki bu dağılım oldukça dinamiktir ve belirli hücrel fonksiyonların gerçekleşmesi için de oldukça önem arz etmektedir. Salgı proteinlerinin erken salgı yolundan geçişi için endoplazmik retikulumdan (ER) nasıl ihraç edildiği henüz tam olarak bilinmemek ile birlikte hücrelerin nasıl organize edildiğinin, proteinlerin ve diğer moleküllerin hücre içi veya dışına nasıl seçici olarak salgıladıklarını belirlenmesi oldukça önemlidir (Hughes ve Stephens 2008).

Çeşitli hücre içi organellere veya plazma membranına taşınan proteinler ilk önce ER’da sentezlenir ve işlenir (Rapoport vd. 2017). Yeni sentezlenmiş proteinlerin ve lipitlerin ileri taşınması (anterograd transport olarak da bilinir) ER’da başlatılır ve bu şekilde ER ve Golgi taşıma endomembran sistemi için hayati bir taşıma ağını temsil eder. Bu sistem de ER’da sentezlenen proteinler, taşıyıcı veziküller içinde paketlenerek buradan füzyona uğrayarak Golgi kompleksine taşınarak bu kompleks ile kaynaşmaktadır (Bonifacino ve Glick 2004). Proteinlerin sentez olduktan sonra hücrede işlev gördükleri yerlere doğru bir şekilde lokalize olmaları hücrenin normal işlevini yürütebilmesi için zorunludur ve hücre içi trafik konusu üzerine günümüzde yoğun olarak araştırma yapılmaktadır (Sanderfoot ve Raikhel 1999; Barlowe ve Miller 2013). Proteinlerin hedef organellere taşınımına göre ayrıldıkları organel Golgi kompleksi, olarak kabul edilmektedir. Bu ayırım proteinlerin, lizozoma taşınanlar, plazma membranına taşınanlar, kontrollü salınım için, veziküllere taşınarak sinyalini beklemek üzere plazma membranının yakınına taşınanlar olarak esas üç farklı hedefe yönlendirilmektedir (Füllekrug ve Nilsson 1998).

Hücre içi trafikte (egositozda) 3 farklı kılıf protein taşınım vezikülü yer almaktadır. Bunlar; iki “coat protein (COP)” olan Coat protein kompleksi I (COPI), Coat protein kompleksi II (COPII), ve diğeri ise klattrin kılıfı vezikülüdür ve bu taşınım vezikülleri Şekil 1.1’ de gösterilmektedir (Schekman ve Orci 1996; Dacks ve Robinson 2017). Bu üç kılıf proteini, ortak bir kökenden oluştuğu fikrini destekleyen birçok ilkel kılıf kompleksi özelliğini taşımaktadır (Field ve Dacks 2009). Bu özelliklerden biri ise üçü de, küçük bir GTPaz (GTPase) aktivasyonu ile membrana temel proteinlerin alım mekanizmasını başlatır (Field ve Dacks 2009). Klattrin ve COPI kılıf veziküllerinin oluşması için aktive edici GTPase proteini ARF (ADP-ribosylation factor 1) dir. COPII kılıf vezikül oluşumu için aktive edici GTPase proteini SAR1’ dir (Kirchhausen 2000). Klattrin kılıflı veziküller taşıyıcı veziküllerin ilk keşfedilen ve üzerinde ilk çalışılmalar yapılmış veziküldür (Kirchhausen 2000). Trans-Golgi ağından (TGN) düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptörü ve diğeri birçok plazma membran proteini ve ligandları, endozomlara geçebilmesi için klattrin veziküllüğü ile tomurcuklanır (Payne ve Schekman 1985; Schekman ve Orci 1996). Proteinlerin ER ve Golgi arasında transferi ise COPII ve COPI vezikülleri aracılığıyla olmaktadır. COPII içeren veziküller proteinlerin ER’dan Golgi’ye anterograde (ileriye doğru) transferinde veya ER-Golgi ara bölmesine (ERGIC) aktarılır (Sato, 2004). COPI içeren veziküller ise proteinlerin Golgi’den ER’a retrograde (geriye doğru) transferinde rol almaktadır (Barlowe vd. 1994; Brandizzi ve Barlowe

2013; Salama ve Schekman 1995). ER ve Golgi arasındaki membran trafiği çift yönlüdür ve benzer mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Her iki durumda donör organel üzerinde bir taşıyıcı oluşur ve daha sonra hedef organelle bağlanır ve kaynaşır (Brandizzi ve Barlowe 2013).

COPII, ER membranından oluşan küçük membran veziküllerinin oluşturulmasından sorumlu olan yüksek oranda korunmuş bir protein grubudur (Lee vd. 2004; Barlowe vd. 1994). COPII kaynaklı veziküllerin oluşumu ve transferi, hücre salgı yolunda, zar ve lümene ait kargo proteinlerinin, ER' da bulunan sentez bölgelerinden hücre içindeki diğer membran bölmelerine transferinde oldukça önemli bir ilk aşamadır (Jensen ve Schekman 2011). COPII kılıf vezikülünün etkin çalışabilmesi için tahminen tanımlanmamış birçok zar bileşeni gerekli olsa da veziküllerin oluşabilmesi için, minimal toplam beş protein içeren üç sitozolik bileşen gereklidir. Ayrıca bu bileşenler vezikülün depolimerizasyonu ile yeniden ER'da geri dönüştürülür ve yeni bir kargo ihracatına hazır hale getirilir (Forster et vd. 2006). Bu bileşenler: Sec23-Sec24 kompleksi, Sec13 – Sec31 kompleksi ve küçük GTPaz olan Sar1'dir (Barlowe vd. 1994; Jensen ve Schekman 2011).



Şekil 1.1. COPI, COPII kılıfı ve klatriin kılıf veziküllerin hücre içi trafikteki yolu ; Taşıma adımları oklarla gösterilmiştir; COPII (mavi), COPI (kırmızı) ve klatriin (turuncu) kılıf vezikülleri renkleri ile belirtir (Bonifacino ve Glick 2004)

Sec24, ER membranında bulunan kargo proteinine bağlanmadan sorumlu birincil alt bileşen olarak kabul edilmektedir (Matsuoka vd. 1998). Ayrıca Sec24, kargoyu oluşan vezikül içinde konsantre etmektedir (Miller vd. 2002). Bu bileşen bir veya daha fazla paraloglara sahiptirler, çünkü seçilen kopyaların işlev kaybı genellikle genetik hastalığa neden olmaktadır (Zanetti vd. 2012). Merte vd. 2010 ve Wansleben vd. 2010' da yaptıkları çalışmada Sec24B'deki iki ayrı erken durdurma kodununun farelerde büyük nöral tüp bozukluğuna yol açmaktadır. Bu bozukluğun sebebi ER' dan oluşan veziküller ile taşınan Vangl2 proteindir (Merte vd. 2010). Vangl2 proteini, nöral tüp kapanmasından hemen önce bir noktada birleşen uzantıyı düzenleyen, düzlemsel hücre

polaritesinin çekirdeğindeki bir bileşenidir (Bailly vd. 2018; Montcouquiol vd. 2003). Merte vd. 2010' da yaptıkları çalışma ile Vangl2 COPII veziküllerine in vitro girişinin paketlenmesini diğer Sec24 paralogları değil de rekombinant Sec24B varlığında özel olarak paklendiği göstermiştir. Sec24 çok yönlü bir proteindir, ancak bu durumda Sec24B'nin, diğer Sec24 paraloglarının varlığı ile telafi edilemeyen en az bir önemli kargo proteini için spesifik bağlanma aktivitesine sahip olduğu bu çalışma ile gösterilmektedir (Jensen ve Schekman 2011).

Bütün bu bilinenlere rağmen, hücre içi trafik konusu hala araştırılmakta olan tartışmalı bir konudur (Emr vd. 2009). Bunun yanında son yıllarda sinyal peptidine sahip olmadığı halde hücre dışına salgılanan proteinlerin var olduğu bulunmuş ve şu anda bu "olağandışı salgılama" (unconventional secretion) konusu üzerinde yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (Nickel ve Seedorf 2008; Nickel ve Rabouille 2018). COPII vezikül transportu hakkında da birçok bilinmeyen vardır ve bunlar hücre biyolojisi alanında cevaplanması gereken temel sorulardandır: Hangi proteinlerin hangi transport vezikülüne alınması ve hangi proteinlerin bu seçme işleminde rol aldığı tam olarak bilinmemektedir ve araştırılmaktadır. Ayrıca ER lümeninde kalıcı olan proteinlerin nasıl veziküllere alınmadığı da araştırma konusudur (Sato ve Nakano 2007).

Dünya çapında geniş uygulama alanları bulan, son yıllarda önemli biyoteknoloji araçlarından birisi haline gelen mikroalgler bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) Chlorophyceae (yeşil algler), sınıfında yer alan, ökaryotik hücre yapısına sahip tek hücreli bir mikroalg türüdür. *C. reinhardtii*, fototaksi, çiftleşme reaksiyonları ve gametogenez, organellerin biyogenezi, fotosentez, flagella birleşmesi ve fonksiyonu, sirkadiyen ritmi ve karbon, nitrojen ve sülfür metabolizması, gibi konularda moleküler biyolojinin ve genetiğin ayrıca biyoteknoloji çalışmalarının aydınlatılmasında kullanılmıştır. Hücre içi trafik günümüzde üzerinde en yoğun çalışılan hücre biyolojisi konuları arasındadır. Bu konu *C. reinhardtii* üzerinde hiç çalışılmamıştır. *C. reinhardtii* ideal bir model organizmadır ve birçok uygun özelliğinin bulunması esassından dolayı hücre içi trafik konusunda bu organizma ile çalışmanın birçok avantajları olacaktır. Bu alg türünün aşağıda belirtilen uygun özelliklerinden dolayı güvenilir bir model organizma olarak kullanılmaktadır (Rochaix, 1995). Bu özellikler; generasyon süresinin kısa olması, laboratuvar koşullarında kültürünün yapılmasının ucuz olması ve kolay şekilde yapılabilmesi, ökaryotik hücre tipine ve tek hücreli organizma yapısına sahip olması, fototrofik, heterotrofik hem de mikсотrofik olarak büyümesi, haploit kromozom yapısına sahip olması, çok sayıda farklı mutant suşlarının bulunması, eksojen DNA'nın, nükleer, kloroplast, mitokondri genomlarının üçüne de transfer edilebilmesi, virüs, prion gibi patojenleri içermemesi ve toksik olmaması, genetik analizlere uyumluluğu, tüm genom haritasının bilinmesi, erişilebilir EST tabanına sahip olması şeklinde sıralanabilir (Shimogawara vd. 1998; Merchant vd. 2007). Bu uygun özelliklerinden dolayı hücre içi trafik konusunu *C. reinhardtii* model olarak kullanılarak bu alanda hızlı veri elde etmek ve bu verilerin biyoteknoloji alanında uygulamaya geçirilmesidir. Elde edilen bu veriler hem temel bilimsel araştırmada birikime katkıda bulunacaktır. Örneğin rekombinant protein üretilmesi konularında bu proteinlerin sekresyonunda görev alan proteinlerin bilinmesi önemlidir. Ayrıca araştırmadan elde ettiğimiz veriler gelecekte sekretori yolak üzerine yapılan diğer çalışmalara da bilgi birikimi sağlayacaktır. Tez çalışması kapsamında çalıştığımız *C. reinhardtii*' de *SEC24B* geninin fonksiyonu üzerine deneysel çalışma bulunmamaktadır.

SEC24B üzerine yürütülen bu tez çalışması *C. reinhardtii*'de bir ilk olmuştur. Tez çalışması sonunda oluşturulan mutantların fenotipine, örnek olarak hücre dışına salgıladığı bazı proteinlere, bakarak SEC24B proteininin salgılama işlemindeki spesifik rolüne dair veriler üretildi. Bu veriler hücre içi trafik ve protein sekresyonu konularında bilgi birikimine katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Chlamydomonas reinhardtii*' nin Taksonomisi ve Hücresel Yapısı

Domain: Eukaryota

Alem: Plantae

Şube: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Chlamydomonales

Aile: Chlamydomonadaceae

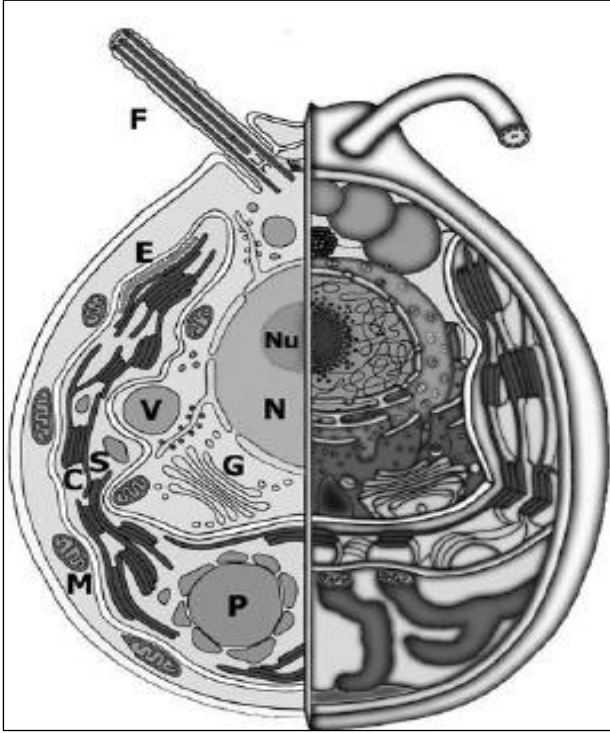
Cins: Chlamydomonas Ehrenberg

Tür: *Chlamydomonas reinhardtii*

Günümüze ait *C. reinhardtii* ana laboratuvar suşlarının, 1945'te Gilbert Morgan Smith tarafından Amherst, Massachusetts yakınlarındaki toplanan topraklardan elde edilen izolatlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Harris 2001). 20. yüzyılın ortalarında, tek hücreli ve genetik olarak izlenebilir, yeşil alg olan *C. reinhardtii* ilk olarak fotosentez, ışık algısı ve flagella yapısı, fonksiyonel ve biyolojik temel hücresel süreçleri aydınlatmak için örnek bir organizma olarak geliştirildi. *C. reinhardtii*, tek karbon kaynağı olarak asetati kullanması nedeniyle Chlamydomonas'ın baskın laboratuvar türü olarak kullanılmaktadır.

Hücre çeperi hidrokspirolin bakımından zengin glikoproteinlerden oluşmaktadır ve yedi ana katmana sahiptir (Harris 2001). Yabani tip *C. reinhardtii* hücresi, yaklaşık 10 µm uzunluğunda, genişliği ise 3 µm ve iki flagellaya sahiptir. Flagellalar, hücrenin apikal ucunun hemen altında bulunur ve hücre çekirdeğini kaplayan bir çift esas gövdeden oluşmaktadır (Harris 2001). Chlamydomonas, ökaryotik kamçı karakteristiğinin ve esas gövdenin (basal bodies) ve flagellanın oluşumunu ve işlevini araştıran 9 + 2 mikrotübül yapısına uygun bir sistem olduğunu kanıtlamıştır. Kamçı bu organizmada görülen eşeyli üreme için hayati önem taşır çünkü karşıt çiftleşme tiplerinin hücreleri arasında gerçekleşen tanıma ve füzyon işlemlerine aracılık eder. Hücreye hareketlilik kazandırır (Harris, 2001). Hipotonik koşullar altında, sitoplazmik su içeriği, hücrenin ön kısmına yerleştirilmiş kontraktıl vakuoller ile hücrenin dışına su pompalanarak korunur (Komsic-Buchmann vd. 2014).

Hücre hacminin %40'ına yakın bir yer kaplayan tek bir kloroplast ve birkaç küçük mitokondri içerir (Rochaix 1995). *C. reinhardtii*'nin kloroplast genomu 206 kb ve mitokondriyal genomu 15.8 kb 'dir (Vahrenholz vd. 1993; Maul vd. 2002; Gallaher vd. 2018). Hücre ekvatoruna yakın, kloroplastın kenarında, stigma bulunur. Stigma hücrelerin yüzmelerini ışığa veya ışığa doğru yönlendirmelerini sağlar (fototaksis) (Sasso vd. 2018). Pirenoide, kloroplast içeresinde yer alır ve CO₂ bağlanması ve fotosentezin karanlık reaksiyonun gerçekleştiği bölgedir (Harris 2001). *C. reinhardtii* hücre yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. *C. reinhardtii*' nin hücre yapısının gösterimi: **N:** Çekirdek; **Nu:** Çekirdekçik; **F:** Flajella; **C:** Kloroplast; **E:** Stigma; **P:** Pirenoid; **G:** Golgi kompleksi; **V:** Vakuol belirtmektedir (Nikelsen ve Kück 2000)

2.2. *C. reinhardtii*' nin Yaşam Döngüsü

C. reinhardtii, ortam şartlarına bağlı olarak hem vejetatif hem de generatif üreme yeteneğine sahiptir. İdeal büyüme şartlarında sadece mitozla çoğalır ancak besin yetersizliğinde ve azot eksikliğinde eşeyssel üremeye harekete geçer. Olumsuz koşullarda gamet oluşturma ve üremeye gitme eğilimindedir. Bu durum, olumsuz şartlara adaptasyon ve hayatta kalma şansını artırmaktadır. Zigot oluştuğunda hala olumsuz şartlar devam ediyorsa mayozla gitmeden dormant duruma geçerek kendini koruma altına almaktadır (Harris 2001; Goodenough vd. 2007). Optimum koşullar altında, *C. reinhardtii* o kadar hızlı büyür ki sayıları yaklaşık 8 saatte bir ikiye katlanabilir (Harris 2001). *C. reinhardtii* heterothallik ve izogamözdür. Diğer bir deyişle, çiftleşme tipi artı (*MT+*) veya eksi (*MT-*), bir hücre çizgisinde genetik olarak belirlenir, çaprazlarda tek bir mendel lokusu gibi davranır. Artı ve eksi gametler, boyut ve yüzeysel görünüm bakımından benzer olsa da ultrastrüktürel seviyede farklılık gösterebilmektedir (Harris vd. 2009). *C. reinhardtii* hücreleri haploittir. Haploid gametlerin füzyonu, birkaç gün boyunca oldukça dirençli, hareketsiz zigosporlara dönüşebilen diploid zigotlarla sonuçlanır. Şekil 2.1' de görüldüğü gibi ortama azot eklendiğinde, zigotlar ışıkta çimlenir, mayoz ile bölünür ve tipik olarak vejetatif büyümeye devam eden dört haploid hücre oluşur (Harris, 2001). *C. reinhardtii*' nin eşeyli üreme döngüsü aşağıdaki aşamalardan oluşur;

- a) Gametogenez
- b) Aglütinasyon

- c) Çift oluşumu ve sinyal iletimi
- d) Hücre duvarı lizisi
- e) Birleşme yapılarının aktivasyonu
- f) Hücre füzyonu
- g) Zigospor oluşumu, olgunlaşması ve çimlenmesi (Harris vd. 2009).

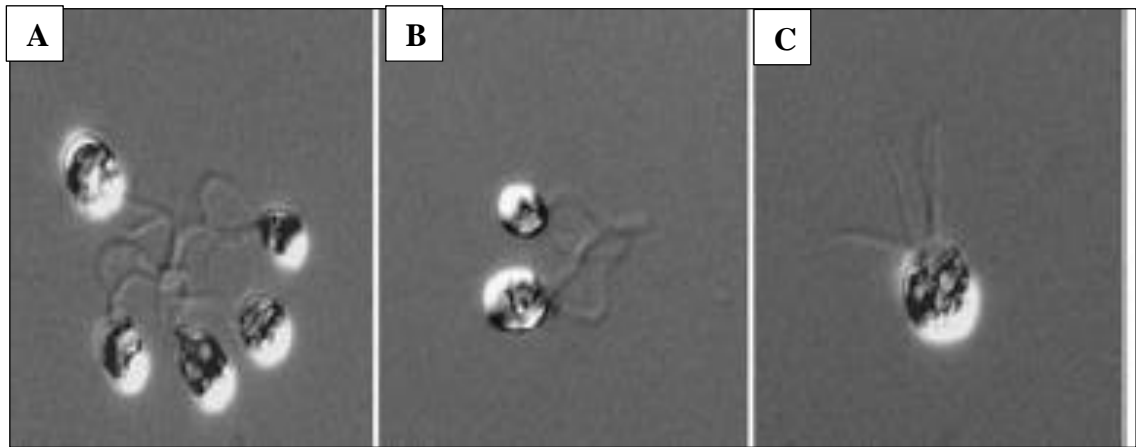
2.2.1. *C. reinhardtii*' nin Üreme Döngüsü Aşamaları

a) Gametogenez

Alglerdeki gametogenez genellikle olumsuz çevresel koşullarda oluşur. Laboratuvar da genellikle hücrelerin azot içermeyen ortama aktarılmasıyla belirli ışık koşulları uyarılmasıyla oluşturulmaktadır. Azot ortama geri eklendiğinde, zigotlar ışıkta filizlenir, mayoz geçirir ve tipik olarak vejetatif büyümeye devam eden dört haploid hücre oluşturur (Harris, 2001). Işığın *C. reinhardtii*' nin gametogenezini kolaylaştırdığı, ancak ortamdaki azot tükenmesinin fotosentetik hızın ikincil etkisine bağlı olabildiği ve asetat ortamında karanlıkta yetişen hücreler de azot besin elementi yetersizliğinde bırakıldığında eşeyli üremeye gitmektedir (Sager ve Granick 1954).

b) Aglutinasyon

C. reinhardtii'nin artı ve eksi gametleri karıştırıldığında, hücrelerin kamçı aracılığı ile hemen ilk teması oluşur. İlk temaslarda ortaya çıkan zayıf yapışma, kamçı uzunluğunun herhangi bir yerinde olabilir ve tek bir gamet karşıt çiftleşme tipinin birden fazla hücrelerine yapışabilir. Böylece gamet grupları oluşur (Harris vd.2009) Şekil 2.2'de gösterilmektedir. Aglutinasyon reaksiyonu gametlere özgüdür; aktif moleküller (aglutininler) hücre gövdesinin plazma membranındaki bir rezervuardan gamet kamçısı üzerine taşınır. (Hunnicutt vd. 1990). Aglutininler vejetatif hücrelerin kamçısında bulunmamaktadır. Aglutininler, hidrokspirolin bakımından zengin glikoproteinlerdir (Harris vd. 2009).



Şekil 2.2. *C. reinhardtii*' de zigot oluşum aşamaları; **A:** Gamet gruplarında ki aglutinasyon; **B:** Gametlerde çift oluşumu; **C:** Quadriflagella (Zigot) oluşumu (Wang ve Snell 2003)

c) Çift oluşumu ve sinyal iletimi

Füzyona yol açan diğer tüm morfolojik ve fizyolojik değişikliklerden önce aglütinasyon başladıktan 20 saniye sonra dibutiril cAMP'nın (Dibutiril siklik Adensin mono fosfat) bir artış görülür. Pasquale ve Goodenough (1987) yaptıkları çalışmaları ile eksojen dibutiril cAMP'nın spesifik olarak üç aglütinasyon yanıtını indüklediğini gösterir ve bunlar; kamçı ucu aktivasyonu, hücre duvarlarının kaybı ve çiftleşme yapısının aktivasyonudur. *C. reinhardtii*'de aglütinasyon kamçı uçlarında bazı değişikliğe neden olur; kamçı uçları genişler, dokuz mikrotübül ile terminal membranı arasında belirli bir bölgede bazı maddeler birikir. Uç aktivasyonu, füzyona yol açan diğer morfolojik ve fizyolojik değişiklikleri de yapabilir. Crabbendam vd. (1984), *C. reinhardtii* normal uç morfolojisinin hücre füzyonundan sonra dört kamçılı hücre (kuadriflagellat) aşamasında geri oluştuğunu göstermiştir. Uç kilitleme gerçekleştikçe, (As tip locking occurs) hücre çiftleri gruptan ayrılır ve hücre füzyonuna yol açan sonraki adımlara başlanır. Bu aşamada, gamet hücre duvarlarının dökülmesine ve eşleşen yapıların aktivasyonuna yol açan sinyal iletilir (Harris vd. 2009).

d) Hücre duvarı lizisi

Normal çiftleşme seyri sırasında, hücre duvarı lizisi *C. reinhardtii*'de kamçı uç aktivasyonu ile tetiklenen cAMP aracılı olaylardan biridir. Gamet, litik enzimi bir metaloproteinazdır (Buchanan ve Snell 1988) ve mitozdan sonra vejetatif hücreleri serbest bırakan enzimden tamamen farklıdır. Hem vejetatif hem de gametik hücreler üzerine etki edebilir, ancak zigospor duvarlarında etkili değildir (Claes 1971). Yabani tip hücrelerde litik enzimi, hücre duvarının altındaki periplazmik boşlukta aktif olmayan bir öncü protein olarak depolanır (Harris vd. 2009). Duvar parçalanması, *C. reinhardtii*'de gametogenez sırasında da meydana gelebilir ve hücre duvarı eksikliği olan mutantlar normal olarak çiftleşir.

e) Çiftleşme yapılarının aktivasyonu

Friedmann vd. (1968) *C. reinhardtii*'nin çiftleşme gametlerini bağlanmasını döllenme tübülünün sağladığını yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir. 1975'te üç laboratuvar bağımsız olarak artı hücrelerin apikal bölgesinden bu yapının oluşumunu gösteren çalışmaları yayınladı (Cavalier-Smith 1975; Goodenough ve Weiss 1975; Triemer ve Brown 1975b). Bu oluşumda ilk durum, elektron yoğun membran bölgesinin altta yatan çift bölgeden ayrılmasıyla bir tomurcuk oluşumudur. Aktivasyonun ikinci aşamasında, mikrofilamentlerin büyüyen tübüle yayıldığı görülmektedir. Füzyon ilerledikçe, çift bölge plazma zarından ayrılır ve sitoplazmada serbest kalır ve mikrofilamentler eksi hücrenin çekirdeğine uzanır gibi görünür.

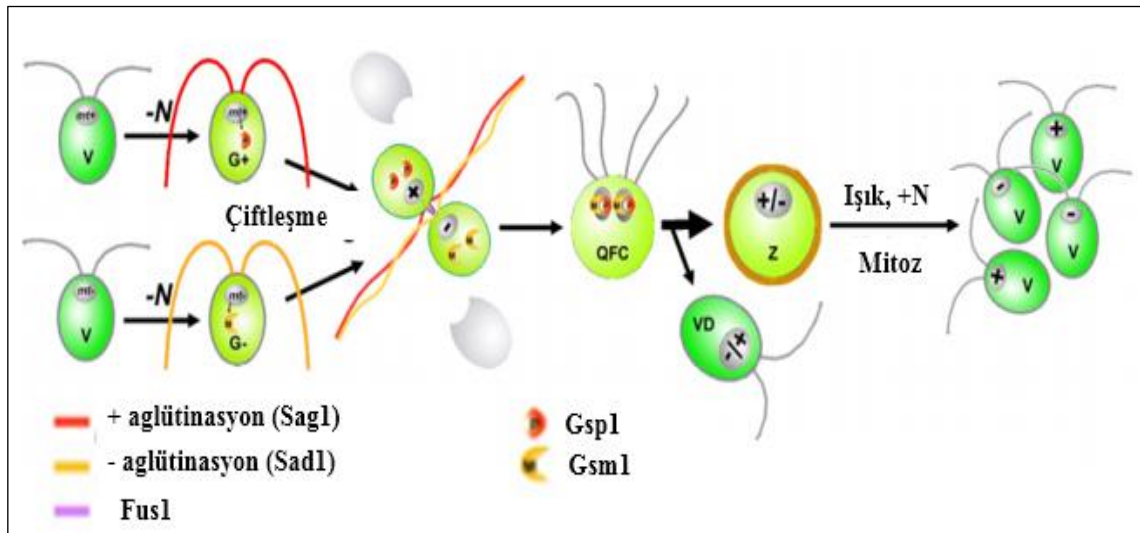
f) Hücre füzyonu

C. reinhardtii'de döllenme tübülünün ve eksi çiftleşme yapısına yapışması ve füzyonu meydana geldiğinde, tübül hızla kısalır ve iki hücrenin apikal uçlarını bir araya getirir (Friedmann vd. 1968). Nükleer füzyon, *C. reinhardtii*'de kloroplast füzyonundan önce gelir (Harris vd. 2009). Çiftleşme yapılarının aktivasyonundan hemen sonra, iki gamet arasında sitoplazmik süreklilik sağlamak için kaynaşmalar ve iki hücre bir dört

kamçılı hücre (QFC) oluşturarak birleşir. Füzyon gerçekleştikten sonra QFC (quadriflagellat hücre ya da planozigot) olarak adlandırılan dört kamçılı yapı oluşur. Bazen QFC'ler mayoz geçirmeden ve bunun yerine +/- vejetatif diploidler olarak vejetatif büyümeye devam eder (Goodenough vd. 2007) Gamet füzyonunu takiben, bir çift homedomain transkripsiyon faktörü, zigot gelişimi için genetik programı başlatır (Lee vd. 2008).

g) Zigospor oluşumu, olgunlaşması ve çimlenmesi

Zigota özgü polipeptitler, QFC aşamasından başlayarak sentezlenir (Minami ve Goodenough 1978; Weeks ve Collis 1979). Zigospor gelişiminin başlatılması, bir heterodimer oluşturan artı-spesifik GSP1 ve eksi-spesifik GSM1 homeodomain proteinlerinin kontrolü altındadır. Düşük büyümede bir zigospor kütleli sıvı ortamın yüzeyinde retikülat bir tabaka (pelet) olarak görülür (Harris vd. 2009). Bu karakteristik yapının gözlemlenmesi çiftleşmeyi doğrular ve çiftleşme tipi testlerinin temeli olarak kullanılır. *C. reinhardtii* zigospor çiftleşmeden sonraki 24 saat içinde hacim olarak büyük ölçüde artar. Zigospor olgunlaşmasının sonraki 4-6 günü boyunca, kloroplastlar parçalanır, klorofil kaybolur ve turuncu lipid depolama granülleri biriktirilir.



Şekil 2.3. *C. reinhardtii*'nin eşeyli üremesinin döngüsü; **V**: İki çiftleşme tipinden (MT^+ ve MT^-) oluşan haploid vejetatif hücre; **G⁺** ve **G⁻**: çiftleşme türüne özgü gametik özellikleri ifade eden gametler; **Sad1** ve **Sag1**: flagellar yüzeyde görüntülenen artı (Sag1) ve eksi (Sad1) aglütininler; **Gsp1** ve **Gsm1**: zigot gelişimi için önemli olan transkripsiyon faktörlerini kodlayan homeoproteinler; **VD**: vejetatif diploid hücre; **FUS1**: gamet çiftleşme tipi tanıma için kritik olan glikoproteinleri kodlamakta

2.3. COPII Vezikül Oluşumu ve Taşınımı

COPII ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de tanımlanmıştır ancak temel işlevi tüm ökaryotlar boyunca korunmaktadır (Zanetti vd. 2012). Sekretuar proteinlerin, membran proteinlerinin ve lipitlerin büyük çoğunluğu endoplazmik retikulum (ER) bağlı ribozomlarda sentezlenir ve ER'den çıktıklarında COPII ile kılıflı taşıma veziküllerine paketlenir (Lu ve Kim 2020). Sekretori yolaktaki bulunan proteinler ER'a

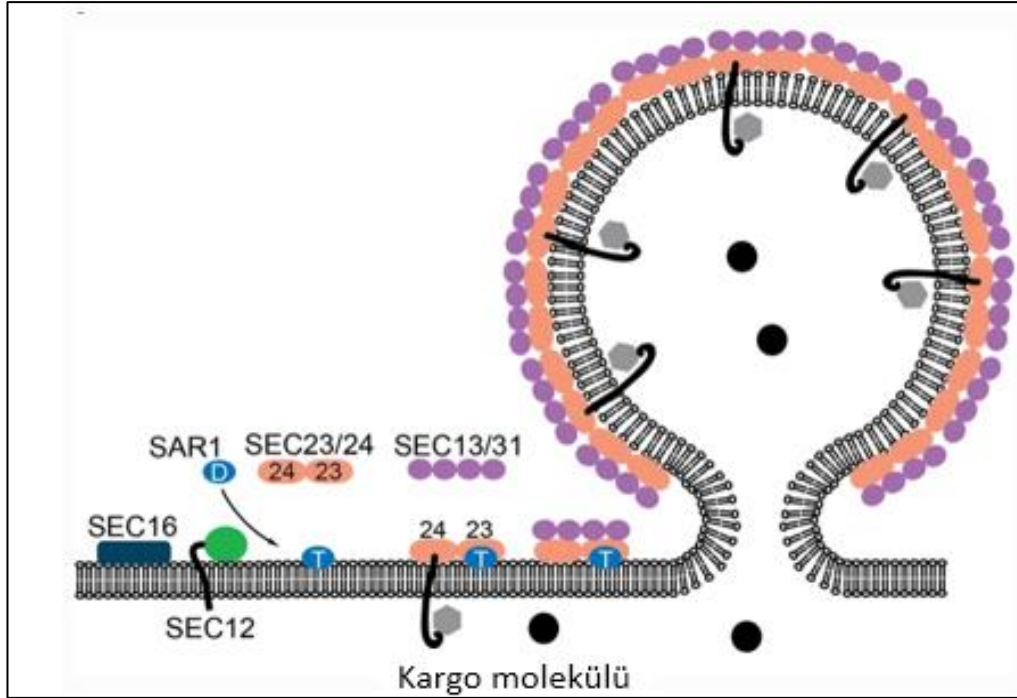
bağlı ribozomlarda sentezleri sırasında ER'a transfer edilirler (co-translational import) ve daha sonra Golgi kompleksinden geçerek vakuol/lizozoma transport edilmekte veya veziküller aracılığıyla hücre membranına taşınmakta veya hücre dışına salgılanmaktadırlar. Sekretori yolakta bulunan proteinlerde ER'a transferlerini sağlayan signal peptidi bulunmaktadır. Signal peptidi genellikle proteinlerin N-terminalinde bulunmaktadır ve sitozolda bulunan signal recognition particle (SRP) tarafından tanınarak ve SRP'nin ER üzerinde bulunan SRP reseptörüne bağlanmasıyla proteinlerin ER'a transferlerini sağlamaktadır (Walter ve Blobel 1982; Walter vd. 1984).

Hücre içi endo-membran sistemi içinde (ER, Golgi, nüklear envelop, vakuol/lizozom, sekretori vezikül ve hücre membranı) kalacak olan proteinler ER lümenine transfer olmakta, sistemin membranlarında lokalize olacak proteinler ise ER membranına entegre olmaktadır. ER' da proteinlerin şaperonlar vasıtasıyla 3D konformasyonlarını alması, multiprotein komplekslerine asembli olması ve glikozilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonları yapılmaktadır. Proteinler kalite kontrolü yapıldıktan sonra COPII kılıf vezikülleri aracılığıyla hedef organelere transfer edilmektedir.

COPII kılıf veziküllerin oluştuğu ve tomurcuklandığı bölge ER membranı üzerinde bulunan ER-çıkış bölgesi (ERES) veya transitional ER (tER) olarak da bilinen bölgedir. (Orci vd. 1991; Bannykh vd. 1996). COPII bileşenleri; Sec23-Sec24 kompleksi, Sec13–Sec31 kompleksi ve küçük GTPaz olan Sar1 ER çıkış bölgesinde kademeli olarak toplanır (Barlowe vd. 1994; Jensen ve Schekman 2011). Sar1, ER membranına alınan ilk COPII bileşenidir. Ayrıca vezikül oluşum sürecini başlatır (Jensen ve Schekman 2011). Sar1 aktivitesi, diğer küçük G proteinlerine benzer şekilde, bağlı olduğu nükleotidin durumu tarafından kontrol edilen küçük bir GTPazdır (Pucadyil ve Schmid 2009). GDP bağlı durumundaki Sar1 sitozolda dormant halindedir, ancak GTP bağlandığında Sar1, ER membranına gömülen amfipatik bir N-terminal α -sarmalını açığa çıkararak aktive olur (Lee ve Miller 2007; Bielli vd. 2005). Bu aktivite ER membranı ile sınırlıdır, çünkü Sar1'ni aktive eden guanin nükleotit değişim faktörü (GEF) olan Sec12 sadece ER'de bulunur (Weissman vd. 2001). N-terminal sarmalının ER membranına sokulması, Sec23-24 heterodimerinin toplanmasının yanı sıra başlangıç kavislenmesini indükler (Matsuoka vd. 1988; Antony vd. 1997). Sec23 ve Sec24, membrana temas eden ve kavislenmenin başlamasına katkıda bulunabilecek temel içbükey bir yüzey içeren papyon şeklinde bir kompleks oluşturur (Bi vd. 2002). Bi vd. 2002' de yaptıkları ile Sar1, Sec23 kompleksinin yapısındaki katalitik bölgede yer alan bir "arginin parmağı" bağlanarak Sar1'in doğal yavaş GTPaz aktivitesini uyarabileceğini göstermektedir. Sar1 – Sec23–24 ve kargo arasındaki kompleks, membran kavislenmesini devam ederken, Sec13–31 heterotetrameri tarafından yakalanır. Sec13–31 heterotetrameri, ER membranından vezikül füzyonunu destekleyen bir dış kılıf tabakasını oluşturur (Fath vd. 2007; Matsuoka vd. 2001). Ayrıca vezikül füzyonu için gerekli olan Sar1 GTP hidrolizi (Lee vd. 2005) , Sec23 tarafından GTPaz aktive edici protein (GAP) uyarılır ve Sec31 tarafından daha da hızlandırılır (Antony vd. 2001). SEC16, ER'nin periferik (peripheral) bir membran proteinidir ve SEC23'ün GAP aktivitesi üzerindeki SEC31 etkisini düzenler (Kung vd. 2011).

Sec16, ERES' teki ER membranının sitoplazmik yüzüyle ilişkili esas bir proteindir (Espenshade vd. 1995; Connerly vd. 2005). Sec16 tüm kılıf proteinleri ile etkileşime girer (Gimeno vd. 1996; Shaywitz vd. 1997) ve bu özelliğinden dolayı kılıf birleşmesini veya iskelet yapısını organize ettiği düşünülmektedir (Supek vd. 2002; Shindiapina ve Barlowe

2010). Membranda bir araya gelen kılıf proteinleri bir araya toplanarak sepet benzeri bir yapı oluşturur ve membranın bu bölgedeki yapısını bozarak membranda bir tomurcuklanma oluşur Şekil 2.4' de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. COPII vezikül oluşumu (Lu ve Kim 2020)

Vezikülün sitozole transferinden hemen sonra kılıf sıyrılır. Bu görevi yine kılıf oluşturucu GTPaz olan Sar 1 tarafından başlatılır. Sar1 üzerinde bağlı olan GTP'nin hidrolizi ile konformasyon değiştirerek, kendisini vezikül membranına bağlayan yağ asidini geri çeker ve vezikülden ayrılır. Bu proteinin vezikülden ayrılmasının hemen ardından kılıf depolimerize olur ve vezikül kılıfından sıyrılır (Rothman 1994; Rothman ve Wieland 1996) . Kılıf depolimerizasyonu üzerine, COPII proteinleri ER'a geri döner ve yeni bir kargo ihracatına hazır hale gelir (Forster vd. 2006).

COPII veziküllerin cis-Golgi membranları ile füzyonu, bir dizi membran bağlı SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) attachment protein receptor) proteinine bağlıdır (Barlowe ve Miller 2013). Vezikülün doğru hedef membranı bulmasını SNARE proteinleri tarafından gerçekleştirilir (Söllner vd. 1993; Rothman 1994). Vezikülün doğru hedef membranı transferinde vezikülün içindeki bir integral protein (v-SNARE) ile, onunla özgül olarak etkileşebilen bir hedef membran integral proteini (t-SNARE) arasındaki yüksek çekim ve spesifik etkileşim, veziküllerin hedeflerini bulmasını sağlamaktadır. SNARE'ler sitoplazma içine giren ve reseptör olarak işlevi bulunan integral proteinlerdir.

Yapılan bazı çalışmalar ile *Saccharomyces cerevisiae*'de SNARE proteinleri Sed5, Bos1, Bet1 ve Sec22'nin membran füzyon olayını katalize ettiğini göstermektedir (Newman vd. 1990; Hardwick ve Pelham 1992; Sogaard vd. 1994; Cao ve Barlowe 2000).

Veziküllerin doğru yere transferinde etkin olduğu varsayılan bir protein grubu da Rab proteinleridir. Taşıyıcı veziküller ile hedef zar arasındaki ilk etkileşim bağlayıcı faktörler ve küçük GTP bağlayan proteinler Rab proteinleri ile düzenlenir. (Stenmark 2009). Vezikül membranına tutunan Rab proteinleri hedef membran üzerindeki bir efektör proteinle ve SNARE'ler ile spesifik olarak etkileşerek SNARE kompleksinin (v-SNARE/t-SNARE kompleksi) oluşmasını sağlar. Böylece vezikül doğru membrana transfer olur (Rothman ve Wieland 1996). Rab proteinleri, vezikül tomurcuklanması sırasında bazı bağlayıcı proteinleri (tethering proteins) SNARE kompleksi içine ekledikleri, ER → Golgi vezikül taşımında gerçekleştirilmektedir.

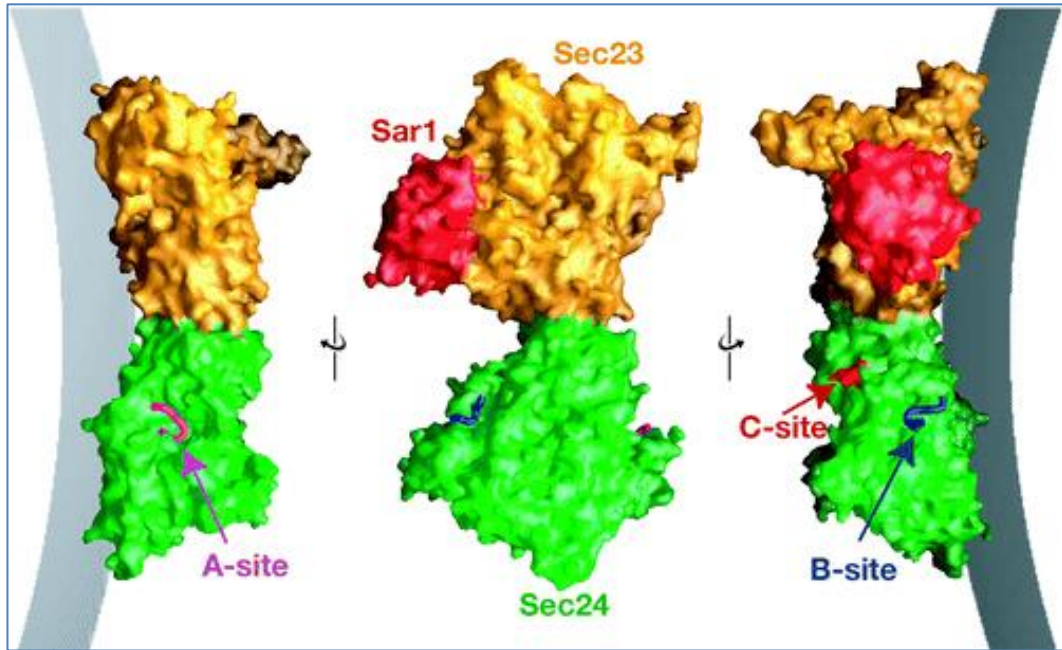
Bağlayıcı proteinler vezikülün hedef membrana yanaşması ve kaynaşması sırasında görev yapar. Yani daha vezikül tomurcuklanırken; hedef bulma ve kaynaşma için gerekli moleküler program vezikül içine yerleştirilmektedir (Brittle ve Walters 2000). Hedef ve vezikül membranda bulunan SNARE'ler, hidrofobik etkileşimlerle ve birbirlerine paralel yerleşerek "halkalı halka" (coiled coil) oluşturarak membranlar yanaşır (Hardwick ve Pelham 1992; Sutton vd. 1998). Membrana yanaşma anında, vezikül ve hedef membranın molekülleri, birbirleri ile etkileşim oluşabilecek kadar yakındır. Membranların kaynaşması esnasında, membranların 1.5 nm kadar yakınlaşmaları ve aradaki su moleküllerinin bırakılması gerekir. Bu fiziksel yakınlaşmayı oluşturan SNARE'ler sarmal oluşturacak şekilde bağlanması ile membranları çekmesidir ve böylece membranların kaynaşmasını sağlar (Rothman 1994).

2.4. Sec24 Proteini

Sec24, ER membranında bulunan kargo proteinine bağlanmadan sorumlu birincil COPII alt bileşeni olarak kabul edilmektedir (Matsuoka vd. 1998). Diğer bir başka görevi ise Sec24, kargoyu oluşan vezikül içinde konsantre etmektedir (Miller vd. 2002). Birçok kargo proteininin sitoplazmik alanlardan COPII taşınması için belirlenmesi için spesifik export (dışarıya taşıma) sinyali dizileri vardır (Jensen ve Schekman 2011). Bu taşıma sinyallerinin tümü, kargo molekülünün polipeptit zincirinde yuvalanmış kısa (10-15 kalıntı) dizilerdir ve bu açıdan endositik sinyallere oldukça benzerdir (Bonifacino ve Glick 2004). COPII sinyal dizilerinin tipleri, di-hidrofobik, di-asidik, C- terminali hidrofobik ve aromatik motifleri içerir (Wendeler vd 2007; Barlowe 2003). Bir dizi kargo bağlayıcı bölge ve bağlandıkları karşılık gelen sinyal dizileri Sec24 yüzeyinde tespit edilmiştir ve bu bölgeler (siteler) A, B ve C olarak adlandırılmıştır ve Şekil 2.5'de görüntüleri mevcuttur (Miller vd. 2003). Ayrıca ER'da ayrılması gereken tüm proteinler Sec24'e doğrudan bağlanmak için bir sinyal dizisi içermez. Bazı proteinler bir taşıma adaptörüyle etkileşime girebilir ve dolaylı bir etkileşim yoluyla COPII vezikülüne dahil edilebilir (Baines ve Zhang, 2007).

Sec24'de bulunan iki site (bölge), farklı sıralama sinyallerini tanıyan bağımsız kargo bağlayıcı alanlar oluşturur (Lee vd. 2004). Bu siteler; A ve B site bölgeleridir. A site (bölgesi), SNARE bir protein olan Sed5 üzerindeki iki bağlanma motifinden biri olan YNNSNPF içeren bir peptid ile etkileşime girer. B site (bölgesi), iki farklı peptid olan Golgi proteini Sys1'in (Votsmeier ve Gallwitz 2001) diasidik sıralama sinyalini ve SNARE bir protein olan Bet1'in LXXLE motifi üzerinde bulunan sinyali tanıyarak (Lee vd. 2004). Aynı elektrostatik etkileşimler hem Sys1 hem de Bet1 motiflerinin bağlanmasında yer almakla birlikte, iki peptid çok farklı konformasyonlar gösterir (Mossessova vd.

2003). Sec24'teki iki site (bölge), farklı sıralama sinyallerini tanıyan bağımsız kargo bağlayıcı alanlar oluşturur (Lee vd. 2004).



Şekil 2.5. Sar1-Sec23-Sec24 kompleksinin yapısı; Sar1 kırmızı, Sec23 sarı ve Sec24 yeşil olarak gösterilir; Üç kompleksin arka arkaya 90° rotasyonunu gösterilir; Sec24'te, ER taşıma sinyallerini kapsayan peptitler; A bölgesi pembe ve B bölgesine mavi olarak gösterilir ve C bölgesindeki kritik arginin, kırmızı ile gösterilir (Lee vd. 2004)

Sec24'teki kargo bağlama alanlarının çokluğu (siteler), COPII kılıfı tarafından tanınan kargo repertuarını genişleten Sec24 homologlarının varlığı ile COPII alt birimleri üzerindeki ek kargo tanıma alanları için potansiyel, yerleştirilebilecek kargo substratlarının çeşitliliğini göstermektedir. Çizelge 2.1' de bazı organizmalarda bulunan Sec24 homologları gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı organizmalarda bulunan Sec24 homologları

Organizma Adı	Homologları	Veri Kaynağı
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>CrSEC24B</i> <i>CrSEC24A</i>	Phytozome
<i>Mus musculus</i>	<i>MmSec24A</i> <i>MmSec24B</i> <i>MmSec24C</i> <i>MmSec24D</i>	Adams vd.2014

Çizelge 2.1'nin devamı

<i>Homo sapiens</i>	HsSec24A HsSec24B HsSec24C HsSec24D	Jensen ve Schekman 2011
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScSec24p Lst1p (Sfb3p) Iss1p (Sfb2p)	Miller vd. 2003
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtSec24A AtSec24B (CEF) AtSec24C	Tanaka vd. 2013
<i>Volvox carteri</i>	VcSec24	Phytozome

2.5. Diğer Organizmalarda *Sec24* ve *Sec24B* Genleri Üzerine Yapılan Önceki Çalışmalar

Tanaka vd. 2013'te *Arabidopsis thaliana*'da yaptıkları çalışmada *AtSec24B* ve *AtSec24C* genlerinin nakavt edilmesi sonucunda bitkide polen çimlenmesinin azaltılması ile birlikte erkek kısırılığına neden olduğunu gösterdi. *AtSec24B* ve *AtSec24C* ekspresyonunda belirgin azalma *A. thaliana*'da erkek ve dişi gametogenezi etkilemiştir. Bu çalışma sonucunda *AtSec24B* ve *AtSec24C*'nin fonksiyonunun bitki üreme hücrelerinin gelişimi için çok önemli olduğu gösterilmiştir. *A. thaliana*'da yapılan bir diğer çalışmada ise *AtSec24A* proteininin işlevinin kaybı, mutant alelin erkek gametofit yoluyla kusurlu iletimini indükler ve polen çimlenmesinin azaltılmasına yol açar. (Conger ve ark. 2011). Bu iki sonuç karşılaştırıldığında, polen çimlenmesindeki kusurun derecesi *AtSec24A* ve *AtSec24B*'yi bozan mutantlar arasında farklılık göstermektedir (Tanaka vd. 2013). *AtSec24A* ve *AtSec24B* mutantlarının mikrosporların mikrodizi analizinde *AtSec24A* ekspresyonunun zirvesinin *AtSec24B*'den daha önce görüldüğünü gösterilmektedir (Conger ve ark. 2011). Bu nedenle, *AtSec24A* ve *AtSec24B*, polen gelişiminde yer alan hücrel olaylar için gerekli proteinlerin taşınmasında kısmen farklı bir rol aldığı düşünülmektedir (Tanaka vd. 2013).

Merte vd. (2010) ve Wansleben vd. (2010) tarafından *Mus musculus*'da, yapılan çalışmalarla *Sec24B*'deki iki ayrı erken durdurma kodonunun farelerde büyük nöral tüp bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir. Bu bozukluğun nedeni COPII vezikülleri ile taşınan Vangl2 proteindir (Merte vd. 2010). Vangl2 proteini, nöral tüp kapanmasından hemen önce bir noktada birleşen uzantıyı düzenlemektedir (Bailly vd. 2018; Montcouquiol vd. 2003). Merte vd. 2010' da yaptıkları çalışma ile Vangl2 COPII veziküllerine in vitro girişinin paketlenmesini sadece *Sec24B* proteininin varlığında özel olarak paketlendiği göstermiştir.

Zebra balığı bulldog mutasyonları *sec24d* geninde bulunur (Sarmah vd. 2010). Bulldog mutasyonları ya erken durdurma kodonu ya da çerçeve kayması sonucu ile oluşur. *sec24d* tüm embriyo boyunca eksprese edilir, ancak zebra balığında kraniyofasiyal kıkırdakta belirgin olarak bulunur. Sec24d mutasyona uğratılmış balıklarda kıkırdak matris proteinlerinin salgılanması engellenir, bu da kıkırdak oluşumunda sorunlara ve ciddi iskelet anormalliklerine yol açar (Ohisa vd. 2010; Sarmah vd. 2010). *sec24d* inaktivasyonu ayrıca kollajen biyosentezinin uyarılmasına yol açar ve BiP, Sil1 (BiP için ko-chaperone) seviyeleri yaklaşık beş kat artar ve Hsp47 önemli ölçüde yükseldiğinden kıkırdak hücrelerindeki ER stresini tetikler (Sarmah ve ark. 2010).

Adams vd. 2014' de *Mus musculus*' da yaptıkları bir çalışma ile SEC24D'de tamamen nakavt olan farelerde erken embriyonik ölümler gözlenmektedir. Bu sonuçlar, diğer üç Sec24 paralog tarafından telafi edilmeyen erken memeli gelişiminde SEC24D ekspresyonu için mutlak bir gerekli olduğunu bulunmuştur.

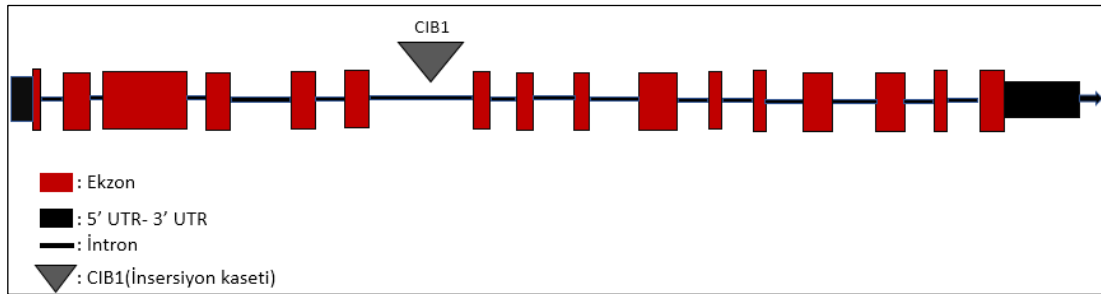
Mus musculus' da yapılan diğer bir çalışma ise Sec24C' nin serotonin (SERT) proteini taşınımında görev aldığı bulunmuştur. Kısa hızlandırıcı polimorfizm SERT hücre yüzeyi seviyelerinin düşmesine neden olur ve etkilenen bireyleri depresyona daha duyarlı hale getirir. Sonuç olarak Sec24C genindeki varyasyonlar SERT hücresi yüzey seviyelerini de etkileyebilir ve dolayısıyla duygu durum bozukluklarına yol açabilir (Sucic vd. 2011).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Alg Kültürü

Çalışmada Chlamydomonas Resource Center'ın (Minnesota Üniversitesi, 140 Gortner Laboratuvarı, ABD) CLIP koleksiyonundan temin edilen *sec24b* mutant suşu kullanılmıştır. *sec24b* mutant suşu CC5325 suşundan insersiyonel mutagenез yöntemiyle yapılmıştır (Li vd. 2019)

Şekil 3.1' de gösterildiği gibi *C. reinhardtii sec24b* mutant suşundaki insersiyon kaseti kromozom 1' deki *SEC24B* geninin altıncı intronunda bulunmaktadır.



Şekil 3.1. *C. reinhardtii* *SEC24B* geni ve insersiyon haritası

Tez çalışması için kullanılan cihazlar Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü'nün araştırma laboratuvarı imkanlarıyla gerçekleştirilmiştir. Kullanılan cihaz ve ekipmanların bilgileri ve kullanım amaçları Çizelge 3.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Cihaz listesi ve kullanım amaçları

Cihaz	Modeli	Kullanım Amaçları
Santrifüj	Isolab / FY2405000	DNA ve RNA izolasyonu aşamalarında örneklerin çöktürülmesini sağlamak
Hassas terazi	KERNPLJ / 700-3CM	Besi yeri ve solüsyonların hazırlanmasındaki sarf malzemelerin tartılması
Otoklav	Autoclave / 23X-500E	Besi yeri ve kullanılan ekipmanların sterilizasyonu
Mikro Dalga	Vestel / MD 20 DB	Agaroz jellin hazırlanmasında

Çizelge 3.1' in devamı

Işık Mikroskobu	Primovert Zeiss	Hücre sayımı, eşeyli üreme döngüsünün izlenmesi
Binoküler mikroskop	Euromex	Tetrat Analizi
Nano Drop	Thermo Scientific, Waltham, MA)	RNA örneklerinin kalitatif tayininde
Vorteks	DragonLab / MX-S	DNA ve RNA izolasyonunda sırasında tüplerin karıştırılması
Elektroforez sistemi	Fisher Scientific /CS-300V	DNA ve RNA'nın boyutlarının belirlenmesinde, PZR ve RT PZR ürünlerinin tespit edilmesi
Jel görüntüleme	Minilumi, DNR Bio-Imaging Systems	DNA ve RNA izolasyonun, PZR ve RT ürünlerinin jelde görüntülenmesi ve bilgisayar ortamına aktarılması
Laminar Flow	Tez San / 14-1490	Besi yeri dökümü ve suşların ekimi
PZR	BIO-RAD / T100	Gen bölgelerinin çoğaltılması

3.2. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Antibiyotik: 100 mg antibiyotik (paromomisin) hassas terazide tartıldı ve son hacim 10 ml olacak şekilde ddH₂O ile 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 0,22 µm' lik (İsolab) filtre yardımıyla sterilize edildi. Stok olarak bölünerek daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edildi.

Fosfat Tamponu II (100 ml): Hassas terazide K₂HPO₄²⁻ dan 10.8 g ve KH₂PO₄ ise 5.6 g tartılarak son hacim 100 ml olacak şekilde dH₂O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Besi yeri 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

Solüsyon A (500 ml): Hassas terazide NH₄Cl'den 20 g, MgSO₄.7H₂O' dan 5 g ve CaCl₂.2H₂O' den 2.5 g tartılarak 500 ml olacak şekilde dH₂O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Besi yeri 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

N-free (Azot içermeyen) Beijerinck (1 L): Hassas terazide, MgSO₄.7H₂O' dan 2 g ve CaCl₂.2H₂O' den 1 g tartılarak 1L olacak şekilde dH₂O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Besi yeri 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır.

Minimal için Fosfat Tamponu (1 L): Hassas terazide K_2HPO_4 ' dan 14,34 g ve KH_2PO_4 ' den 7,26 g tartılarak 1L olacak şekilde dH_2O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Besi yeri 15 dakika $121^\circ C$ 'de otoklavlanmıştır.

-S Beijerinck (1 L): Hassas terazide NH_4Cl ' den 8 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 'den 1 g ve $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ' den 1,6 g tartılarak 1 L olacak şekilde dH_2O eklenmiştir ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. Besi yeri 15 dakika $121^\circ C$ 'de otoklavlanmıştır.

1M Tris-HCl (250 ml): 30,27 g Tris tartıldı, 200 ml distile su ile çözdürüldü. HCl ile pH 7,5 değerine ayarlandı ve dH_2O su ile hacim 250 L tamamlandı. Solüsyon 15 dakika $121^\circ C$ 'de otoklavlanmıştır.

0.5M EDTA (250 ml): $EDTA \cdot 2Na \cdot 2H_2O$ 'den 46.5 g tartıldı ve 150 ml distile su ile çözdürüldü. NaOH ile pH'sı 8 değerine ayarlandı ve dH_2O ile hacim 250 ml ayarlandı.

TAE tamponu (50X): Hassas terazide 242 g Tris tartıldı. 57.1 ml Asetik Asit ve 100 ml 0.5M EDTA (pH:8) eklendi. dH_2O ile 1 L tamamlandı ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırıldı.

TAE tamponu (1X): 20 ml 50X TAE stok çözeltisinden alınarak 980 ml distile su 1L tamamlandı.

-XPO₄ (10 mM): 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfataz 'dan 0.033704 g tartılarak dH_2O ile son hacim 10 ml olacak şekilde tamamlandı ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırıldı.

-XSO₄ (10 mM): 5-bromo-4-kloro-3-indolil sülfataz' dan 0.01823 g tartılarak üzerine Tris Cl' den (0,1M pH: 7,5) 500 μ l eklenmiştir. Daha sonra dH_2O ile hacim 5 ml olacak şekilde tamamlandı ve solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırıldı.

Primerler (100 μ M): Öncelikle primerler üretici firmanın direktiflerine uyularak DNase RNase-free su kullanılarak 100 μ M'a sulandırıldı. Daha sonra 30 dk buz üzerinde inkübe edildi ve vortekslendi. Forward (F) ve Revers (R) primerden 10 μ M (100 μ M'lık ana stok çözeltisinden 10 μ l alınıp üzerine 90 μ l DNase RNase-free su eklendi) ara stok oluşturuldu ve bu ara stoktan kullanıldı.

Agaroz jel hazırlama: PZR işlemi yapıldıktan sonra oluşan PZR ürünleri aşağıdaki açıklamalara göre yürütülmüştür. Jel tabakasına kuyucukların oluşması için jel tarağı yerleştirildi. 250 ml 'lik erlenmayere 1 g agaroz, 100 ml 1 X TAE tamponu içine eklendi ve mikrodalga fırında hafif hafif ısıtılarak ve karıştırılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı ve böylece %1'lik agaroz jel hazırlanmış oldu. Agaroz, tampon içinde çözüldükten sonra yaklaşık $50^\circ C$ sıcaklığa düştüğünde 2 μ l etidyum bromür ilave edildi ve karıştırıldı elde edilen bu homojen karışım jel tabakasına dökülerek polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleşmesi tamamen gerçekleştikten sonra tarağı oluşan kuyucuklara zarar vermeyecek şekilde ortamdaki dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. 1X TAE tamponu jelin üzerini tamamen örtünceye kadar tanka aktarıldı.

3.2. Kültür Ortamları ve Hazırlanışı

Bu tez çalışmasında kültür ortamı olarak Tris Asetat Fosfat (TAP) besi yeri katı ve sıvı formları, sülfat içermeyen TAP, fosfat içermeyen TAP, TAP paromomisin katı besi yerleri ve Azot içermeyen SEM-N sıvı besi yeri kullanılmıştır.

TAP sıvı besi yerinin hazırlanışı: Çizelge 3.3 verilen TAP besi yeri 1L'lik otoklavlanabilir cam şişelerde hazırlanmıştır. Besi yeri hazırlanmasında her kimyasal ayrı ayrı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1 L' lik mezüre 500 ml distile su eklendi. Ayrıca kullanılan kimyasallar etkileşime girmeyecek ve çökmeye neden olmayacak şekilde gruplandırılıp sıralandıktan sonra mezürden 1L'lik otoklavlanabilir şişeye boşaltılarak solüsyon iyice karıştırılmıştır. Distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve besi yeri 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır. Otoklav işlemi bittikten sonra ve besi yeri oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

TAP katı besi yerinin hazırlanışı: TAP besi yerinin iki agar konsantrasyonu kullanılmıştır (%1,5 agar ve %4 agar). Çizelge 3.3 verilen TAP besi yeri otoklavlanabilir 1L'lik cam şişelerde hazırlanmıştır. Besi yeri hazırlanmasında her kimyasal için ayrı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1 L'lik mezüre 500 ml dH₂O eklendi. Kimyasallar etkileşime girmeyecek ve çökmeye neden olmayacak şekilde gruplandırılıp sıralandıktan sonra mezürdeki solüsyon 1L'lik otoklavlanabilir şişeye boşaltılarak iyice karıştırılmıştır. dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Gerekli agar miktarı eklenerek şişeye besi yeri 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Yaklaşık 50 °C' olduktan sonra steril kabinde petri kaplarına dökülmüştür. Oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.2. TAP katı ve sıvı formlarının içeriği (1L için)

Bileşen adı	Miktar
1M Tris base (e.g. Trizma)	2.42g
Fosfat tamponu II	1.0 ml
Solüsyon A	10.0 ml
Hutner's trace element	1.0 ml
Glacial asetik asit	1.0 ml

Azot içermeyen SEM sıvı besi yerinin hazırlanışı: Çizelge 3.4 verilen SEM besi yeri 1L'lik otoklavlanabilir cam şişelerde hazırlanmıştır. Besi yerinde kullanılan her kimyasal için ayrı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. Ayrıca 1 L'lik mezüre 500 ml dH₂O eklendi. Kullanılan kimyasallar etkileşime neden olmayacak ve çökmeye oluşmayacak şekilde gruplandırılıp sıralandıktan sonra mezüre eklenerek 1 L'lik şişeye boşaltılarak homojen olacak şekilde karıştırılmıştır. dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Besi yeri 15 dakika 121°C'de otoklavlanmıştır ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.3. Azot içermeyen SEM besi yerinin sıvı formunun içeriği (1L için)

Bileşen adı	Miktar
N-free Beijerinck's	50 ml
Minimal için fosfat	75 ml
Hutner's trace	1 ml

Fosfat içermeyen katı besi yerinin hazırlanışı: fosfat içermeyen TAP besi yerinin %1,5 agar konsantrasyonu kullanılmıştır. Çizelge 3.4 verilen fosfat içermeyen TAP besi yeri 1L'lik otoklavlanabilir cam şişe de hazırlanmıştır. Besi yeri içerisinde yer alan her kimyasal için farklı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1 L'lik mezüre 500 ml dH₂O eklendi ve kimyasallar etkileşime girmeyecek ve çökelmeye neden olmayacak şekilde mezüre eklendikten sonra 1L'lik otoklavlanabilir şişeye aktarılmıştır. Ayrıca karışım homojen oluncaya kadar karıştırılmıştır. dH₂O ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Gerekli agaroz miktarı eklenerek ve besi yeri 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Besi yeri yaklaşık 50 °C olduktan sonra steril kabinde petri kaplarına dökülmüştür. Besi yeri oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.4. Fosfat içermeyen TAP besi yerinin katı formunun içeriği (1L için)

Bileşen adı	Miktar
Trizma	2.42g
KCl Solüsyonu	1 ml
Fosfat tamponu II	1 ml
Hutner's trace element	1 ml
Asetik Asit	1 ml
Agaroz	15 g

TAP sülfat içermeyen katı besi yerinin hazırlanışı: besi yerinin %1,5 agar konsantrasyonu kullanılmıştır. 1L'lik otoklavlanabilir cam şişeye Çizelge 3.5 verilen TAP sülfat içermeyen besi yeri hazırlanmıştır. Besi yeri içeriğinde yer alan kimyasalların tartımında ayrı tartım kapları kullanılmıştır. 1 L'lik mezüre 500 ml dH₂O eklendi. Daha sonra kullanılan kimyasallar etkileşimde bulunmayacak ve çökelmeye neden olmayacak şekilde sıralandıktan sonra mezüre eklenerek mezürden de 1L'lik otoklavlanabilir şişeye aktarılmıştır. Solüsyon iyice karıştırılarak hacmi 1L olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Gerekli agaroz miktarı eklenerek, besi yeri 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Soğuduktan sonra steril kabinde petri kaplarına dökülmüş ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.5. Sülfat içermeyen TAP besi yerinin katı formunun içeriği (1L için)

Bileşen adı	Miktar
Trizma	2.42g
-S Beijerinck's	50 ml
Fosfat tamponu II	1 ml
-S Trace element	1 ml
Asetik Asit	1 ml
Agoroz	15 g

TAP antibiyotikli katı besi yerinin hazırlanışı: TAP antibiyotikli besi yerinde %1,5 agar konsantrasyonu kullanılmıştır. Çizelge 3.6 verilen TAP antibiyotikli besi yeri otoklavlanabilir cam 1L'lik şişe de hazırlanmıştır. Kullanılan kimyasallar farklı tartım kabı kullanılarak hassas terazide tartılmıştır. 1L'lik mezüre 500 ml dH₂O eklendi. Kimyasallar birbirleri ile reaksiyona girmeyecek şekilde sıralandıktan sonra mezürden 1L'lik otoklavlanabilir cam şişeye aktarıldı. Besi yeri iyice karıştırılmıştır. Besi yerinin son hacmi 1L olacak şekilde dH₂O ile tamamlanmıştır. Gerekli agar miktarı eklendi şişeye ve 15 dakika 121 °C'de otoklavlanmıştır. Otoklavlanma işlemi bittikten sonra ısısı yaklaşık 50 °C olan besi yerinin içerisine steril kabinde 1 ml paromomisin eklendi. Daha sonra solüsyon homojen oluncaya kadar karıştırıldıktan sonra petri kaplarına dökülmüştür. +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.6. TAP paromomisin katı besi yerinin içeriği (1L için)

Bileşen adı	Miktar
1M Tris base (e.g.Trizma)	2.42 g
Fosfat tamponu II	1.0 ml
Solüsyon A	10.0 ml
Hutner's trace element	1.0 ml
Glacial acetic acid	1.0 ml
Agar	15 g
Paromomisin	1 ml

3.3. Tek Klon Oluşturma

TAP katı besi yerine (%1,5) yayılan *sec24b* mutant şuşunun 10 gün ışık altında inokülasyonu sağlanmıştır. İnokülasyon işlemi bittikten sonra, *sec24b* mutant şuşundan 16 tek klon alınarak çizgi ekim yöntemine göre TAP besi yerine inkübe edilmiştir.



Şekil 3.2. *sec24b* mutant suşundan klon oluşturulması

3.5. Paromomisin Direnç Testi

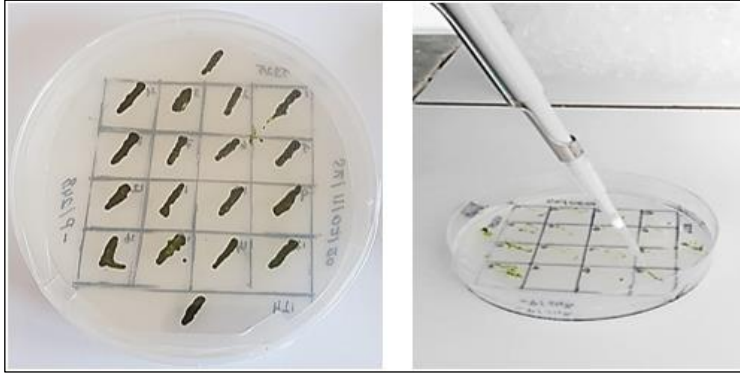
TAP paromomisin besi yerine *sec24b* mutant suşunun 16 tek klonu ve CC124 yabancı suşu ve CC5325 ebeveyn suşu çizgi ekim yöntemine göre ekilmiş ve ışık altında yedi gün inkübasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon süresi bittikten sonra suşların paromomisin üzerinde büyüebilmesi kontrol edilmiştir.

3.6. Arilsülfataz Enzim Aktivitesinin Kolorimetrik Tayini

Sülfat içermeyen TAP sülfat içermeyen besi yerine *sec24b* mutant suşunun 16 tek klonu ve CC5325 ebeveyn suşu ve CC124 yabancı suşu çizgi ekim yöntemine göre ekilmiştir ve ışık altında yedi gün inkübasyonu sağlanmıştır. *sec24b* mutant suşunun 16 tek klonu ve CC5325 ve CC124 suşlarının üzerinin her birine 10 µl 5-bromo-4-kloro-3-indolil sülfat püskürtülerek sülfataz hidrolizi ile substrat mavi bir çökelti oluşturur. Oluşan mavi renk arilsülfataz aktivitesinin (ARS) varlığını gösterdiğinden dolayı bu klonlar ARS (+) olarak değerlendirilmiştir. Fenotipik testi ilk 30 dk, 60d k ve 24 saat sonraki renk değişimleri incelenmiştir

3.7. Alkelen Fosfataz Enzim Aktivitesinin Kolorimetrik Tayini

Sülfat içermeyen TAP besi yerine *sec24b* mutant suşunun 16 tek klonu ve ebeveyn suşolan CC5325 ve CC124 yabancı suşu çizgi ekim yöntemine göre ekilmiştir ve ışık altında yedi gün inokülasyonu sağlanmıştır. *sec24b* mutant suşunun 16 tek klonu ve CC5325 ve CC124 suşlarının üzerinin her birine 10 µl substrat 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfat püskürtülerek alken hidrolizi ile substrat, mavi bir çökelti oluşturur. Fenotipik testi ilk 30 dk, 60 dk ve 24 saat sonraki renk değişimleri incelenmiştir.



Şekil 3.3. Alken fosfataz enzim kolorimetrik tayini

3.8. Hücre Sayımı

Thoma tip hemositometre ile hücrelerinin sayımı yapılmıştır. Geliştirilmiş tip sayım kamerası 0,1 mm derinlikte ve 9 adet 1 mm²’lik kare alanı bulunmaktadır. Thoma laminasının merkezinde 16 büyük kare alanına ve her bir kare 25 küçük kare alanına bölünmüştür. Merkezdeki 16 büyük karedeki hücrelerin sayımı yapılmıştır. Sayım lamaları, örnek doldurulmadan önce %70 etil alkol ile iyice temizlenmiş ve kurutulmuş, daha sonra, örneklerin sayımı yapılarak, gerekli hesaplamalarla hücre sayısı tespit edilmiştir. Hesaplama şekli; her bir kültürden alınan üçer örnek sayılarak bulunan değerlerin aritmetik ortalaması ile seyreltme faktörü ve 10⁴ çarpma işlemi yapılması ile bulunan değer ortalama hücre sayısını vermektedir. Bulunan değer 10⁶ çevrilerek ortalama hücre sayısı tespit edilmiştir.

3.9. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini kiti (Thermo Scientific) prosedüründe belirtilen koşullara uyularak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Aşağıda belirtilen maddelere uyularak genomik DNA elde edilmiştir. Bu maddeler;

- Laminar flow içerisinde örnek sayısı kadar steril 1.5 ml santrifüj tüplerine 350 µl LysisA eklendi. Daha sonra örnekler 1.5 ml santrifüj tüplerine eklendi ve 20 sn vortekslendi.
Steril 1.5 ml santrifüj tüplerine içerisindeki karışımın üzerine 50 µl Lysis Buffer B’den ve 20 µl RNase A’dan eklendi ve 2 sn vortekslendi.
- 1.5 ml santrifüj tüplerine içerisindeki karışımı 65 °C su banyosunda ve 5 dk ara ile karıştırılıp toplam 10 dk inkübasyona bırakıldı.
- 1.5 ml santrifüj tüplerine içerisindeki karışımın üzerine 130 µl çöktürme solüsyonu eklendi ve 1-2 dk karıştırıldı. 5 dk buzun üzerinde inkübasyona bırakıldı.
- Tüpler 5 dakika 14000 rpm santrifüjlendi.
- Santrifüj yapıldıktan sonra süpernant yeni steril bir 1.5 ml santrifüj tüpüne yaklaşık 550 µl alınarak aktarıldı.
- Örneklerin üzerine 400 µl bağlanma solüsyonu eklendi ve daha sonra %96 etanol eklendi ve karıştırıldı.
- Bu karışımın hepsi 2 ml’lik kitin kendi spin kolonu içerisine transfer edildi.

- Kolonlar 8000 rpm’de 1 dk santrifüj edildi. Kolonların üzerine 500 µl yıkama tamponu 1 (Etanol eklenmiş) solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 1 dk santrifüj edilerek yıkama yapıldı
- Spin kolonu 1.5 ml santrifüj tüpüne yerleştirildi. Üzerine 500 µl yıkama tamponu 2 (Etanol eklenmiş) solüsyonu eklendi ve 3 dk 14.000 rpm’de santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
- DNA’nın eldesi aşamasında; Alttaki tüp atıldı kolon temiz 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi 60 µl elusyon tamponu konarak 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi bittikten sonra tüpler buzun üzerine bırakıldı. Aynı işlem 2. defa tekrarlanarak farklı bir tüpte 30 µl elusyon tamponu eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildi ve ardından 10000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı.

3.10. DNA Örneklerinin Kalitatif Tayini

Hazırlanan %1’lik agaroz jel, içi 1X TAE tamponuyla doldurulmuş olan tanka yerleştirildi. 3 µl DNA çözeltilerinin üzerine 2 µl yükleme tamponu eklendi. Bu DNA karışımı 5 µl olarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Son kuyucuğa referans olarak 3 µl (1/5 seyreltilmiş şekli) 1kb DNA ladderin üzerine 2 µl yükleme tamponu eklenerek 5 µl yüklendi. Örnek bantları belirgin şekle ulaşana kadar 150V’da yürütüldü.

3.11. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Revers Transkriptaz (RT-PZR) Kullanılan Primerler

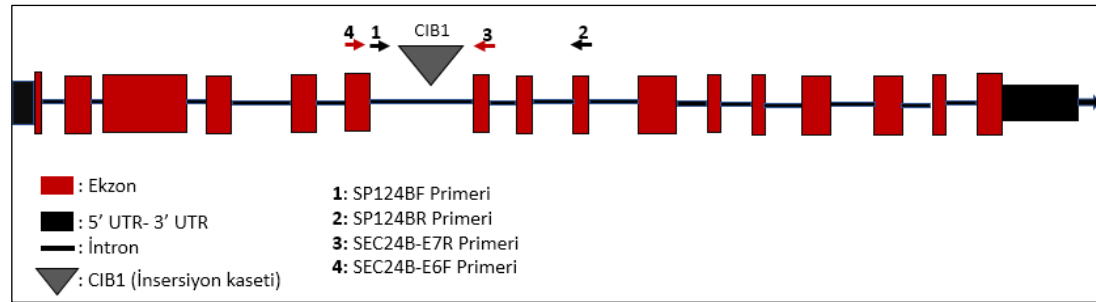
Bu tez çalışmasında kullanılan primer çiftleri ve elde edilen ürün boyutları Çizelge 3.7’ de gösterilmektedir.

Çizelge 3.7. PZR ve RT PZR’da kullanılan primerler

Gen	Primer Adı	Baz Dizilimi	Amplikon Uzunluğu	Kullanım Amacı
<i>SEC24B</i>	SEC24B-E7-R	CTGTAGAAGTGCACGGCG	155bp	RT- PZR
	SEC24B-E6-F	GTGTTCCCTCATCGACGTCAG	1070bp	PZR
<i>QSEC23A</i>	23A-E10-F	GCCTACTTCTACGTGGTGGT	756bp	RT- PZR
	23A-3utr-R	TCAAACACTCCGCTACCCAT		
<i>SEC24B</i>	SP2-9E-24B-R	TCCATACGCTATCCCAAAGC	1597bp	PZR
	SP1-Int6-24B F	CCAGGTAGCTGAGCTTGTC		

Çizelge 3.7'nin devamı

<i>CBLP</i>	qCBLPR1	CCCACCAGGTTGTTCTTCAG	154bp	RT-PZR
	qCBLPF1	CTTCTCGCCCATGACCAC		
<i>SEC24A</i>	SP2-Up-24A-R	GCTGCCTCCCTCTCTCTCTT	1453bp	PZR
	SP1- Int20-24A-F	GCTGCCTCCCTCTCTCTCTT		

Şekil 3.4. *SEC24B* geninin kopyalanmasında kullanılan primerlerinin gösterimi

3.12. PZR

DNA'nın amplifikasyonu gerçekleştirmek için polimeraz zincir reaksiyonu aşağıdaki şekilde yapılmıştır. PZR reaksiyonu için iki farklı kit kullanılmıştır. Her örnek sayısı kadar PZR karışımı (QIAGEN -Kat. No /201223, AMPLIQON- Kat.No/A331703) aşağıdaki Çizelge 3.8 ve Çizelge 3.9'da gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu karışım örnek sayısı kadar PZR tüplerine 11.5 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve her bir örneğin DNA'sı ayrı PZR tüplerine 1 µl olarak eklenmiştir. PZR koşulları Çizelge 3.11'de belirtilen değerlerde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.8. PZR bileşenleri (QIAGEN)

Bileşenler	Miktar
Q solution (5X)	2.5 µl
Buffer (10X)	1.25 µl
dNTPs (10mM)	0.25 µl
Taq (2.5)	0.05 µl
Left Primer (10µM)	1.25 µl
Right Primer (10µM)	1.25 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	4,95 µl

Çizelge 3.9. PZR bileşenleri (AMPLIQON)

Bileşenler	Miktar
2x Master mix	2.5 µl
Left Primer (10µM)	1 µl
Right Primer (10µM)	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	2 µl
Toplam	10,5 µl

Çizelge 3.10. SP1-Int6-24B F ve SP2-9E-24B-R primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	39
55°C	1.45s	39
72 °C	1dk 50 s	39
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

Çizelge 3.11. SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	39
58°C	45s	39
72 °C	1dk 50 s	39
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

Çizelge 3.12. SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan PZR analizi protokolü

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	39
57°C	40s	39
72 °C	1dk 10 s	39
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

3.13. RNA İzolasyonu

C. reinhardtii suşlarından RNA izolasyonu NucleoSpin[®] RNA Plant kiti prosedürü modifiye edilerek yapılmıştır. Aşağıda belirtilen reaksiyon yapılarak RNA elde edilmiştir. Bu maddeler;

- Örnek sayısı kadar steril 1.5 ml mikro santrifüj tüplerine 350 µl RAI tamponu ve 3.5 µl β-merkaptoethanol eklendi. Daha sonra steril kabinde hücreler eklendi ve 20 s vortekslendi.
- Hücreler bu karışımın içerisinde üç gün -20 °C muhafaza edildi.
- Karışım buzun üzerinde çözüldükten sonra vorteks yapıldı ve 21 G enjektörde karışım 15 kez çekilip bırakılmıştır.
- Steril mikro santrifüj içindeki karışım kitin içerisindeki filtreli kolon tüpüne transfer edildi. Tüpler 1dk 11,000 g santrifüj edildi.
- Santrifüjden çıkarılan tüplerin pelet kısmına dokunulmadan üst sıvı kısmı (süpernatant) alınarak yeni 1.5 ml mikro santrifüj tüplere transfer edildi.
- Santrifüj tüplerin üzerine %70'lik 350 µl ethanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
- Karışım mavi kolonlu tüplere transfer edildi. Tüpler 30 s 11,000 g'de santrifüjlendi.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra filtreli kolonlar alınarak yeni toplama tüpünün üzerine transfer edildi. Filtreli kolonlu tüplerin üzerine 350 µl MDB tamponu eklendi. Tüpler 1dk 11,000 g santrifüj edildi.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra kolonlu tüplerin tam merkezine 95 µl DNase (10 µl rDNase üzerine 90 µl reaksiyon tamponu rDNase eklenerek karıştırıldı) eklendi. 25 °C 15 dk inkübasyona bırakıldı.
- Kolonlu tüplerin üzerine 200 µl RAW2 tamponu eklendi ve 30 s 11,000 g'de santrifüjlendi.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra filtreli kolonlar alınarak yeni toplama tüpünün üzerine transfer edildi. Kolonların üzerine 600 µl RA3 tamponu eklendi ve 30 s 11,000 g'de santrifüjlendi.

- Santrifüj işlemi bittikten sonra kolon kaldırılarak toplama tüpünün içerisindeki sıvı boşatıldı. Filtreli kolonlar tekrardan toplama tüpünün üzerine transfer edildi.
- Kolonlu tüpün üzerine 250 µl RA3 tamponu eklendi ve 2 dk 11,000 g'de santrifüjlendi.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra filtreli kolonlar alınarak nükleazlar içermeyen tüplere transfer edildi. Kolonlu tüpün üzerine 50 µl RNase içermeyen sudan eklendi.
- Tüpün içerisindeki sıvı tekrar kolonun üzerinden bırakıldı (R elusyon) ve 1 dk 11,00g' de santrifüjlendi. Santrifüj işlemi bittikten sonra kolonlar tüplerin üzerinden alınarak tüpleri kapakları kapatıldı. RNA muhafaza edilmek amacıyla -80 °C'ye kaldırıldı. RNA'ların kantitatif analizi ise NanoDrop kullanılarak yapıldı.

3.14. RNA Örneklerinin Miktarının Belirlenmesi

İzole edilen RNA'ların miktarlarının belirlenmesi amacıyla spektrofotometrik ölçüm yapmak için NanoDrop cihazı kullanılarak yapıldı. İlk önce cihaz 1 µl bidistile su ile temizlendi. Daha sonrasında RNA'nın çözülmüş olduğu RNase içermeyen sudan 1µl alınarak ölçüm değeri sıfırlandı. İzole edilen RNA'dan 1 µl alınarak 230, 260 ve 280nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

3.15. RNA Örneklerinin Kalitatif Tayini

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, için 1X TAE tamponuyla doldurulmuş olan tanka yerleştirildi. 4 µl RNA çözeltilerinin üzerine 2 µl yükleme tamponu eklendi. Bu RNA karışımı 6 µl olarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Son kuyucuğa referans olarak 3 µl (1/5 seyretilmiş şekli) 1kb DNA laderının üzerine 2 µl yükleme tamponu eklenerek 5 µl yüklendi. Örnekler tamamen açılana kadar 100V'da yürütüldü.

3.16. cDNA Sentezi

Total RNA' lardan cDNA sentezi için SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen Kat. No: 18080-093) kiti kullanılmıştır. Aşağıda belirtilen maddelerdeki reaksiyon yapılarak cDNA sentezi yapılmıştır. Bu maddeler;

- Nükleaz içermeyen 1.5 ml mikro santrifüj tüplerine 1 µl (50µM) Oligo (dT)₂₀ eklendi ve üzerine 1 µl (10 mM) dNTPs Mix eklenmiştir. Toplam hacim 13 µl tamamlayacak şekilde ddH₂O eklenmiştir.
- Mikro santrifüj tüpler 15 dk 65 °C PZR' da inkübe edilmiştir. İnkübe edildikten sonra 1 dk buzun üzerinde bekletilmiştir.
- Santrifüj işlemi bittikten sonra tüplerin içerisine 4 µl (5x) First Strand tamponu, 1 µl (0,1 M) DTT, 1 µl Super Script III RT (200 unit/ 1 µl) eklenmiştir. Eklendikten sonra tüpler yavaş bir şekilde alt üst edilmiştir.
- Tüpler 60 dk 50 °C PZR' da inkübe edilmiştir. Karışım 15 dk 70 °C ısıtılarak reaksiyon durdurulmuştur. Elde edilen cDNA -80 °C muhafaza edilmiştir.

3.17. Ters Transkriptaz PZR (RT- PZR)

Her örnek sayısı kadar RT PZR karışımı aşağıdaki Çizelge 3.12' de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanılan karışım örnek sayısı kadar PZR tüplerine 10.5 µl olacak şekilde dağıtılmıştır ve her bir örneğin cDNA' sını ayrı PZR tüplerine 2 µl template olarak eklenmiştir. RT PZR koşulları Çizelge 3.14' de belirtilen değerlerde ayarlanmıştır.

Çizelge 3.13. RT PZR bileşenleri

Bileşenler	Miktar
Q solution (5X)	2.5 µl
Buffer (10X)	1.25 µl
dNTPs (10mM)	0.25 µl
Tag (2.5)	0.05 µl
Left Primer (10µM)	1.25 µl
Right Primer (10µM)	1.25 µl
cDNA	2 µl
H ₂ O	3.95 µl
Toplam	12.5 µl

Çizelge 3.14. q-CBLP-F1/ q-CBLP-R1 primerleri ile uygulanan kontrol RT-PCR protokolü;

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	34
52°C	40s	34
72 °C	20 s	34
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

Çizelge 3.15. SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi protokolü;

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	34
57°C	40s	34
72 °C	20 s	34
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

Çizelge 3.16. 23A-E10-F ve 23A-3utr-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi protokolü;

Sıcaklık (TM)	Süre	Döngü Sayısı
95 °C	5 dk	1
95 °C	30 s	34
57°C	40s	34
72 °C	20 s	34
72 °C	10 dk	1
4 °C	∞	

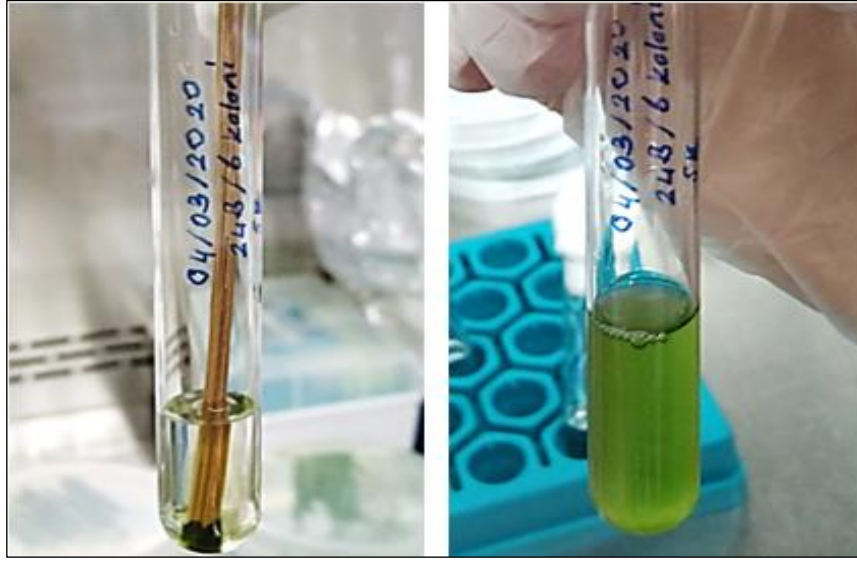
3.18. PZR ve RT PZR Ürünlerinin Agoroz Jelde Yürütülmesi

Hazırlanan %1'lik agaroz jel, içi 1X TAE tamponuyla doldurulmuş olan tanka yerleştirildi. PZR veya RT PZR ürünlerinden 4 µl alınarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Referans olarak son kuyucuğa 3 µl (1/5 seyretilmiş şekli) 1kb DNA Laderin üzerine 2 µl yükleme tamponu eklenerek 5 µl yüklendi. Örnekler tamamen açılana kadar 150V'da yürütüldü.

3.19. Zigot Oluşumu

C. reinhardtii sec24b mutant suşu ve CC5325 ebeveyn suşu, CC124 ve CC125 yabanıl suşları 2 ml TAP sıvı besi yeri içerisinde 1 saat bekletildikten sonra hücrelerden 200 µl alınarak %1,5 TAP katı besi yerine aktarılıp petri içinde yayılmıştır. *C. reinhardtii* hücreleri ışık varlığında 7 gün inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 2 ml azot içermeyen TAP sıvı besi yerine 17 saat ışıklı ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler *sec24b*

mutant suşu, CC5325ebeveyn suşu ve CC124 yabancı tip MT^- (çiftleşme tipi eksi) dir ve bu suşlar MT^+ (çiftleşme tipi artı) olan CC125 suşu ile çaprazlandı ve ışık mikroskobu altında zigot oluşum aşamaları incelendi. Daha sonra CC124xCC125, CC5325xCC125 ve *sec24b* mutant suşu xCC125 zigot peletleri 150 µl alınarak %4 TAP besi yerine inkübe ve 24 saat ışıklı ortamda inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ise 7 gün ışık içermeyen ortamda bekletildi. 7 gün sonra zigotlar ışık içeren bir ortamda mayoz bölünmeye gitmesi için tutuldu. Mayoz bölünme sonucu oluşan tetradlar zigostereoscop altında ince cam aparatla ayrıştırıldı. Oluşan tetradlar 10 gün büyütüldükten sonra yeni tabaklara aktarıldı.



Şekil 3.5. *C. reinhardtii* suşlarının TAP azot içermeyen sıvı besi ortamına alınması

3.20. Tetrad Analizleri

Tetradlar çoğaltılmak maksadı ile yeni tabaklara yayıldı. Daha sonra projeni dayanıklılıklari test edilmesi amacıyla paromomisin besi yerine inkübe edildi. Paromomisinli besi yerinde 7 gün inkübasyona bırakıldı. Paromomisin testi belirlendikten sonra tetrad projenilerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. DNA'lar PZR yöntemiyle kopyalandı. Daha sonra projenilerin eşey tipinin belirlenmesi amacıyla projeniler 1 ml azot içermeyen TAP sıvı besi yeri içeren cam tüplere CC124 (MT^-) ve CC125 (MT^+) yabancı tip suşlar ise 7 ml azot içermeyen TAP sıvı besi yeri içeren cam tüplere 15 saat ışık altında inkübasyona bırakılmışlardır. Her bir projeni hem CC124 (mt) hem de CC125 (MT^+) yabancı tip suşlar ile çaprazlanmak maksadıyla 500 µl alınarak ayrı cam tüplere bırakıldı. Her bir iki farklı tüpte bulunan projenilerin üzerine 500 µl CC124 suşundan ve 500 µl CC125 suşundan eklenerek ayrı olarak çaprazlandı. Ayrıca 500 µl CC124 suşu alınarak ve 500 µl CC125 suşundan çaprazlamak için birbirleriyle karıştırılmıştır. Daha sonra suşlar 17 saat ışıklı ortama bırakıldı.

3.21. Biyoinformatik Analizlerini Gerçekleştirilmesi

SEC24B proteininin hücre içi olası yerinin belirlenmesi için TargetP, Predalgo veri tabanları kullanılmıştır. Ayrıca SEC24 proteinlerinin sahip oldukları olası domain bölgelerini belirlemek amacı ile Pfam veri tabanı, SEC24B proteininin olası üç boyutlu

yapısını belirlemek için ise Phre2 veri tabanı kullanılmıştır. SEC24B proteininin diğer organizmalardaki benzerliğini yüzde olarak belirlemek amacı ile Clustal Omega biyoinformatik programı kullanılmıştır. Biyoinformatik veri tabanlarına yüklenen SEC24 proteinlerin dizilerinin alındığı kaynak ve erişim numaraları Çizelge 3.17’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.17. Biyoinformatik çalışmalarda kullanılan proteinlerin erişim numaraları; **Cr:** *Chlamydomonas reinhardtii*; **Vc:** *Volvox carteri*; **At:** *Arabidopsis thaliana*; **Mm:** *Mus musculus*; **Hs:** *Homo sapiens*; **Sc:** *Saccharomyces cerevisiae*

Protein Adı	Erişim Numarası	Kaynak
CrSEC24B	Cre01.g035850.t1.2	Phytozome
CrSEC24A	Cre02.g091150.t1.1	Phytozome
AtSEC24A	OAPQ270.1	NCBI
AtSEC24B (CEF)	NP_5689.1	NCBI
HsSEC24A	095486.2	NCBI
HsSEC24B	AAI43269.1	NCBI
HsSEC24C	NP_004913	NCBI
HsSEC24D	NP_055637.2	NCBI
ScSec24p	NP_012157	NCBI
ScLst1p	NP_011966.1	NCBI
ScIss1p	NP_014349	NCBI
MmSEC24A	Q3U2P1.1	NCBI
MmSEC24B	NP_997092.1	NCBI
MmSEC24C	AAH40370.1	NCBI
MmSEC24D	NP_081411.2	NCBI

3.21.1. *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininin tahmini homoloji modelinin belirlenmesi

Phyre2 (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) veri tabanı, protein dizilerini kullanarak, yüklenen dizeye sahip proteinlerin 3 boyutlu modellerinin belirlenmesini sağlamaktadır. Bu veri tabanı web üzerinde bulunan bir biyonformatik programdır (Kelley vd. 2015). Bu programı kullanarak SEC24B protein dizilimi Phytozome veri tabanından alınıp Phyre2 veri tabanına yüklenmiştir.

3.21.2. *C. reinhardtii*'nin SEC24B proteinin olası hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi

Predalgo ve TargetP biyoinformatik programları kullanılarak SEC24B protein dizilimi Phytozome veri tabanından alınıp bu programların veri tabanına fasta formatında yüklenmiştir.

3.21.3. SEC24 ortologlarının tahmini domain bölgelerinin belirlenmesi

SEC24 ortologlarının domain bölgelerini belirlemek amacı ile Pfam veri tabanı kullanılmıştır. Pfam, protein dizisi ailelerinin bir veri tabanıdır. Her Pfam ailesi, Hidden Markov (Saklı Markov Modeli) modeli olarak bilinen istatistiksel bir modelle temsil edilir (Punta vd. 2012)

3.19.4. *C. reinhardtii*'nin SEC24B proteininin diğer organizmalardaki ortologlarına benzerlik derecesinin belirlenmesi

Benzerlik derecesini belirlemek amacı ile Clustal Omega programı kullanılarak yapılmıştır. Bu programa Çizelge 1.1'de verilen erişim numaralarına sahip protein dizileri ile *C. reinhardtii* SEC24B proteinin dizisi yüklenerek yüzde benzerlikleri belirlenmeye çalışılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Biyonformatik Veri Tabanlarının Tahmini Sonuçları

4.1.1. Protein dizilerinin hizalanması sonuçları

Proteinlerin dizi hizalamasında belli bir pozisyondaki amino asitlerin benzerlik derecesi, bu proteinler için bu bölgenin veya dizi motifinin ne kadar korunmuş olduğunu (evrimsel olarak benzediği) ve yapısal bir ilişki bulundurduğunu belirtmektedir. *C. reinhardtii*'de SEC24B peptidinin diğer organizmalardaki peptid dizileri ile benzer bölgelerini tespit etmek amacıyla kullanılan Clustal Omega programının sonuçları Çizelge 4.1 düzenlenmiştir.

Çizelge 4.1. *C. reinhardtii*'de SEC24B protein dizisinin bazı organizmalarda bulunan ortologlarının Clustal Omega ile hizalama sonuçları verilmiştir; **Vc:***Volvox carteri*; **At:***Arabidopsis thaliana*; **Mm:***Mus musculus*; **Hs:***Homo sapiens*; **Sc:***Saccharomyces cerevisiae*

Organizma /Protein	Benzerlik (%)	Eşleşen Aynı Aminoasit	Eşleşen Benzer Aminoasit
VcSEC24	76.316	841	100
AtSec24B	38.534	295	447
AtSec24C	37.824	282	438
CrSEC24A	35.133	262	397
MmSEC24D	30.603	313	340
HsSEC24C	30.544	301	354
AtSec24A	30.125	316	338
MmSEC24C	29.769	306	348
HsSEC24D	29.676	306	330
MmSEC24A	28.302	329	319
HsSEC24A	27.376	335	314
MmSEC24B	23.272	345	303
HsSEC24B	21.729	357	294
ScSec24p	20.936	295	237
ScLst1p	19.701	309	224
ScIss1p	18.966	278	220
CrSEC23B	12.851	235	174
CrSEC23A	12.36	230	143

C. reinhardtii'deki SEC24B (CrSEC24B) ve SEC24A (CrSEC24A) homologlarının protein dizilerinin hizalanması sonucunda benzerlik derecesi %35.133'dür. Veri tabanında verilen bu sonuç *C. reinhardtii*'deki SEC24B ve SEC24A proteinlerinin birbirlerinden yapısal veya işlevsel olarak muhtemelen farklı olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.1).

CrSEC24B	-----MYAFRPGAPPGGMPPAPGGFGAPPFFPGGGGGPPFGGGFGAPPFFPGGGFAP	54
CrSEC24A	MYNQFGYGAAPRPPFPQGGVFPAPGMMLQAGP-----GGFFP	37
CrSEC24B	SMPPPPGGAPLNQAFGAMSIGGPPGAPPFFPGMPPFGGMIGMP---PAPFGMQGMPPPP	111
CrSEC24A	-----GPPGMPLPFG-MPFPFGPFGMAFPGMPPFPAPYGMPPPP	75
CrSEC24B	GPPGMPPPPGPPMPPPPSPGMAPLGGFESNAV-----PLNMPSPV-----PPS	156
CrSEC24A	GPPGMPPPPGPPMPPPPSPGMAPLGGFESNAV-----PLNMPSPV-----PPS	135
CrSEC24B	QHSALMGVPPQQHGMQQQHGMPFSPNGMPPPPGPPGSMRPPGPPGMP-----	206
CrSEC24A	GSFGAPGMPQ-----PGAP-PPPGMPPPPGPPGMPQPPGPPGMP-----	187
CrSEC24B	---PPPGAPYGAFFPGPPMPPPPGPPGPPPPGPPGPPPPGAYPPGMPPPPPGPPGM	262
CrSEC24A	MGMPPPPGPPGMAFPFGPPGMAFPFGPPG-MQPPGMPGMPFAPAGFHAPGVPPFGMPGG	246
CrSEC24B	GPPGMPPPPGPPMPPPPGPPGPPPPGPPGPPPPGPPGPPPPGAYPPGMPPPPPGPPGM	310
CrSEC24A	PP-----PQFGMVGMPPMAGYDFYSGQRMMEQFESLTLGAAGPQGPEGVDPASLPRPV	301
CrSEC24B	AQPASSEMVLVFDTRIAGGHNLPPAASSRFVVRDRGSCSPRYLRATLNHVHSPPELLGNAA	370
CrSEC24A	GEALERA-----LTAHSPGDPANCSPDNMRMTINAI FVSTALKARMP	343
CrSEC24B	MPLALVVSFLALPDGDDPIQIVDVTESEGVRCGRCKAYMNPWRWIASGRSFTCNFCGI	430
CrSEC24A	LPLGVVHFMADAFYGRQVPVQLSSAGIVRCRCRITMNFQWTDAGRRFKCNVCAN	402
CrSEC24B	SNITFDHVFCHLSFDGRRRDADERPELRCGTVEYLASKEYVFRFEMQFTRVELLDVSSQFA	490
CrSEC24A	LNELPVENFSSLDQNGRRRDADERPELSQGTVEYVAPADYMRVREMEPEVVFECIDVSYAA	462
CrSEC24B	ATGATASLGRAVAALDRVQGGSPRALVGIATYDSAVHFKSVRSFSAAPQMLVMSDVNDV	550
CrSEC24A	VASAVAITAAAKACLDQLPQDERTLVGELTIDSSLHFNKASLTQPQMLVTELDDE	522
CrSEC24B	FAPVSGKLLMELEBYRQLKELLEGLPAMWANNRINENCAGAAIEAATDILKPGGGKVAH	610
CrSEC24A	FVPLPDDLLVNLRESRQVVEALDLPNNFAGTSVVE SAMGPAQAATFVSSHIGCKLII	582
CrSEC24B	FVASLPAVGVHALKPREATGLGEKDKL-SYLVSDNTLRSLATTAADHMCVDLSVLGGC	669
CrSEC24A	FQSSVPSLGVGRVQNRNPSAYGTEREPLRNPDFFYKRYAAECRSVQITVDVFAMAMQ	642
CrSEC24B	VVDIASLSDLAIVTIGGIVYSYIPIYSFVNDFFDQLVNDLSNNVVARQC	729
CrSEC24A	YTDLASLAAIPRVTCGELYYPGFMARDGTKLTAETIHNLTRPT	702
CrSEC24B	VESYSGHCYRFRATFDVLEPAVQCDKALLARLITLTKLFAQSEAYVCAALYINVASQV	789
CrSEC24A	LSAETHGHEFNRSI-DLLALFTCDERKAFAMEIAHEEGTVQPGFAYVQCALYINVASQV	761
CrSEC24B	LRVHILALFVLDNISTVFKGADLDAQICALGRRVAVALQGQOPLGACRELVSAAVVATLY	849
CrSEC24A	LRVHILALFVLDNISTVFKGADLDAQICALGRRVAVALQGQOPLGACRELVSAAVVATLY	820
CrSEC24B	AYRRY--CASSSSAVQLILPEALKLPLLYALSLLKGAAGLKDNRVPPDDRALWITQMGCL--	905
CrSEC24A	EFRIMNANAALRTPNKLIFFPETYKYLPIWTLGLMKCAAFRGGARDVNADERIAVGHFLMA	880
CrSEC24B	-PCSRVGPLLYPRLLPLGRMLAEAAEDNCTAAG--NIFEGTLSSSESLESGGVSLLENG	962
CrSEC24A	GGVEAVARLAYPTAYALHDPGSPW--GMEQQDGSVFPVPAAVPLSAAVLQDGGVYLIDTG	937
CrSEC24B	YEAILYLDRAVPQQLLHDLGVPVSYDELLRQPAVSLLP-RDSWPNRLLDLLLTKVRLQR	1021
CrSEC24A	RVFVWLGRAMSPQWCVEVFGTDFLSLPQD-TSAVTVEPGRDTFMSGRVITLLRALRAGR	996
CrSEC24B	SSFMRRLRVARKGDPAESAFFFAMLVEDRSTAGMSYVEYLCQIHRLIQNKMG	1071
CrSEC24A	PLHQQVFVVRQGSFLEPHVLPYLVEDRSPSTQSYTDYMYSLHKAVLAK--	1044

Şekil 4.1. *C. reinhardtii*'de SEC24B ve SEC24A protein dizilerinin hizalanması; (*): Eşleşen aminoasit; (.) : Korunmuş aminoasit; (:): Yarı korunmuş aminoasit; **Yeşil**: Sec23/Sec24 zinc finger domain; **Kırmızı**: Sec23/Sec24 trunk domain; **Mavi**: Sec23/Sec24 beta-sandwich domain; **Sarı**: Sec23/Sec24 helical domain; **Mor**: Gelsolin repeat domain; **FAP-FVP**: SEC24 proteinini SEC23 proteinine bağlandığı düşünülen motif dizisi

C. reinhardtii SEC24B proteininin ve *Volvox carteri* (*V. carteri*) Sec24 proteininin hizalama sonucu Şekil 4.2’de gösterilmiştir. *C. reinhardtii*’de SEC24B proteininin hizalamadaki benzerlik derecesi %76 ile en çok *V. carteri* Sec24 proteinidir. Prochnik vd. (2010) yaptıkları çalışma karşılaştırmalı genomik çalışmaları ile *V. carteri* ve *C. reinhardtii* arasında protein alanı repertuarında önemli bir farklılık olmadığını ortaya koymuştur. *C. reinhardtii*’de ve *V. carteri* genomlarının boyutu ve kodlanmış genlerin sayısı birbirine benzemektedir (sırasıyla *V. carteri* ve *C. reinhardtii*’de 138 Mbp, 14.520 protein kodlayan gen ve 118 Mbp, 14.516 protein kodlayan lokus) (Prochnik vd. 2010; Merchant vd. 2007).

CrSEC24B	--MYAPRPGAPPFGMPFAPGGFGAPPPFPFGGPGPPFPFGGFGAPPPPPGPGGFAP--SM	56
VcSEC24	MQSYGPRPGA--PGGLPEPFGGYGSMFGLGPPGVPPPGVPPSG--PFPFGGPGFPFPPGM	58
CrSEC24B	PPFPFGGAP---LNQAFGAMSIGGPPGAPPPFGMPFPFGMIGMFPAPPGMQGGMPPFP	113
VcSEC24	APFPFGGAPQGSNLVAFGAMSLG--PPGVPPFGGAPFLGTIPVKPL-----GGPFGP	109
CrSEC24B	PGMFPFP-----GPPGMFPFPSPGMAPLGGFFSNAVPLNMFVSVSPSQ	157
VcSEC24	PGMFPFPAGSHPPGVPPFLRPLAPGTGMFPFPGAPNAGLMGGFFSNAVPLSLPNVSPSM	169
CrSEC24B	HSGALMGVFPQQHGMQQQOHGMPPSPNGMMPPPPGPPG---SMRFPFGMFPFPFGAPYG	214
VcSEC24	HSGGLVGVFPVS-----SPNGLHPFPPTQGSTGPIFPFPFGMFG---PYG	213
CrSEC24B	APFPFGMFPFPFGPPGPF--PPPMPGGFPFP--GAYFPGMFPFPFGMFPFGMFPFP	272
VcSEC24	APFP----PFPFGVPGMFPFGMFGPAPPFPFGFMFP----P----PFGMFPFP	258
CrSEC24B	GFPGMFPFPG---QRFAGQASGAGAPGSSRIDPSQIPRFVAQFASSEMBLVDTRIAGGH	329
VcSEC24	PLFGMAPQGGPPQRGAVGQVQ--GPPSASSRIDPSQIPRFVAQFPSSGPLVDFTRMAGH	317
CrSEC24B	NLFPAASSRFVVRDRGSCSPRYLRATLNLHVPHSPELLGNAAMPLALVVSPLALPDPGDDP	389
VcSEC24	ALFPFPASSRFVVRDRGSCSPRYLRSTLNLHVPHSPELLNCAMPLALVVSFPMALPDPGDDL	377
CrSEC24B	IQIVDVTESGFVRCGRCKAYMNFWMRWTAAGRSFTCNFCGLSNNTPDHYFCHLSPDGRRR	449
VcSEC24	IQIVDVTESGFVRCVRCAYMNFWMRWINSGRNFCNFCGLSNSTPDVYFCHLAPDGRRR	437
CrSEC24B	DADERPELCRGTVVEYLASKEYVFRPDMQPTHVFLIDVSTATATGATASLCRAVAALDR	509
VcSEC24	DADERPELCRGTVVEYLASKEYVFRPDMAPAHVFLIDVSTAVATGATASLCRAVAALDR	497
CrSEC24B	VQGGFRALVGIATYDSAVHFYSVRSFSAAPQMLVMSDVNDVFAPISGKLLMELEYREQL	569
VcSEC24	LOGGERAMVAVATYDTSVQFYSVRTSGATPQMLVMSDVQDVFAPIGKLLMGLLEHREQL	557
CrSEC24B	KELLEGLFAMANNRINENCAGAAIEAAIDLLKPGGGKVRFAVSLFAVGVHALKREAT	629
VcSEC24	KELLEALPGMNTSRINENCAGAAIEAAIDLLKPYGGKVRFAVSLPSVGVHALKREAT	617
CrSEC24B	SLGKDKLSYLVSDNTLRSLATTAADHMCVDLSVLGGQYVDIASLSDLAVTITGGIVYS	689
VcSEC24	SLGPKDKLAYLTSQDNTLRSLATTAADHMCIDLMVLGGQYCDIATLSDLATITGGIVYS	677
CrSEC24B	KTPYSPVNDQDLVNDLSWNIARQQLEAMVAVRCSSGLDVEYSYSGHCYRFPATEDVYLP	749
VcSEC24	KTPYSPVADQDLVNDLSWNIARQQGLEAMVAVRCSSGLDVEYSYSGHCYRFPNTEDVYLP	737
CrSEC24B	AVDCKALLARLITKLPASSEAVVORALVTVNAGQVIRVHTLALFVNDNISTVFKG	809
VcSEC24	AIDCDKALLARLITKLAAGSECVLQSALEATNVAQGVIRVHTLALFVNDNISMVFKG	797
CrSEC24B	ADLDAQICALGRRVAVALQGQPLGACRELVSAAVVATLYAVRRYCASSSAVQLILPEA	869
VcSEC24	ADLDAQICILGRRVATISLVGQQTILGACRELVSSAVVATLYSYRRYCASSSAVQLILPEA	857
CrSEC24B	LKLLPLYALSLLKGAGLKDNVKEDDRALWIITQMGCLPCSRVGFLLYPRLLPLGRMLAEAR	929
VcSEC24	LKLLPLYALSLLKGAGLKDNVKEDERALWIITRMSCLPCSRVGFLLYPRLLPLARLLAEAR	917
CrSEC24B	EDNCTAADGNTEFEGTLTSSSELSSEGGVSLLENGYEAILYLDRAVPQQLHDLGVPYSYDE	989
VcSEC24	EENATAADGNTEFEGTLTSSSEGLEAGGIFLLENGYEAILYLDRGVSGQLLFELLGVASYDD	977
CrSEC24B	LLRQPAAVSLLPRDSWPNRLLDLLTKVRLQRSSFMRLRVARKGDPAESAFFFAMLVEDRS	1049
VcSEC24	LVRVFNATITLLPRDNWPSRLLQDILLTKIRLQRSSFMRLRVARKGDPAESAFFFAMLVEDRS	1037
CrSEC24B	TAGMSYVEYLCQIHRLIQNKMG	1071
VcSEC24	SAGMSYVEYLCQIHRLIQNKMG	1059

Şekil 4.2. CrSEC24B ve VcSEC24 protein dizilerinin hizalanması; (*): Eşleşen aminoasit; (.): Korunmuş aminoasit; (:): Yarı korunmuş aminoasit; **Yeşil:** Sec23/Sec24 zinc finger; **Kırmızı:** Sec23/Sec24 trunk domain; **Mavi:** Sec23/Sec24 beta-sandwich domain; **Sarı:** Sec23/Sec24 helical domain; **Mor:** Gelsolin repeat domain **FAP:** SEC24 proteinini SEC23 proteinine bağlandığı düşünülen motif dizisi

C. reinhardtii SEC24B proteininin ve *A. thaliana* 'daki Sec24B proteininin hizalama sonucu Şekil 4.3'de gösterilmiştir *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininin diğer bir model organizma olan *A. thaliana* 'daki Sec24B proteini ile benzerlik derecesi %38.534 dir. Tek hücreli *C. reinhardtii*, *A. thaliana*'ya kıyasla daha basit bir organizmayı temsil etse de *C. reinhardtii*, 'nin genom boyutu yaklaşık olarak *A. thaliana* ile aynıdır (Gutman ve Niyogi 2004). Tanaka vd. 2013'te yaptıkları çalışmayla *A. thaliana* 'daki Sec24B proteininin polen çimlenmesi ile ilişkili olduğunu bulmuştur.

CrSEC24B	-----MYAPRPGAPPGGMPP--APGGFG-----APPPFPGG-----	29
AtSEC24B	MAAFVPPGGAYRPNNNQNSGGPPNFVPGSQGNPNSLAANMQLNINRPPFPMPGSGPRPS	60
CrSEC24B	-----PGGPPP-GPGGFGAPFPPPGGGFAPSM-----	56
AtSEC24B	BFFGQSPQSFPPQQQQQPRPSPMARPGPPPAAMARPGGEPQVSQPGGFFVGRFVAPPS	120
CrSEC24B	-PPPPGGAPLNQAFGAMSIGGPPGAPPGGMPPPGGMIGMPPAPPF---MQGGMPPPP	111
AtSEC24B	NQPPFGGRPSTGP---L-VGG-GSSFPQGGFPASGPPGGVPSGPPSGARPIGFGSPPPM	175
CrSEC24B	GP-PGMPPPPGPPGMPPPPSPPGMAPLGGFPSSNAVPLNMPVSPSPSQHSGALMGVPPQQH	170
AtSEC24B	GPGMSMPPPSGMPGGPLSNGPFPSSGMHGGHLSNGP-----	210
CrSEC24B	GMQQQQHGMPPSPNG-----MMPPPPGPPGSMRPPGPPGMPPPPGAPYGAFFPGPP---	221
AtSEC24B	----PPSGMPPGGPLSNGPFPFMGGPAGFPGRSQFTSGPMMAP---PPPYGQPPNAGPFTG	263
CrSEC24B	----GMPPPPGPPGGFPPPGMPGGFPPPGAYPPGMPPPPGPPGMGPPGMGFPFPPGPPGM	277
AtSEC24B	NSPLSSPPAHSIPPTNFPFVYGRPPMPGGFFPYGAPPQQLPSAPGTFS-----IYGM	317
CrSEC24B	PPPPGQQRPAQASGAGAGAPGSSRIDPSQIPRÉVAQPASSEMLVÉDTRIAGGHNLPPAASS	337
AtSEC24B	-----GPMQNQSMTSVSSPSKIDLNQIPRPG---SSSSPIVYETRVENKANFPPTTV	367
CrSEC24B	RFVVRDRGSCSPRYLRATLNVHPHSPPELLGNAAMPLALVVSPLALPDPGDDPIQIVDVTE	397
AtSEC24B	DYITRDTGNSSPRYMRCTINQIPCTVDLLSTSGMQLALIVQPMALSHPSEEPQVVDVDFGE	427
CrSEC24B	SGFVRCGRCHAYMNPWMRWIASGRSFTICNFCGLSNNTPDHYFCHLSPDGRRRDADERPEL	457
AtSEC24B	SGFVRCSCRKGYVNFMKFIDQGRKFCINLCGYTDETPDYQCNLGPDGRRRDADERPEL	487
CrSEC24B	CRGTVEYLASKEYVFRPPMQPTHVELIDVSTAIATGATASLGRAVAALDRVQGGPRAE	517
AtSEC24B	CRGTVDVATKEYMVRDEMPAVYEFELIDVSMNAIQTGATAAACSAIQCVLSDLEFEGPRAE	547
CrSEC24B	VGIATYDSAVHFYSVRSPPAQPMLVMSDVNDVFAPTSGKLLMELEEYREQLKELLEGLL	577
AtSEC24B	VGIATFDSTIHFYNLKRALQQLMIVPVDQDVYTPLETDVIVQLSECRQHLFILLESLI	607
CrSEC24B	AMWANNRINENCAGAAIEAAIDLLKPGGGKRVHAFVASLPAVGVHAIKPREATG----LG	632
AtSEC24B	TMFQESKSPESAFGAAVKAAFLAMKSTGGKLMVFSQSVLPVSVGIGALSSEADGRANASAG	667
CrSEC24B	EKDKLSYLVSQDNTLRLSLATTAAADHMCVDLSVLGGQGVVDIASLSDLAIVTGGTVVSYTE	692
AtSEC24B	EKEAHKLLQPADKTLRMTAEFAEYQVCVDLFTTTCAYVDMASISEIPIRTTGGQVYCYVE	727
CrSEC24B	VSEVNDQDQLVNDLSNNV ARQQLEAVMRYRCSSGLDVEYSYSGHCYRPAIEDVYVLEAVI	752
AtSEC24B	FSALSOPPKLYNDRWNITRPQLEAVMRYRCSSGQIGVQCEYSNGECKR-APTDDLEAII	786
CrSEC24B	VDKALRLTLTEKLPASSEAYVQRALLATNVAGQVRVRLALPVI DNI STVFKGADY	812
AtSEC24B	VDKAIMTLKHDDKLDGAEQGGFQCALVYTESGERRIRVNLNLSIPGIMMLSNLFRSADY	846
CrSEC24B	DAQICALGRRVAVALQGQQLGACRELVSAAVVATLYAYRRYCASSSSAVQLILPEALKI	872
AtSEC24B	DSQFACMLKQAANEIPS-KALPLVKEQATNDCITILHSYRKFCATVITSTGQLILPEALKI	905
CrSEC24B	LPLYALSLLKGAGLKDNVKKPDDRALWITQMGCLPCSRVG PLLYPRLLPLGRMLAEAAEDN	932
AtSEC24B	LPLYTLALTkgvGLRMDGRIDDRSFWINHVSLSLSTPLAIE LVYPRMIAVHDLDDANDNEEN	965
CrSEC24B	CTAADGNTFEGLTLSSESLESGGVSLLENGYEAILYLDRAVPQQLLHDLGVPVSYDELLR	992
AtSEC24B	VV-----PCPIPLQSEHLSDEGVYFLENGEDGLIYIGESVNSDILQKLENVRSAAELPS	1019
CrSEC24B	QPAAVSLLPRDSWPNRLLLDLLTKVRLQRSSFMRLRVARKGDPAESAFF-AMLVEDRSTA	1051
AtSEC24B	QY----VLQKYDNQLSKKFNDDVNEIRQRSSYLRIKLCCKGDFAGNMLFQSYMVEDRSGG	1076
CrSEC24B	GMSYVEYLQCIHRLIQNKMG	1071
AtSEC24B	GASYVDFLVSVHRQIQHKLN	1096

Şekil 4.3. CrSEC24B ve AtSec24B protein dizililerinin hizalanması; (*): Eşleşen aminoasit; (.): Korunmuş aminoasit; (:): Yarı korunmuş aminoasit; **Yeşil:** Sec23/Sec24 zinc finger; **Kırmızı:** Sec23/Sec24 trunk domain; **Mavi:** Sec23/Sec24 beta-sandwich domain; **Sarı:** Sec23/Sec24 helical domain; **Mor:** Gelsolin repeat domain

Bi vd. (2002) *Saccharomyces cerevisiae*'de yaptıkları çalışmayla Sec24p (ScSec24p) proteinin Sec23p'e bağlanma bölgesinin FLP motifi olduğunu göstermiştir. Bu bölge FXP şeklinde diğer organizmaların Sec24 protein dizilerinde korunmuştur. *C. reinhardtii*'deki bu bağlanma bölgesini tespit etmek amacı ile CrSEC24B'nin ScSec24p ile hizalanması yapılmıştır ve bulunan bağlanma bölgesi FAP motifidir Şekil 4.4' te de gösterilmektedir.

CrSEC24B	GGAPLNQAFGAMSIGGPPGAPPPPGGMPPPGGMIGMPPAPPGMQGGMPPPPGPMPPPP	120
ScSec24p	-----	0
CrSEC24B	GPPGMPPPPPPPGMAPLGGFFSNVAVPLNMPVSVSPPSQHSALMGVPPQQHGMQQQHGMP	180
ScSec24p	-----MSHHKKRVYPOAQLQYG-----QNATP	22
CrSEC24B	P-SFNGMPPPPPPGPPGSMRPPGPPGMPPPPGAPYGAAPPGPPGMPPPPPGPPGFFPP	236
ScSec24p	LQQPAQFMPP-Q-----DPAAAGMSYQGMGMPQGAVPVSMGQQQLTPAQEQ	68
CrSEC24B	-----GMPGGPPPPPGAYPPGMPPPPPGPPGMPGPPGMPGPPPPGPPGMPPPPP	281
ScSec24p	LHQIQDQATTSMNDMHLNVLVDFNAYM-----QPQVFPVQMGTP-----L	109
CrSEC24B	GQQRPAQASGAGAPGSSRIDPSQIPRPVAQPASSEMBLVDTRIAGGHNLPP-----AAS	336
ScSec24p	QQQQPMAAPAYQPSA---AMGQNMRRPMNQLYPIDLLTELPPPIITDLTLPPLVPIPE	166
CrSEC24B	SRFVVRDRGSCSPRYLRATLNHVPHSPELLGNAAMPLALVVSPLALPDPGDDPIQIVDVT	396
ScSec24p	RMLVPSSELSNASPDYIRSTLNVAVKNSLLKKSKLFPGLVIRPYQHLVDDIDPPL--NE	224
CrSEC24B	ESGIVRCGRCPAYMNPWRWTASGRSFTCNFCGLSNNTFDHYFCHLSLSPDGRRRDADERPE	456
ScSec24p	DGLIVRCGRCRSYMNPFFVTFEQGRWRRCNFCRLANDVEMQMDQSDPN--DPKSRVDRNE	282
CrSEC24B	LCRGTVVEYLASKEYVFRFPNPFHVFLLIDVSTALATGATASLCRAVAALDRVGG-GPR	515
ScSec24p	IKCAVMEYMAPKEYTLRQEPFATVYCELIDPSQSSIKGSLATTINTLQLNLSIPNDR	342
CrSEC24B	ALVSIATIDSAVHFYSRSESA-----AFQHLVMSDVNDVWVTSKSLINELEETREQ	568
ScSec24p	TRYSILCYDNALHYFKIRLDSENNEESADQINMMDIADIEEELI--RENSMGVSLKACRA	402
CrSEC24B	LKELLEGLEPAMNANRINENCSGAATEAAILDKPFGGSKYHAFVASLEPAVGVRAKLPRE	628
ScSec24p	IFTLTKIPQIQSNLITNFALGPALKSAYHLGGVGGKIVVSGTLFNLGIGLQRNE	462
CrSEC24B	KELGKDK-LSYLVSQDNTLRSLATTIADHRMTCVDLSVLGGYVDIASLSDLAVTIGST	686
ScSec24p	SGVNTSKETAQLLSCQDSFYKQFTIDCSKVQITVDLFLASEDYMDVASLSNLSRFTAGC	522
CrSEC24B	VSYVFPVSPVNDP--DQLVNDLSWNARQQSLSAVGVSCTSSGLWESYKSECTEDPAE	744
ScSec24p	THFYVPGFSGKQNPDIKVFSTEFARHISMDFCLETVMGARGSTGLRMSRYGHFNSSSH	582
CrSEC24B	IVVLEAVDCDRALLARLTLEKLPAGEAVVQAALLYTNVAGSRVIEVHTLALSWDNIS	804
ScSec24p	IAFS--IWRKQSYLFEVWDESL--HAYVGVGQVYLISLMSQRASTVYLAHETSESL	640
CrSEC24B	IVVLEAVDCDRALLARLTLEKLPAGEAVVQAALLYTNVAGSRVIEVHTLALSWDNIS	804
ScSec24p	IAFS--IWRKQSYLFEVWDESL--HAYVGVGQVYLISLMSQRASTVYLAHETSESL	640
CrSEC24B	IVFKGADLDAQICALGRRVAVALQGQOPLGACRELVSAAVVATLYAYRRYCA--SSSSAV	862
ScSec24p	EVYASADQLAIASFYNS--KAVEKALNSSLDDARVLINKSVQDILATYKKEIVVSNTAGGA	699
CrSEC24B	QLILPEALKLLPLYALSLLKGAAGLKDQNVKPD--DRALWITQMGCLPCSRYGPLLPRLLPL	921
ScSec24p	PLRLCANLRMFPLLMHSLTKHMAFRSGIVPSDHRASALNNLESPLKYLTKNIYPDVYSL	759
CrSEC24B	GRMLAEAAEDNCTAADGNIF-----EGLTLSSESESGGVSLLENGYEAILYLDRAVPQ	975
ScSec24p	HMADEAGLPV-QTEDGEATGTIVLPQFINATSSLFERYGLYLIDNGNELFLRMGGDAVE	818
CrSEC24B	QLLHDLGVPVSYDELLRQPAAVSLLPRDSWPNRLLDLLLKVRLQR-----SSFMRLRVA	1030
ScSec24p	ALVFDVFGTQDIFDIPIGKQEIIPVENSEFNQRV--RNIINQLRNHDDVITYQSLYIVRGA	877
CrSEC24B	RKGDPAES-----AFFAMLVEDRSTAGMSYVEYLCQIHRLIQNKMG	1071
ScSec24p	SLSEPVNHASAREVATLRLWASSTLVEDKILNNEYSREFLQIMKARISK---	926

Şekil 4.4. CrSEC24B ve ScSec24p protein dizilerinin hizalanması; (*): Eşleşen aminoasit; (.) : Korunmuş aminoasit; (:): Yarı korunmuş aminoasit; **Yeşil**: Sec23/Sec24 zinc finger; **Kırmızı**: Sec23/Sec24 trunk domain; **Mavi**: Sec23/Sec24 beta-sandwich domain; **Sarı**: Sec23/Sec24 helical domain; **Mor**: Gelsolin repeat domain; **FAP-FLP**: SEC24 proteinini SEC23 proteinine bağlandığı düşünülen motif dizisi

4.1.2. *C. reinhardtii*'de SEC24B proteinin hücre içi lokalizasyonu sonucu

Proteinin hücre içi yerleşim yerinin belirlenmesi amacı ile Predalgo ve Target P biyoinformatik veri tabanları kullanılmıştır. PredAlgo veri tabanı üç hücrel bölme için (mitokondri, kloroplast ve salgı yolu) bir skor hesaplamaktadır. Bu üç skor belirli bir puanlamanın altında olduğunda, protein "Diğer" (O) kategorisine yerleştirilir. Şekil 4.6-A'da gösterildiği gibi Predalgo veri tabanının tahmini sonucuna göre SEC24B proteininin üç hücrel bölgedeki puanlaması düşük olduğu için diğer kategorisine tahsis edilmiştir. Bu sonuçlarla SEC24B proteinin hücre içi lokalizasyonuna dair bir tahmin yürütülemez. Target P programında ise mitokondriyel hedefleme peptidi ve sinyal peptidi olmak üzere iki hücrel bölme için skor hesaplanır. Şekil 4.6- B'de verilen Target P veri tabanının tahmini sonucunda mitokondriyel hedefleme peptidi bulunamamıştır. Sinyal peptid skoru da düşük olduğundan dolayı proteinin hücre içi lokalizasyonu diğer kategorisine yerleştirilmiştir. Kullanılan iki biyoinformatik veri tabanı da SEC24B proteinini hücre içi lokalizasyonunu tahsis edememiştir.

A	Name	Mscore	Cscore	SPscore	Target	mTPlength	cTPlength	spTPlength
	SEC24B	0.0009362	0.0013308	0.0000004	O	59.870982	74.001287	99.996391

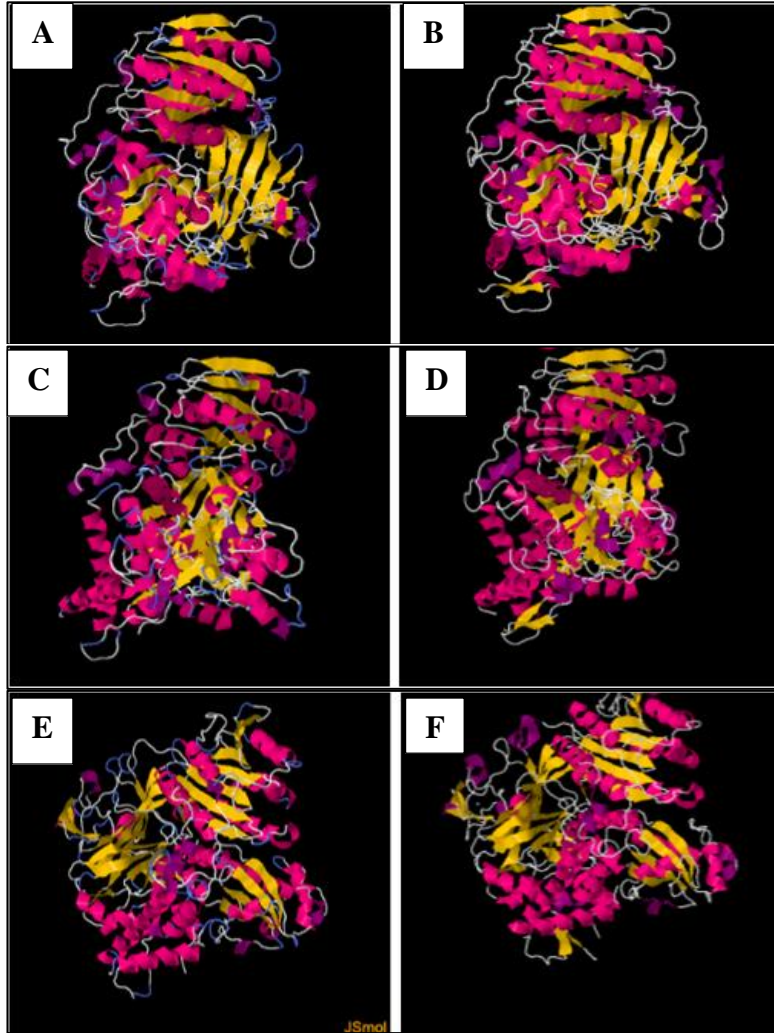
B	CrSEC24B Prediction: Other			
	Protein type	Other	Signal peptide	Mitochondrial transfer peptide
	Likelihood	0.9959	0.0041	0

Şekil 4.6. CrSEC24B proteininin hücre içi yerinin olası sonuçları; **A)** Predalgo programının tahmini sonucu; **Mscore:** mitokondri skor; **Cscore:** kloroplast skor; **SPscore:** salgı yolu skor; **O:** Diğer kategorisi; **mTPlength:** mitokondri transpeptidi; **cTPlength:** kloroplast transpeptidi; **spPlength:** salgı yolu transpeptidi; **B)** Target P programının tahmini sonucu

4.1.3. Protein homoloji modellemesi sonucu (Üç boyutlu yapısı)

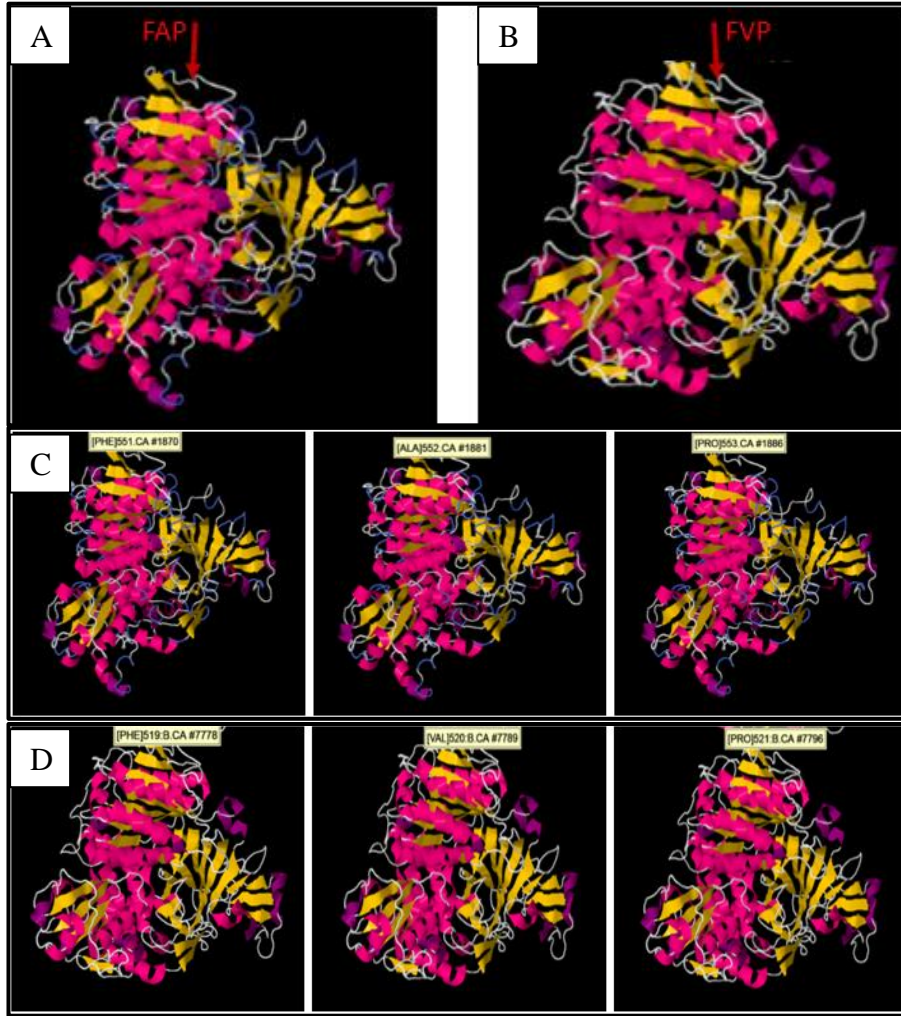
SEC24B protein dizi bilgisi Phyre2 veri tabanına verildiğinde proteinin üç boyutlu yapısı ve bu bilgiyi içeren link ve pdb dosyası e-posta olarak gönderilmektedir. Bu şekilde elde edilen model JSmol programında elde edilen 3D görüntüsü Şekil 1.1'de gösterilmektedir. Modellenme yüzdesi %100 güven düzeyinde ve veri tabanındaki c3eg9b proteini (*H. sapiens* Sec24D) model olarak kullanılmıştır. C3eg9b (*H. sapiens* Sec24D) proteini ile %70 oranında benzerlik göstermektedir. Tahmini bu modelle göre, yapıda sıklıkla α -heliks zincirlerinin olduğu belirlenirken (pembe ve mor renkli) az sayıda da β tabakalı yapıların (sarı renkli) sayıda da β tabakalı yapıların (sarı renkli) bulunduğu Şekil 4.7-A' da gösterilmektedir. Şekil 4.7 incelendiğinde *C. reinhardtii*'nin SEC24B

proteininin tahmini 3D konformasyon görüntüsü ile c3eg9b proteininin kristal yapısı arasında belirgin farklılıklar bulunmadığı görülmektedir.



Şekil 4.7. *C. reinhardtii* SEC24B proteinine ait tahmini 3D konformasyonu ve *H. sapiens*'deki c3eg9b pdb kodlu (Sec24D) proteininin kristal yapısı; **A:** CrSEC24B proteininin tahmini 3D konformasyonunun önden görüntüsü; **B:** c3eg9b proteininin kristal yapısının önden görünüşü; **C:** CrSEC24B proteininin tahmini 3D konformasyonunun yandan (90° çevrilmiş) görüntüsü; **D:** c3eg9b proteininin kristal yapısının yandan (90° çevrilmiş) görüntüsü; **E:** CrSEC24B proteininin tahmini 3D konformasyonunun arkadan (180° çevrilmiş) görüntüsü; **F:** c3eg9b proteininin kristal yapısının arkadan (180° çevrilmiş) görüntüsü

C. reinhardtii'de SEC24B proteininin tahmini 3D konformasyon yapısında ve c3eg9b proteininin 3D yapısında bu proteinlerin SEC23 proteinine bağlanma bölgeleri Şekil 4.8 'de gösterilmektedir. Bu şekil incelendiğinde *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininin üzerinde bulunan SEC23 proteinine bağlanma bölgesi olan FAP (Fenilalanin-Alanin-Prolin) motifinin ve c3eg9b proteininin üzerinde bulunan SEC23 proteinine bağlanma bölgesi olan FVP (Fenilalanin-Valin-Prolin) motif dizisinin bulunduğu bölgeler benzerdir.


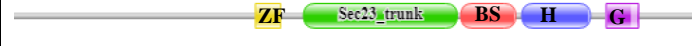






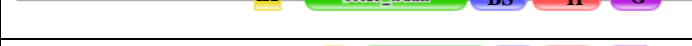


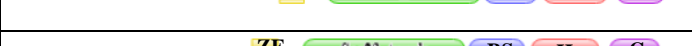




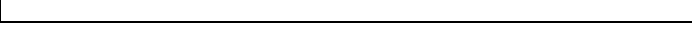


Şekil 4.8. *Saccharomyces cerevisiae*'de Sec24p proteininin Sec23p bağlandığı FVP motif dizisinin *C. reinhardtii*'de SEC24B ve *H. sapiens* SEC24D tahmini yerinin 3D konformasyonunda belirlenmesi; **A-C:** *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininin üzerinde bulunan ve SEC23'e bağlandığı bilinen FAP (Fenilalanin-Alanin-Prolin) motif dizisi; **B-D:** *H. sapiens* SEC24D proteininin üzerinde bulunan SEC23'e bağlandığı FVP (Fenilalanin-Valin-Prolin) motif dizisi

4.1.4. SEC24 ortologlarının tahmini domain bölgelerinin sonucu

Bir protein domaini, protein zincirinden bağımsız olarak işlev yapabilen, gelişebilen, istenilen etkileşimi sağlayabilecek özgül 3 boyutlu yapının oluşmasını sağlayan küçük polipeptidleri ifade eder. Domainler üç boyutlu kompakt bir yapı oluşturur ve stabildirler. Moleküler evrimin yapı taşları olarak domainler kullanılabilirler. Ayrıca domainler farklı fonksiyonlara sahip proteinler oluşturmak için farklı düzenleme ile yeniden birleştirilebilirler. Genel olarak domain alanların uzunluğu yaklaşık 50 amino asit ile 250 amino asit arasında değişir (Xu ve Nussinov 1998). Bazı organizmalarda SEC24 ortologlarının pfam veri tabanında yer alan domainleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Organizmalardaki protein domain bölgelerinin Pfam veri tabanının tahmini sonuçları; **ZF:** Sec23/Sec24 zinc finger; **BS:** Sec23/Sec24 beta-sandwich domain; **H:** Sec23/Sec24 helical domain; **G:** Gelsolin repeat ifade etmektedir

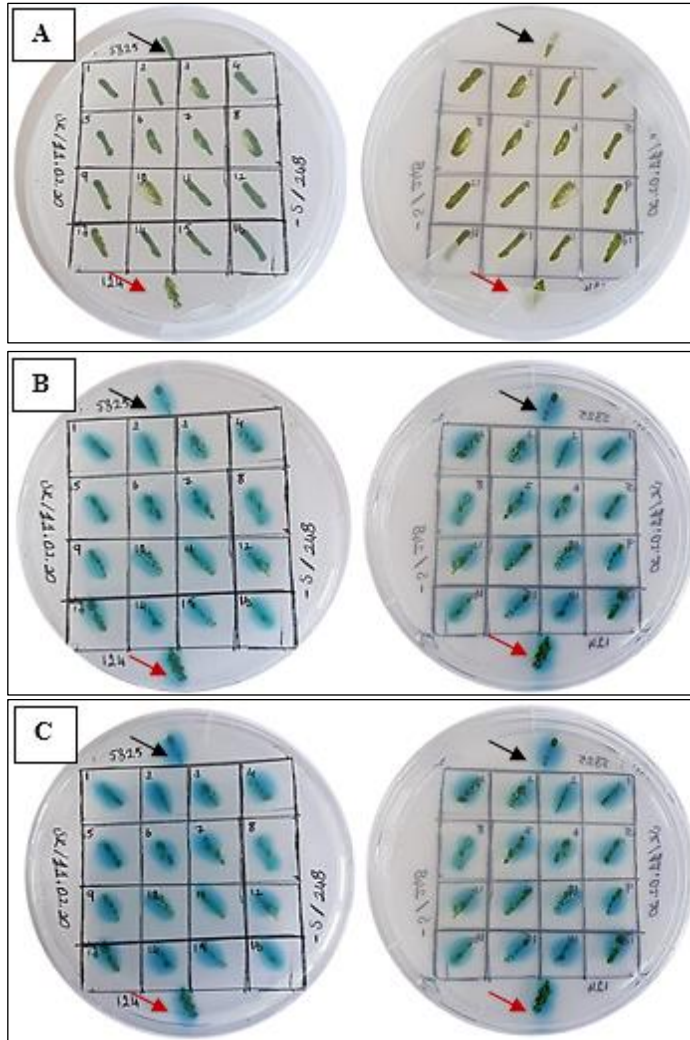
Organizma Protein Adı	Domainler	Aminoasit Sayısı
CrSEC24B		1071
CrSEC24A		1044
AtSEC24B		1096
AtSEC24A		1038
AtSEC24C		1080
HsSEC24B		1298
HsSEC24A		1093
HsSEC24C		1094
HsSEC24D		1032
MmSEC24B		1251
MmSEC24A		1090
MmSEC24C		1096
MmSEC24D		1032
ScSec24p		926
ScLst1p		876
ScIss1p		929
VcSEC24		1059

Çizelgedeki sonuçlar incelendiğinde SEC24 proteinlerinde zinc finger, beta-sandwich, helical domainleri ortak olduğu görülmektedir. Fakat *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininde ve *V. carteri*'deki SEC24 proteininde gelsolin domaini bulunmazken çizelgedeki diğer organizmalardaki SEC24 proteininde gelsolin domaini bulunmaktadır. Gelsolin domaini sitoplazmik, aktin filamentlerin uçlarına bağlanan, monomer değişimini (uç bloke etme veya kapatma) önleyen, kalsiyum düzenleyici, aktin değiştirici bir proteindir. Bu domain, Sec23 / Sec24 ailesinin üyelerinin C-terminalinde de bulunabilir (Weeds vd. 1986).

4.2. Deneysel Çalışmalar

4.2.1. Arilsülfataz aktivitesi sonucu

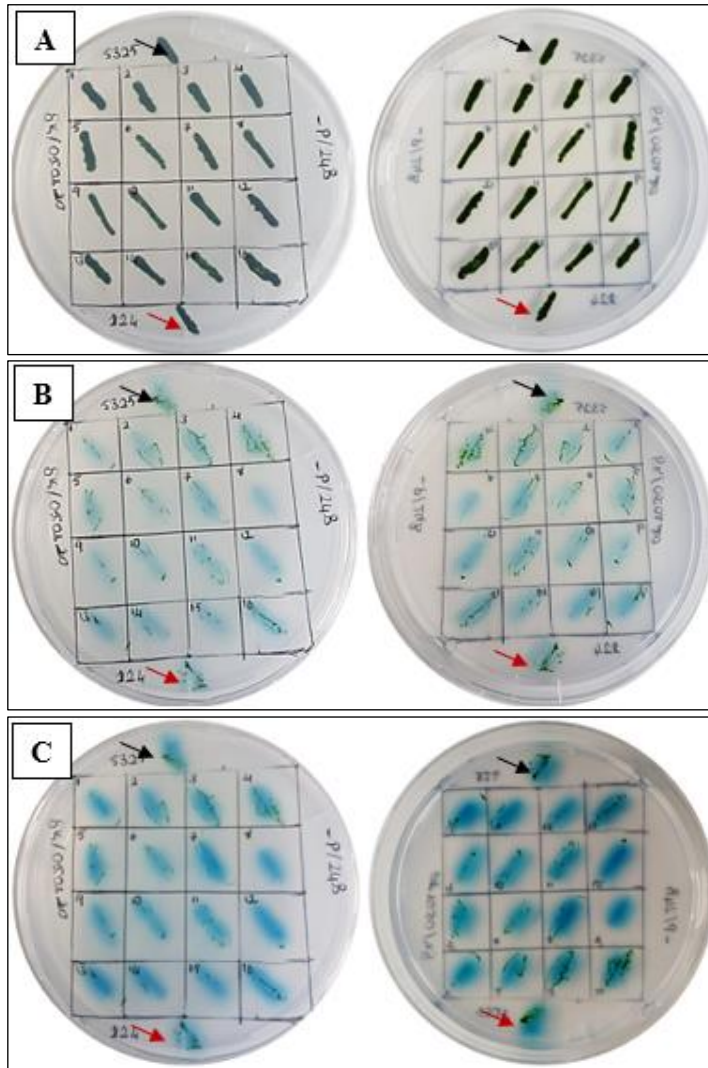
C. reinhardtii hücreleri (*sec24b* klonları, CC124 yabanıl suşu ve ebeveyn suş olan CC5325) TAP ortamında yedi gün inkübe edildikten sonra yetersiz miktarda SO_4^{2-} içeren besi ortamına aktarılmıştır. Yedi gün boyunca yetersiz miktarda SO_4^{2-} içeren katı ortam üzerinde büyütülen hücrelerin, arilsülfataz (ARS) enzimini periplazmik boşluğa veya agar ortamına salgılaması beklenmektedir. Şekil 4.9-B’de görüldüğü gibi bu enzim 5-bromo-4-kloro-3-indolil sülfataz hidrolizi alkalen aktivitesi ile mavi renkli çökelti oluşturur. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi *sec24b* mutantından elde edilen 16 tek klon CC124 ve CC5325 suşlarında aktivite testi sonucunda arilsülfataz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu aktivite testi sonucunda mutasyonun enzimlerin aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.9. Arilsülfataz aktivite testi sonucu; **A:** TAP- SO_4^{2-} (sülfat içermeyen TAP) besi yerinde yedi gün sonraki görüntüsü; **B:** *sec24b* klonları ve yabanıl suşların 30 dakika sonraki arilsülfataz; **C:** *sec24b* klonları ve yabanıl suşların 1 saat sonraki arilsülfataz aktivitesi; **Kırmızı ok:** Yabanıl tip suş; **Siyah ok:** Ebeveyn suş

4.2.2. Alkelen fosfataz aktivitesi sonucu

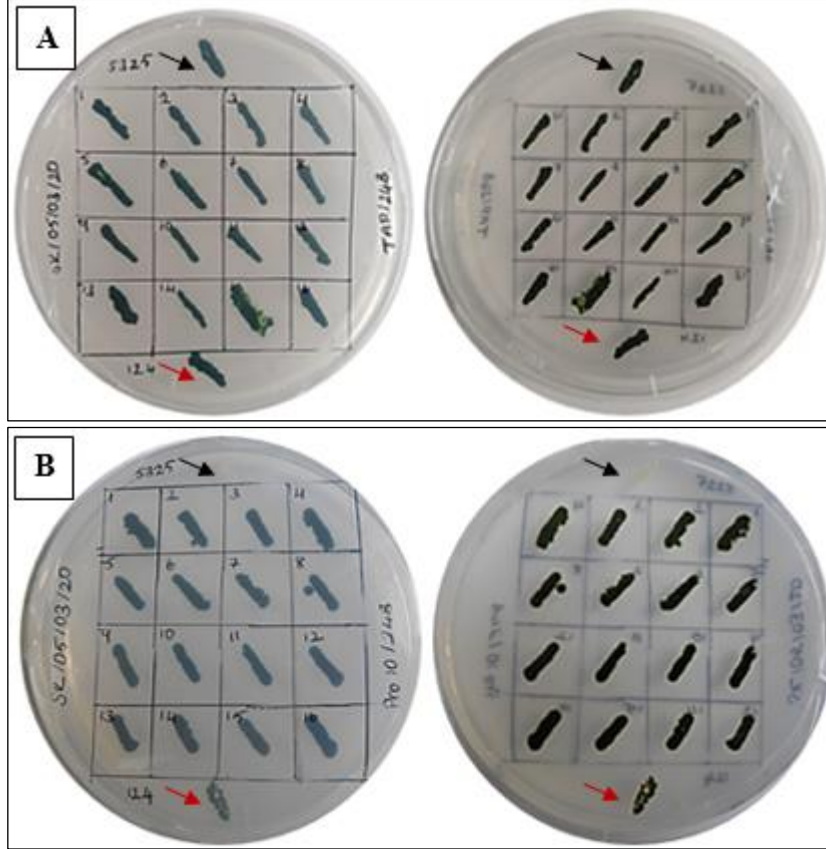
C. reinhardtii hücreleri (*sec24b* klonları, CC124 yabancı suşu ve ebeveyn suş olan CC5325) TAP ortamında yedi gün inkübe edildikten sonra yetersiz miktarda PO_4^{2-} içeren besi ortamlarına aktarılmıştır. Yedi gün yetersiz miktarda PO_4^{2-} içeren katı besi ortamında inkübe edilen vahşi tip *C. reinhardtii* hücreleri, alkelen fosfataz (ALP) enzimini periplazmik boşluğa veya agar ortamına salgılaması beklenmektedir. Şekil 1.1’de görüldüğü gibi bu enzimin aktivitesi substrat 5-bromo-4-kloro-3-indolil fosfataz hidrolizi alkelen aktivitesi ile substrat, mavi bir çökelti oluşturur. Şekil 4.10’da görüldüğü gibi *sec24b* mutantından elde edilen 16 tek koloni, CC5325 ve CC124 suşlarında aktivite testi sonucunda alkelen fosfataz aktivitesi tespit edilmiştir. Bu aktivite testi sonucunda mutasyonun bu enzimlerin aktivitesini etkilemediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.10. Alkalın fosfataz aktivitesi testi; **A:** TAP- PO_4^{2-} besi yerinde yedi gün sonraki suşların ön ve arka tabak görüntüsü; **B:** *sec24b* mutant kolonilerinin ve yabancı suşların 30 dakika sonrasındaki alkalın fosfataz aktivitesi; **C)** *sec24b* mutant kolonilerinin ve yabancı suşların 1 saat sonrasındaki alkalın fosfataz aktivitesi; **Kırmızı ok:** Yabancı tip suş; **Siyah ok:** Ebeveyn suş

4.2.3. Paromomisin direnci testi sonucu

C. reinhardtii hücreleri içerisinde yer alan CIB1 kasetinde paromomisin direnç geni bulunmaktadır. Bu insersiyon kasetinin varlığını tespitmek için *C. reinhardtii* hücreleri (*sec24b* klonları ve CC5325, CC124) TAP ve TAP-Pro besi ortamlarında yedi gün inkübe edilmiştir. Tap-Pro besi ortamında bulunan CC5325 ve CC124 suşların büyüme(üreme,çoğalma) göstermediği, *sec24b* klonlarının ise büyüme gösterdiği Şekil 4.11-B’de verilmiştir. Elde edilen veriler sonucunda *sec24b* klonlarında insersiyon kasetinin bulunduğu söylenebilir.

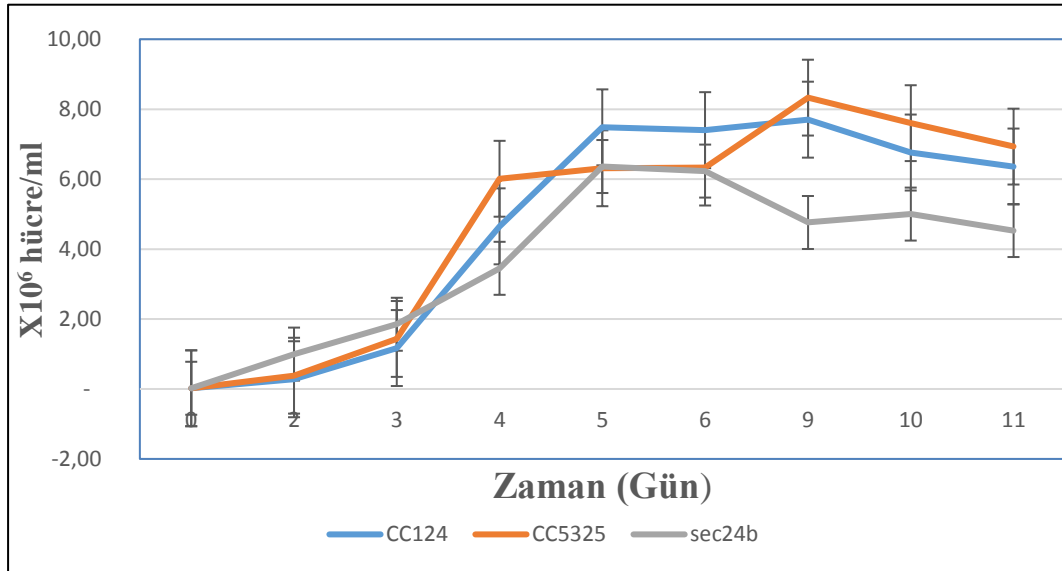


Şekil 4.11. Paromomisin direnç fenotipik testi; **a)** TAP besi yerinde yedi gün sonraki *sec24b* klonları ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125); **b)** TAP paromomisinli besi yerine inkübe edilen *sec24b* mutant klonları ve yabanıl tip suşların (CC5325, CC125) yedi gün sonraki paromomisin direnç analiz sonucu; **Kırmızı ok:** Yabanıl tip suş; **Mavi oklar:** Paromomisinli besi yerine hassas olan projeniler; **Siyah ok:** Ebeveyn tipi suş

4.2.4. Hücre sayımı sonucu

sec24b mutanı ve yabanıl tip (CC124, CC125) suşları başlangıç kültür koleksiyonundan alınmıştır. Örnekler TAP besi ortamı içeren 250 ml’lik erlenlerde, çalkalamalı inkübatörde (130 rpm) ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Örneklerin ortalama hücre sayılarını bulabilmek için örneklerden numuneler 16 gün boyunca ışık mikroskobu altında sayılmıştır. Elde edilen ortalama hücre sayıları Şekil 4.12’ de verilmiştir. Yabanıl suşların sıvı besi yerinde büyüme ve gelişmesi belirli faz

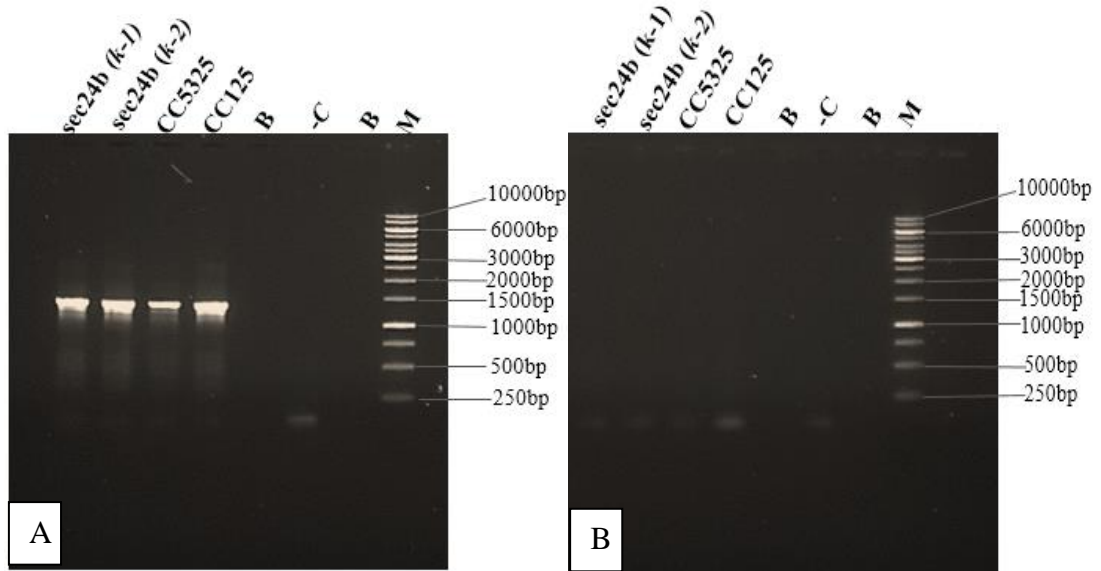
aşamalarından oluşmaktadır. İlk aşama hücrelerin yeni ortama adapte olması gereken giriş veya gecikme aşaması olarak bilinir. (lag) fazıdır. Dolayısıyla, birkaç saat boyunca hücre bölünmesi olmaz bu aşamada. Gecikme fazının uzunluğu, inoküle edilen hücrelerin fizyolojik yaşına ve yeni ortamın önceki ortamdaki ne kadar farklı olduğuna göre değişmektedir. Daha sonraki aşama, hücrenin özgül üreme oranının yeni ortama daha çok adapte olduğu fazdır. Bu fazdan sonra hücreler üstel büyümenin olduğu log fazına girerler. Bu fazda alg kültürünün yoğunluğu tüm hücrelere ışık geçirimini engelleyecek kadar yoğun değildir ve üreme için gerekli besinleri kullanarak henüz limitli üreme haline geçilmemiştir. Bir sonraki aşama, üreme hızının daha doğrusal olduğu azalan log fazıdır. Bu fazda hücreler oldukça yoğundur ve ışık yetersizliği vardır. Hücrelerin ışığın yetersiz olduğu duruma ulaşması bir üreme dengesinin elde edildiği durağan faza geçmesine neden olur. Bir sonraki aşama, alg hücrelerinin ölmeye başladığı ölüm fazıdır. Bu fazda alg, üremesini inhibe eden toksik materyalleri kültüre salmaktadır. Son olarak, hücreler ölüm oranının üstel olduğu ölüm evresine ulaşır ve tamamen ölürlür (Michelle Wood 2005). Literatürde yer alan bu bilgiler ışığında CC5325, CC124 suşları ile *sec24b* mutantının farklılıkları incelenmiştir. *sec24b* mutantının gecikme aşaması CC5325, CC124 suşlarına göre kısa sürede olduğu Şekil 4.12’de görülmektedir. CC5325 ve CC124 ortalama 3’üncü gün sonunda logaritmik faz dönemine başlarken *sec24b* mutant suş 4’üncü gün sonunda logaritmik faz geçtiği bulunmuştur. CC124, 4’üncü günde, CC5325 ve *sec24b* suşunun ise 5. günde durağan faza (stationary) ulaştıkları görülmektedir. Hücre sayısı bakımından suşları karşılaştırdığımızda, CC5325 4. günde 6×10^6 hücre/ml’ye, CC124 5. günde 8×10^6 hücre/ml’ye iken *sec24b* mutantı 5. günde 6×10^6 hücre/ml’ye ulaştığı bulunmuştur. Elde edilen veriler sonucunda *sec24b* mutantının hücre yoğunluğu ebeveyn tip suşu ile arasında büyük bir farklılık görülmemektedir.



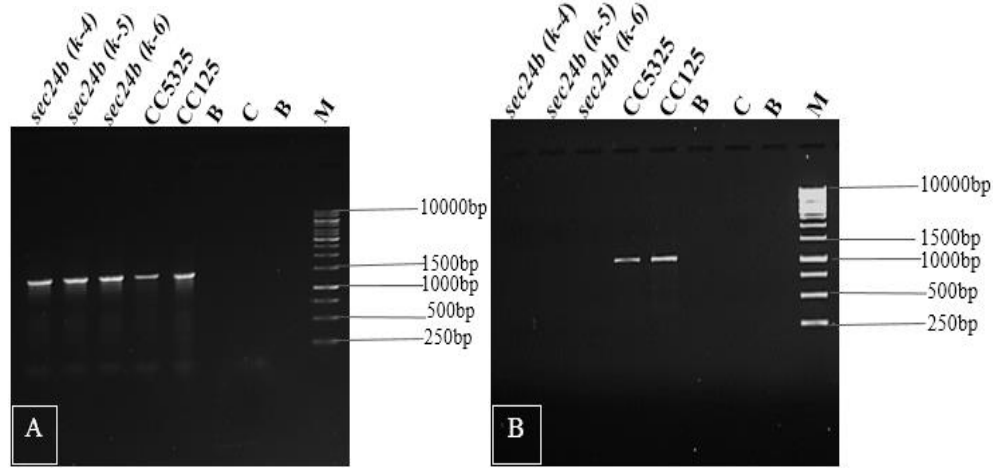
Şekil 4.12. *sec24b* mutantının ve yabanıl tip (CC124, CC125) suşlarının hücre sayımı ile oluşturulan büyüme eğrileri grafiği; Kültürler eşit miktarda hücre ile başlatılmıştır (0,02x x10⁶ hücre/ml) (Hata çizgisi standart sapmayı göstermektedir)

4.2.5. PZR ve RT-PZR sonuçları

DNA'lar PZR yardımıyla çoğaltıldıktan sonra EtBr içeren %1,'lik TAE agaroz jelinde yürütüldü. Daha sonrasında UV tabanlı jel görüntüleme sisteminde görüntüledi (Şekil 4.13-Şekil 4-14). Kontrol lokus için dizayn edilen SP24A primerlerden beklenen ürün boyutu 1415bp ve Şekil 4.13-A ve Şekil 4.14-A' daki PZR görüntüsü incelendiğinde DNA'nın ampflikasyonu gerçekleşmiş ve beklenen ürün boyutu kadar ürün elde edilmiştir. Şekil 4.13-B' de SEC24B genini saran inserisyonun varlığını belirlemek için dizayn edilen SP24B primerleri yapılan PZR görüntüsü incelendiğinde bu bölgenin ampflikasyonun *sec24b* mutant klon suşlarında, ebeveyn olan 5325 suşu ve yabancı tip olan CC125 suşlarında gerçekleşmediği görülmektedir. Amplifikasyonu gerçekleştirilebilmek için PZR aşamalarından, primerin komplementer kalıp DNA zinciriyle hibritleşmesi aşamasının sıcaklığı değiştirilerek (55 TM- 56 TM -57 TM-58 TM) yeni PZR'ler yapılmıştır. Fakat değiştirilen TM koşullarına rağmen çıkan sonuçlarda yabancı suşlar ve mutant klonlarının bu gen bölgesi için amplifikasyonu gerçekleştirilememiştir. Amplifikasyonun gerçekleşmemesinin nedenleri; primerlerin yanlış dizayn edilmesi veya gen bölgesinin yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. İnseriyonun varlığını belirlemek için kullanılan SEC24B primerleri ile yapılan PZR görüntüsü Şekil 4.14-B' de verilmektedir. Ayrıca SEC24B primerlerinden beklenen ürün boyutu 1070bp' dir. Şekil 4.14-B' deki PZR görüntüsü incelendiğinde *sec24b* mutant klonlarının DNA'sında inserisyon kasetinin varlığından dolayı ampflikasyon gerçekleşmemiştir. Ebeveyn suş ve yabancı tip suşların genomunda inserisyon olmadığından dolayı bu suşlarda DNA'nın amplifikasyonu gerçekleşmiş ve beklenen ürün boyutu 1070bp elde edilmiştir.

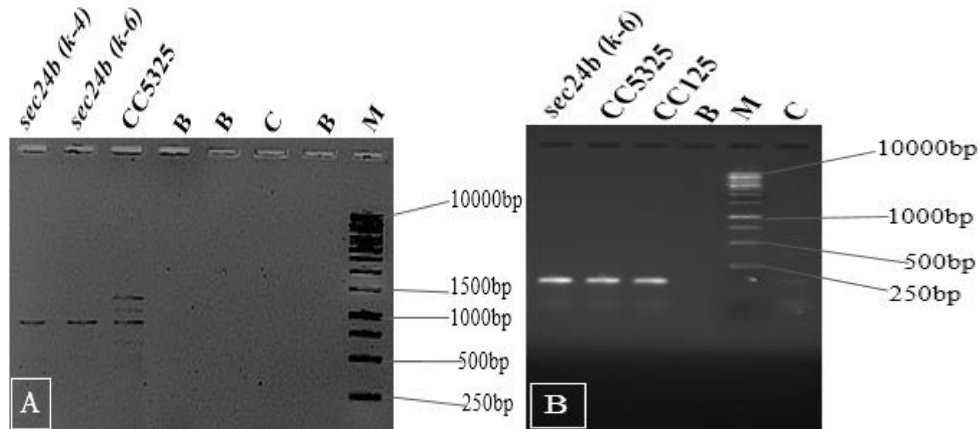


Şekil 4.13. Mutant klonları (*sec24b* (k-5), *sec24b* (k-6)) ve CC5325, CC125 suşları PZR görüntüleri; **M**: 1kb DNA markörü; **-C**: negatif kontrol; **B**: boş kuyucuğu göstermektedir; **A**: SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan PZR analizi sonucu; **B**: SP1-Int6-24B F ve SP2-9E-24B-R primerleri ile yapılan PZR analizi sonucu



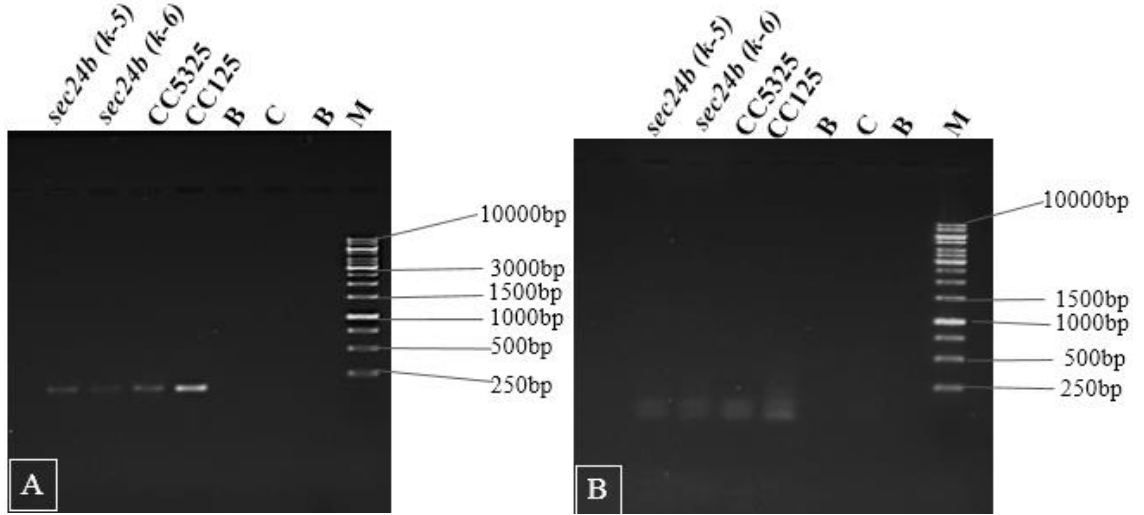
Şekil 4.14. Mutant klonları (*sec24b (k-5)*, *sec24b (k-6)*) ve yabancı tip suş olan CC125 ve ebeveyn suş olan CC5325' in PZR görüntüleri; **M:** 1kb DNA markörü; **-C:** negatif kontrol; **B:** boş kuyucuğu göstermektedir; **A:** SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan kontrol PZR görüntüsünün sonucu; **B:** *C. reinhardtii*'de *SEC24B* geninin insersiyon kasetini saran SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan PZR görüntüsü sonucu

cDNA örnekleri PZR yardımıyla çoğaltıldıktan sonra EtBr içeren %1,'lik TAE agaroz jelinde koşturularak UV tabanlı jel görüntüleme sistemindeki görüntüleri (Şekil 4.15). cDNA'ların kontrollü için kullanılan CBLP ve *SEC23A* genleri kullanılmıştır. CBLP kontrolünde kullanılan primerlerden beklenen ürün boyutu 156bp *SEC23A*' kontrolünden kullanılan primerlerden ise 756bp ürün büyüklüğünde bant elde edilmektedir. Şekil 4.15-A' da ki görüntüler incelendiğinde aynı ürün boyutu elde edilmiştir. Kısaca, CBLP ve *SEC23A* genlerinin, *sec24b (k-5)*, *sec24b (k-6)*, CC5325, CC125 suşlarında ekspresyonu vardır.



Şekil 4.15. Mutant klonları (*sec24b (k-5)*, *sec24b (k-6)*) ve CC5325, CC125 suşlarının RT-PZR görüntüleri; **M:** 1kb DNA markörü; **-C:** Negatif kontrol; **B:** Boş kuyucuğu göstermektedir; **A:** *C. reinhardtii*'de *SEC23A* geninin ekspresyon varlığının RT-PZR görüntüsünü göstermektedir; **B:** *C. reinhardtii*'de CBLP geninin ekspresyon varlığının RT-PZR görüntüsünü

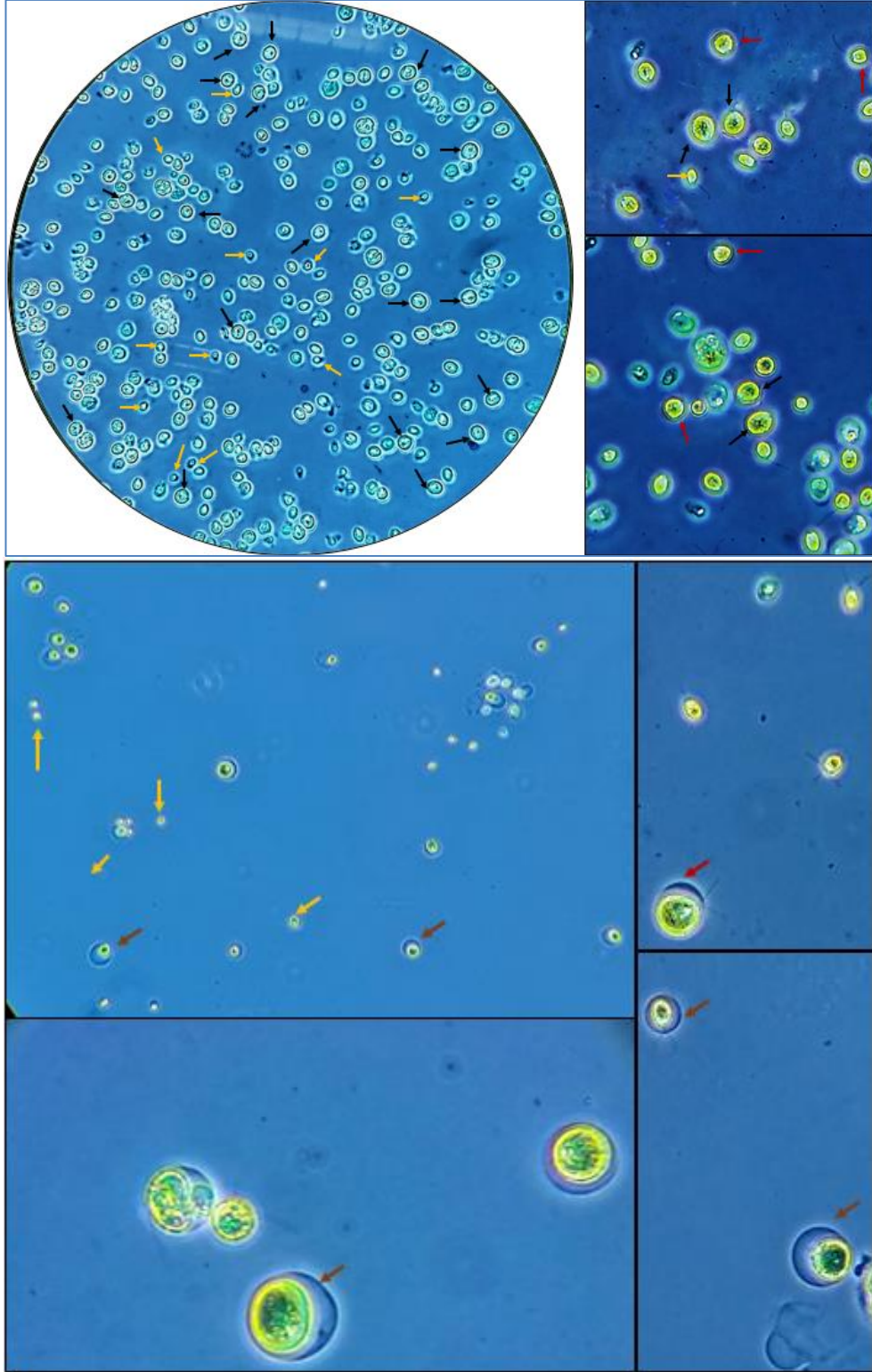
SEC24B geni için dizayn edilen SEC24B primerleri (7 -Ekzon revers, 6 Ekzon forward) RT-PZR amplifikasyonu gerçekleştirilememiştir. Amplifikasyonun gerçekleşmemesinin nedenleri; gen bölgesinin anatosyonun yanlış yapılmış olması veya primerlerin etkin çalışabilmesi için gerekli cDNA miktarının ve kalitesinin yetersizliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Şekil 4.15-B).



Şekil 4.16. Mutant klonları (*sec24b (k-5)*, *sec24b (k-6)*) ve yabancı tip suş olan CC125 ve ebeveyn suş olan CC5325' in RT-PZR görüntüleri; **M:** 1kb DNA markörü; **-C:** Negatif kontrol; **B:** Boş kuyucuk; **A:** *C. reinhardtii*'de CBLP geninin ekspresyon varlığının RT-PZR görüntüsünü göstermektedir; **B:** *C. reinhardtii*'de SEC24B geninin SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi sonucu

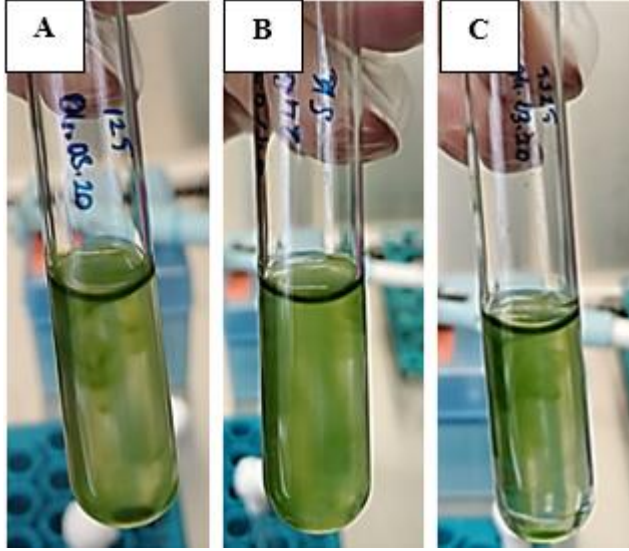
4.2.6. *sec24b* mutantının hücre yapısının sonuçları

Şekil 4.15'de *sec24b* mutantının, 13 saat azot içermeyen TAP besisi yerinde üretilmiş hücrelerinin ışık mikroskop görüntüleri mevcuttur. Şekil 4.15'deki görüntüler incelendiğinde, *sec24b* mutant hücrelerinin bir kısmının boyut ve şekil yapısı gibi bazı morfolojik özelliklerinin yabancı tip *C. reinhardtii* hücrelerine benzediği görülür iken diğer kısmında farklılıklar gözlenmiştir. Yabancı tip *C. reinhardtii* hücresi, yaklaşık 10µm uzunluğunda ve 3µm genişliğinde oval şekilindedir (Harris 2001). İncelenen bu görüntülerde *sec24b* mutantının bazı hücreleri yabancı tip *C. reinhardtii* hücrelerinden büyük ve küçük boyutta bulunurken bazı hücrelerde ise şekil olarak farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca hücrelerin etrafında balon benzeri yapılar gözlenmiştir. Elde edilen bu bilgiler ışığında SEC24B geninde bulunan insersiyonun *sec24b* mutantının hücre boyutu ve hücre şeklinde değişikliğe yol açtığı söylenebilir.



Şekil 4.17. *sec24b* mutantının, azot içermeyen TAP sıvı besisi yerinde 13 saat bekletildikten sonra ışık mikroskobu altında çekilen fotoğrafları; **Kırmızı oklar:** Anormal hücre şekillerini; **Siyah oklar:** Boyut olarak büyük hücreleri; **Turuncu oklar:** boyut olarak küçük hücreler; **Kahverengi oklar:** Hücrenin etrafındaki balon benzeri yapılar

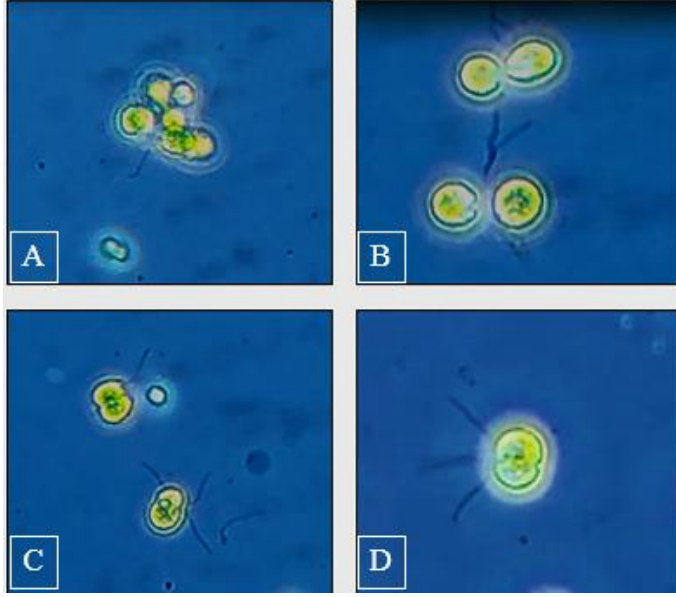
13 saat TAP azot içermeyen sıvı besi yerinde inkübe edilen *sec24b* mutanıtı ve CC125, CC5325 suşlarının Şekil 4.16 gösterilmektedir. Azot içermeyen besi yerinde strese giren *C. reinhardtii* hücrelerinin flagella hareketleri incelendiğinde, *sec24b* mutanıtının cam tüpteki flagella hareket kabiliyeti yabancı tip suşlarının hareket kabiliyetine benzemektedir. Elde edilen bu bilgi ışığında *SEC24B* geninde bulunan insersiyonun *sec24b* mutanıt suşunun flagella hareket kabiliyetinde bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.



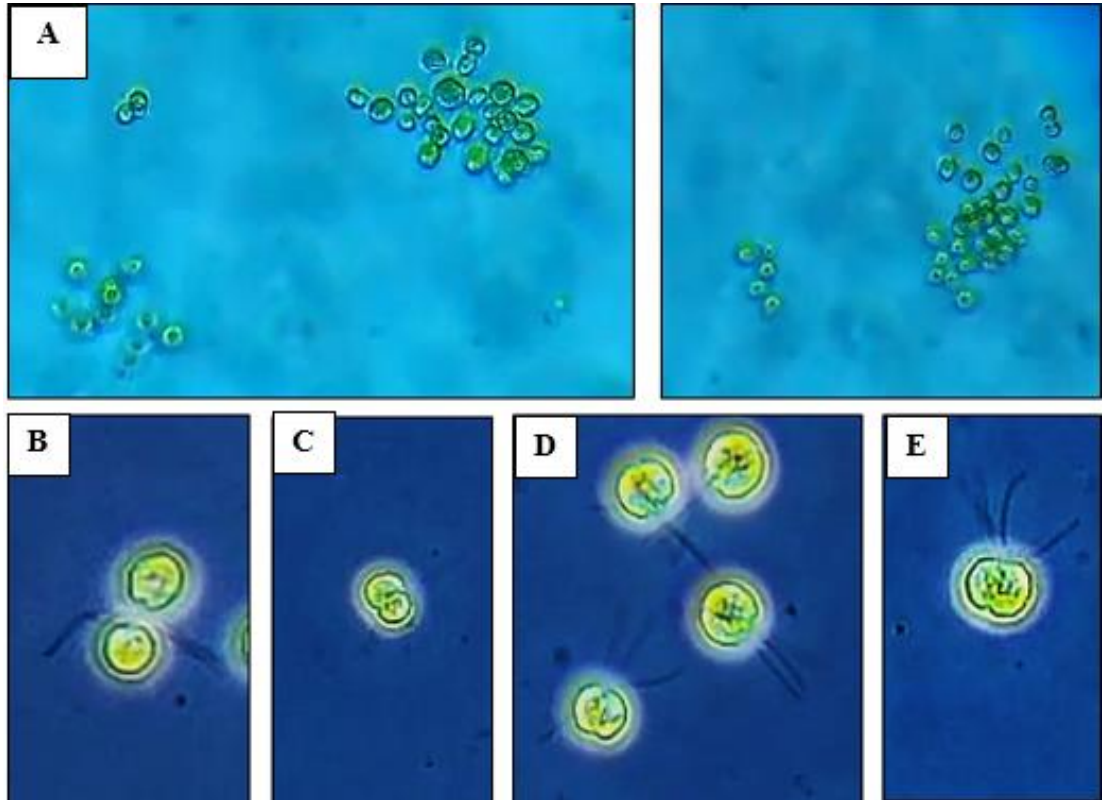
Şekil 4.18. Azot İçermeyen TAP sıvı besi yerinde 13 saat bırakılan *C. reinhardtii* hücrelerinin flagella hareketleri; **A:** CC125; **B:** *sec24b* mutanıtı; **C:** CC5325

4.2.7. *sec24b* mutanıtının eşeyli üreme döngüsünün sonuçları

sec24b mutanıtının hücreleri MT^- (eşeyli üreme tipi eksi) ve CC125 yabancı tip MT^+ (eşeyli üreme tipi artı) hücreleri 13 saat azot içermeyen TAP besi yerinde bırakıldıktan sonra çaprazlanmıştır. Çaprazlanma işlemi yapıldıktan hemen sonra ışık mikroskobu altında *sec24b* mutanıtının eşeyli üremesi incelenmiş ve çekilen fotoğrafları Şekil 4.20' de gösterilmektedir. *sec24b* mutanıtının eşeyli üremesi yabancı tip hücrelerin eşeyli üreme döngüsünün aşamaları sıralı olarak geçirmiş ve QFC'ler görülmüştür . Yabancı tip suşlar olan CC125 MT^+ ve CC124 MT^- kontrol olarak çaprazlanmış ve ışık mikroskobu altındaki görüntüleri Şekil 4.19 'de gösterilmektedir. Yabancı tip *C. reinhardtii*' nin eşeyli üreme döngüsünün aşamaları; aglütinasyon, çift oluşumu ve sinyal iletimi, hücre füzyonu, QFC (quadriflagellated cell) ve zigot oluşumudur (Harris 2009).

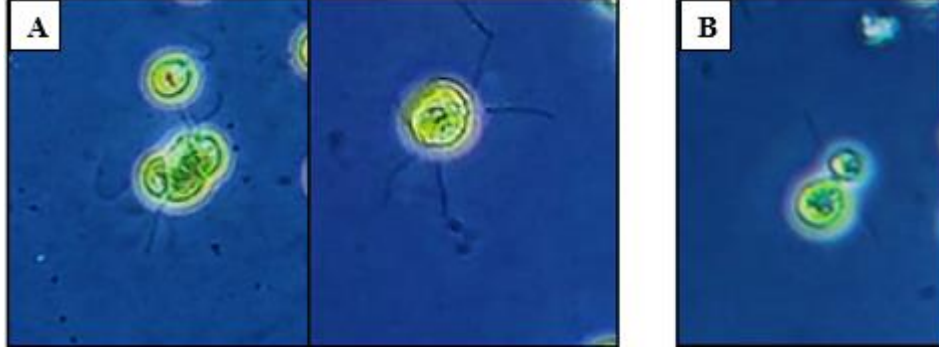


Şekil 4.19. Yabancıl tip suşların (CC125ve CC124) ışık mikroskobu altındaki eşeyli üreme aşamalarından bazıları; **A:** aglütinasyon; **B:** çift oluşumu; **C:** füzyon oluşumu; **D:** QFC (quadriflagellated cell)



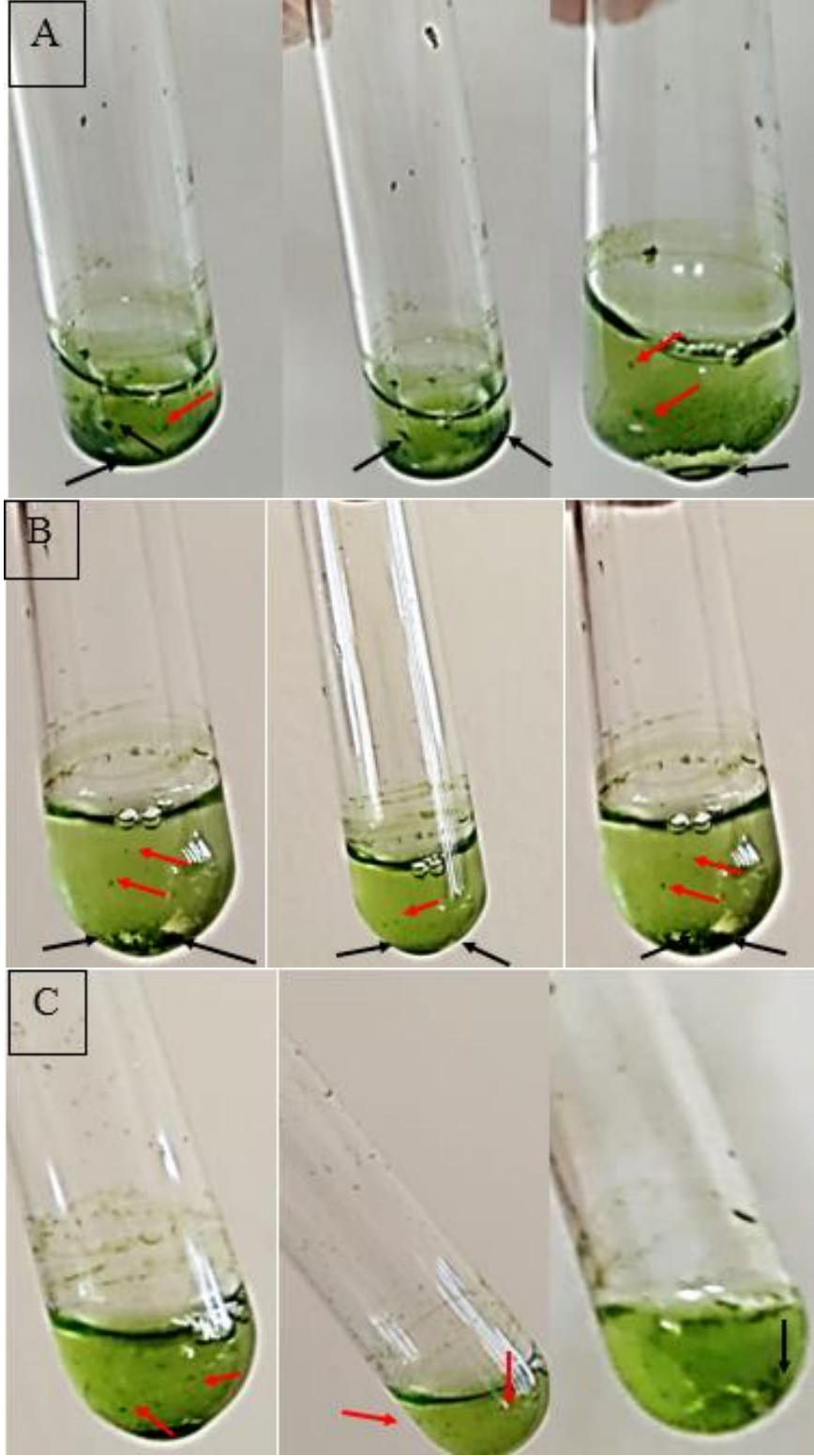
Şekil 4.20. *sec24b* mutantının ışık mikroskobu altındaki eşeyli üreme aşamalarından bazıları; **A:** aglütinasyon; **B:** çift oluşumu; **C:** füzyon oluşumu; **D:** QFC (quadriflagellated cell) **E:** QFC oluşumunu tamamlamış zigota geçiş

Şekil 4.19 görüntülerinde *sec24b* mutantının eşeyli üremesinde oluşan bazı QFC'ler de şekil olarak anormallikler görülmüştür. *sec24b* mutantının anormal hücreleri de gerçekleştiği görülmüştür. Elde edilen bu bilgiler, insersiyonun *sec24b* mutantının eşeyli üremesinde herhangi bir sorun teşkil etmediği düşünülmektedir.



Şekil 4.21. *sec24b* mutantının eşeyli üreme döngüsündeki anormallikler; **A:** Anormal QFC; **B:** Anormal hücrenin çift oluşumu

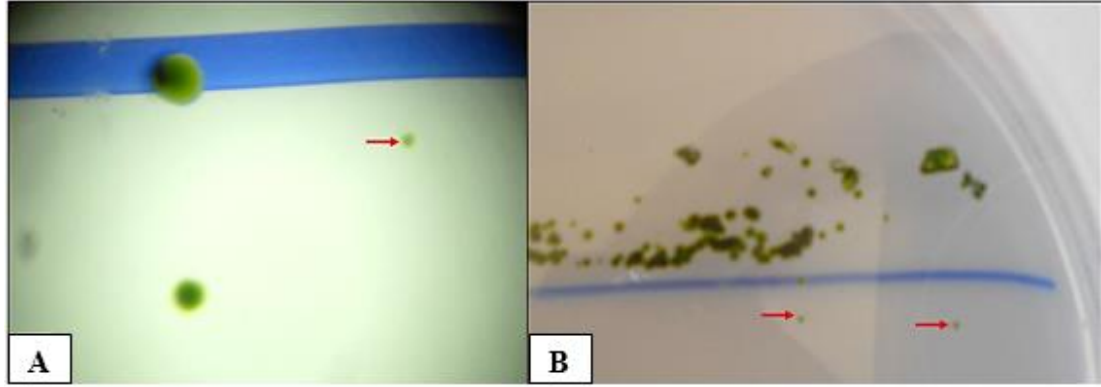
Şekil 4.20 'de *sec24b* mutanı ve CC124, CC5325 (*MT*) suşlarının CC125 yabancı tip suş ile çaprazlandıktan 1 gün sonraki zigot peleti durumunun görüntüleri mevcuttur. Yabancı suşlarda zigospore kütleleri sıvı ortamın yüzeyinde retikül bir tabaka (pelet) olarak görülür (Harris vd. 2009). Bu karakteristik yapının gözlemlenmesi çiftleşmeyi doğrular ve çiftleşme tipi testlerinin temeli olarak kullanılır *C. reinhardtii* zigospore çiftleşmeden sonraki 24 saat içinde hacim olarak büyük ölçüde artmaktadır (Harris vd. 2009). Literatürde yer alan bu çiftleşme testine bakılarak Şekil 4.20 incelendiğinde CC124xCC125 yabancı suşların zigot büyük peleti oluşumu görülmekte ve pelet cam tüpün tabanına yapışmıştır. CC5325xCC125 zigot peleti CC124xCC125 benzer şekilde zigot peleti cam tüpün tabanına yapışmış şekilde ve sıvının içinde çok fazla kum tanesinden daha büyük şekilde bulunmaktadır. *sec24b (k-6)*xCC125 ise zigot peleti kum tanesi şeklindedir ve çok az cam tüpün tabanında bulunmaktadır. Elde edilen bu bilgiler ışığında *sec24b (k-6)* mutant suşunun füzyon kapasitesi yabancı suş olan CC124 ve ebevyini olan CC5325 suşuna göre düşüktür. Bu bilgiler sonucunda *SEC24B* genindeki insersiyonun çiftleşme kapasitesini etkilediği düşünülmektedir.



Şekil 4.22. *sec24b* mutanti ve CC124, CC5325 yabancı tip suşlarının CC125 yabancı tip suş ile çaprazlandıktan 1 gün sonraki zigot peleti görüntüsü; **A:** CC124xCC125; **B:** CC5325 xCC125; **C:** *sec24b*XCC125; **Kırmızı oklar:** Kum tanesi şeklindeki peletleri; **Siyah oklar:** Büyük peletleri ifade etmekte

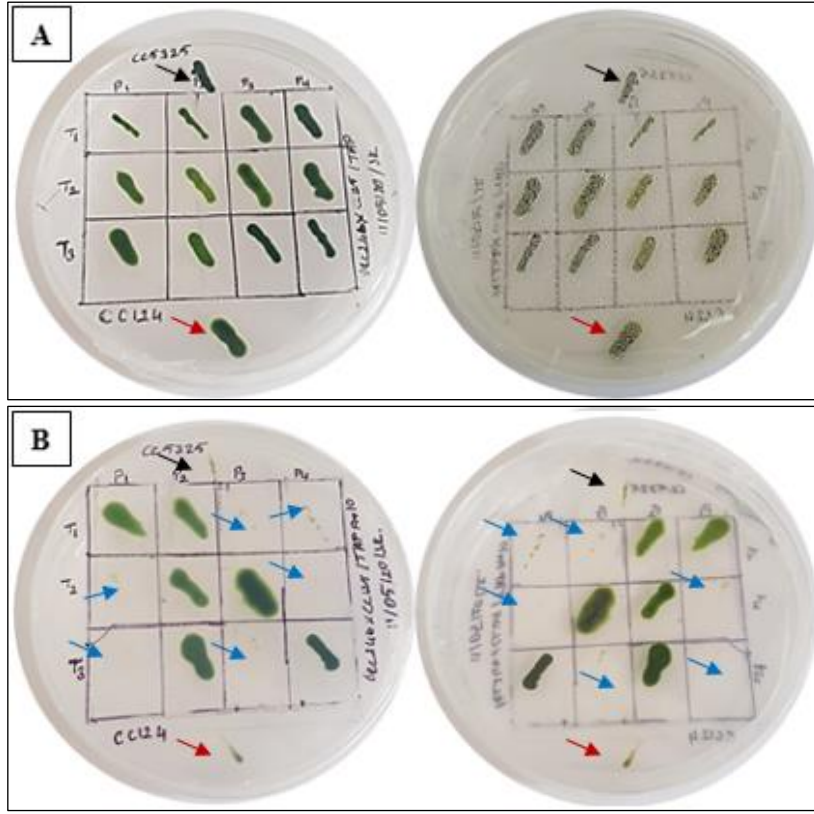
4.2.8. Tetrad analiz sonucu

Zigotların mayoz bölünmesi sonucu oluşan tetratların diseksiyonu yapılırken projenide boyut olarak küçük projeniler gözlenmiştir (Şekil 4.21). Bu projenilerin çoğunda ölümler yaşanmıştır. SEC24B proteininde mutasyon olan projenilerde ER'dan Golgi'ye protein transferinde problem olduğundan projenide normal hücrelere oranla küçük projenilerin olduğu düşünülmektedir. Bu problemden dolayı hücreler yaşamına devam edemediği düşünülmektedir.



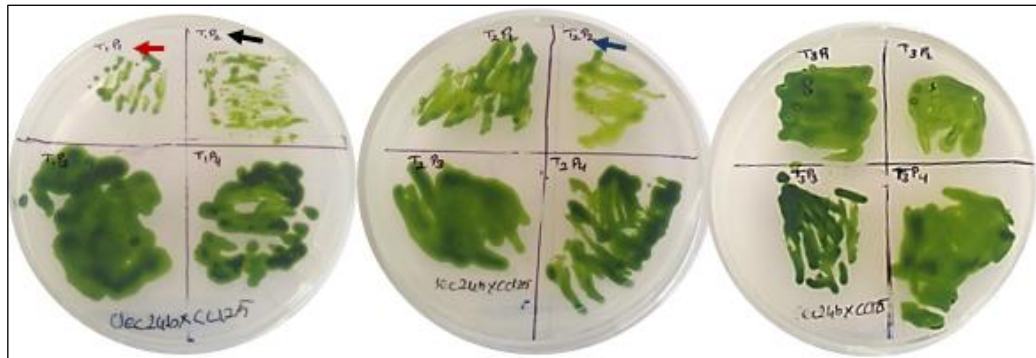
Şekil 4.23. Tetratlardaki küçük projenilerin görüntüleri; **A:** Tek bir zigota ait projenilerin mikroskop görüntüsü; iki normal büyüklükte bir de küçük projeni bulunmaktadır; **B:** A'da gösterilen şeklin uzaktan görüntüsü; **Kırmızı oklar:** Küçük projenileri gösterir

DNA molekülünde bir mutasyon oluştuktan sonra, DNA'nın bundan sonraki bütün kopyalanmalarında bu mutasyon tekrarlanacaktır. Bir hücrede bulunan mutasyon gelecek döllere geçebilmektedir. Bir gamette döllenme anında bir mutasyon varsa, zigotun bütün hücrelerinde en az DNA'sının yarısında mutasyona sahip olacaktır. *sec24b* mutantın kromozom1 içerisinde yer alan SEC24B genindeki insersiyon kaseti bulunmaktadır. Bu kasetin fenotipik testini belirlemek amacıyla içerisine paromomisin direnç geni yerleştirilmiştir. *sec24b* mutantının yabancı suş olan CC125 ile çaprazlanması sonucu oluşan projenin %50'sinde paromomisin direnç genine sahip olacaktır. Bu bilgiler sayesinde oluşan tetratlardaki projenilerin mayoz ürünü olduğunu belirlemek için paromomisinli besi yerinde 7 gün büyütülmüştür. Tetrat₁ (T₁), Tetrat₂ (T₂) ve Tetrat₃'ün (T₃) 4'lü projenisi (P) bulunmaktadır. Şekil 4.22 mevcut olan görüntüler incelendiğinde T₁' in P₁ve P₂'si paromomisinli besi yerinde hücreler büyüdüğü için insersiyon kasetini içerdiğini göstermektedir. T₁' in P₃ ve P₄'ün insersiyon kaseti bulunmadığından dolayı paromomisinli besi yerinde hücreleri çoğalamamıştır. T₂' inin P₁ ve P₄'si paromomisinli besi yerinde hücreler çoğalamadığı için dolayı ölmüştür bu sonuç göstermektedir bu projenilerde insersiyon kaseti bulunmamaktadır T₂' inin P₂ ve P₃'ün insersiyon kaseti içerdiğinden dolayı paromomisinli besi yerinde hücreleri çoğalmıştır. T₃' ün P₁ve P₃'ün paromomisinli besi yerinde hücrelerde ölmüştür bu projenilerde insersiyon kaseti bulunmadığını göstermektedir. T₃' ün P₃ ve P₄'ün insersiyon kaseti içerdiğinden dolayı paromomisinli besi yerinde hücreleri çoğalmıştır. Bu tetratların projenilerininin %50' si paramomisine dayanıklı olduğu fenotipik testleme sonucu gösterilmiştir.

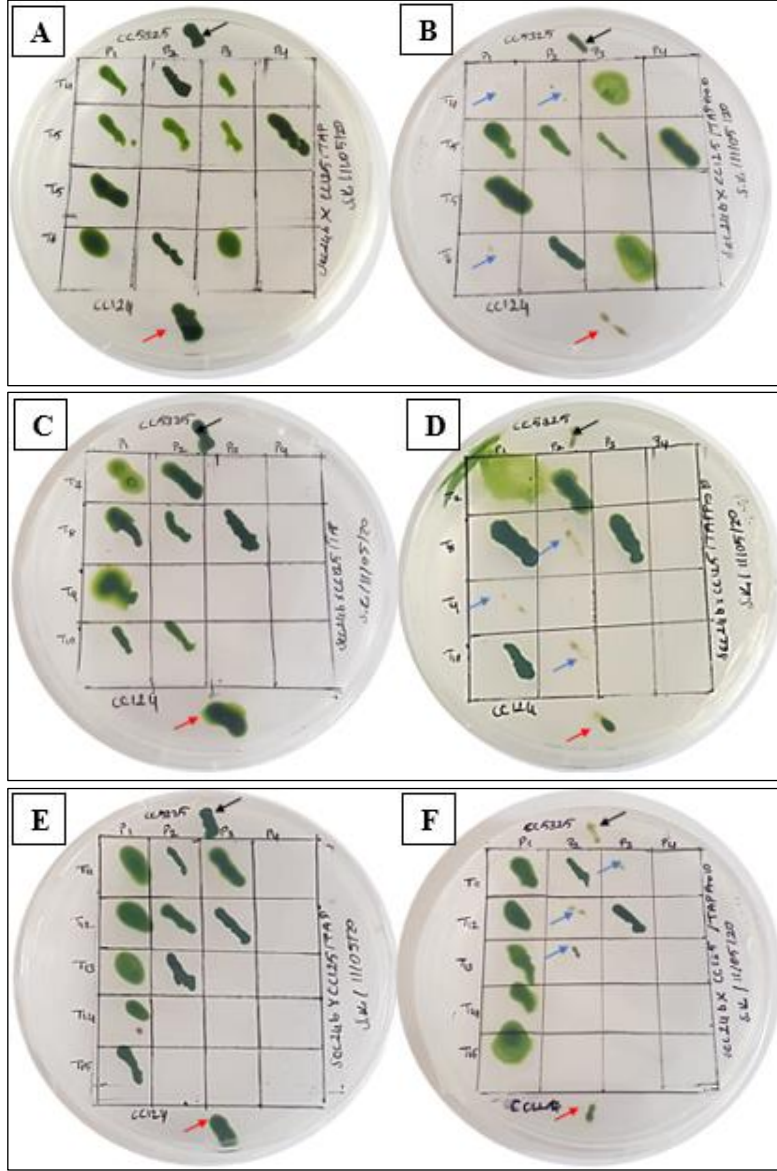


Şekil 4.24. Tetradların fenotipik paromomisin direnç testi; **A:** T₁,T₂ ve T₃ TAP besi yerinde 7 gün sonraki görüntüsü; **B:** T₁,T₂ ve T₃ TAP paromomisinli besi yerinde 7 gün sonraki görüntüsü; **Kırmızı ok:** Yabancıl tip suş; **Mavi oklar:** Paromomisinli besi yerine hassas olan projeniler; **Siyah ok:** Ebeveyn tipi suş

Şekil 4.23 mevcut olan görüntüler incelendiğinde T₁' in P₁ve P₂'si inseriyon kasetini içerdiğinden dolayı bu projenilerin büyümesi insersiyon kaseti içermeyen P₃ ve P₄'e göre yavaş olduğu gösterilmektedir. T₂'inin P₂ ve P₃'ün inseriyon kasetini içermektedir. Fakat T₂P₂ 'inin büyümesinin daha yavaş olduğu görülmüştür. T₃ 'ün inseriyon olan P₃ ve P₄ projenilerinde büyümede herhangi bir sorun görülmemektedir.



Şekil 4.25. T₁,T₂ ve T₃ TAP besi yerinde 7 gün sonraki görüntüsü; **Kırmızı ok:** T₁P₁ **Siyah ok:** T₁P₂; **Mavi ok:** T₂P₂



Şekil 4.26. Projenilerin fenotipik paromomisin direnç testi sonucu görüntüsü; **A:** TAP besi yerinde 7 gün büyütülmüş T₄ – T₆ görüntüsü; **B:** TAP paromomisinli besi yerinde 7 gün sonraki T₄ – T₆ görüntüsü; **C:** TAP besi yerinde 7 gün sonraki T₇ – T₁₀ görüntüsü; **D:** TAP paromomisinli besi yerinde 7 gün büyütülmüş T₇ – T₁₀ görüntüsü; **E:** TAP besi yerinde 7 gün sonraki T₁₁ – T₁₅ görüntüsü; **F:** TAP paromomisinli besi yerinde 7 gün sonraki T₁₁ – T₁₅ görüntüsü; **Kırmızı ok:** Yabani tip suş; **Mavi oklar:** Paromomisinli besiyerine hassas olan projeniler; **Siyah ok:** Ebeveyn tipi suş

Oluşan zigotların tetrad diseksiyonu yapıldıktan sonra bazı tetradların projenilerinde ölümler gerçekleşmiştir. Yaşamaya devam edemeyen T₉ 'un iki projensi ve T₁₀ bir projenisi çok küçük olduğundan dolayı hücreler yaşayamamıştır. Şekil 4.24' te bulunan tetradların çoğunun projenilerinde eksiklikler vardır. Bu projenilerin öldüğü düşünülmektedir.

Tetradların mayoz ürünü olduğunu belirlenmesinde diğer bir çalışma yapılan diğer bir çalışma ise tetradların çiftleşme türünün %50'sinin MT^- , %50'si MT^+ olması beklenmektedir. Tetradların eşey tipini belirlemek için 14 saat azot içermeyen TAP sıvı besi yerinde bekletildikten sonra CC125 (MT^+) ve CC124 (MT^-) ayrı olarak çaprazlanmıştır. Tetradların eşey tipine zigot peletinin oluşmasına ve göre karar verilmiştir. İncelemeler CC125 ve CC124'in zigot peleti durumuna göre kıyaslanmıştır. Bu incelemeler; T_1P_1 ve T_1P_2 'de 24 saat sonra zigot peleti görülmemiştir. T_1P_3 'de 24 saat sonra zigot peleti kum tanesi şeklinde CC125 ile oluşmuş şeklinde görülmüştür. T_1P_4 'de 24 saat sonra zigot peleti yabanıl orta büyüklükte CC124 ile oluşturmuştur. T_2P_1 ve T_2P_2 'de 24 saat sonra zigot peleti orta büyüklükte CC125 ile çiftleşmiştir. T_2P_3 ve T_2P_4 'de zigot peleti orta büyüklükte CC124 ile çiftleşmiştir. T_3P_1 ve T_3P_4 'de 24 saat sonra zigot peleti görülmemiştir. T_3P_3 ' de 24 saat sonra zigot peleti orta büyüklükte görülmüştür. T_3P_2 ' de orta büyüklükte pelet görülmüştür. T_2 ' deki inceleme sonuçları toparlanacak olursa %50'si MT^- iken %50'si MT^+ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3)

Çizelge 4.3. Tetrad analiz sonuçları; **R:** Dayanıklı; **S:** Dayanıksız; **(?):** Kesin olarak belirlenemeyen; **(*):** Kesinleştirilmiş; **(-):** Belirlenmedi (Deney 3 tekrar şeklinde yapılmıştır)

		Renk	Koloni Morfolojisi	Paro ^R	İnsersiyon (Var/Yok)	Çiftleşme Tipi (MT)
Tetrad 1						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	R	-	MT^+ (?)
	P ₂	Açık yeşil	Akışkan	R	-	MT^- (?)
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	S	-	MT^- (*)
	P ₄	Koyu yeşil	Katı	S	-	MT^+ (*)
Tetrad 2						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	S	Yok	MT^- (*)
	P ₂	Açık yeşil	Akışkan	R	Var	MT^- (*)
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	R	Var	MT^+ (*)
	P ₄	Koyu yeşil	Katı	S	Yok	MT^+ (*)
Tetrad 3						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	S	-	MT^- (?)
	P ₂	Açık yeşil	Akışkan	R	-	MT^- (*)
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	S	-	MT^+ (*)
	P ₄	Koyu yeşil	Katı	R	-	MT^- (?)

Çizelge 4.3' ün devamı

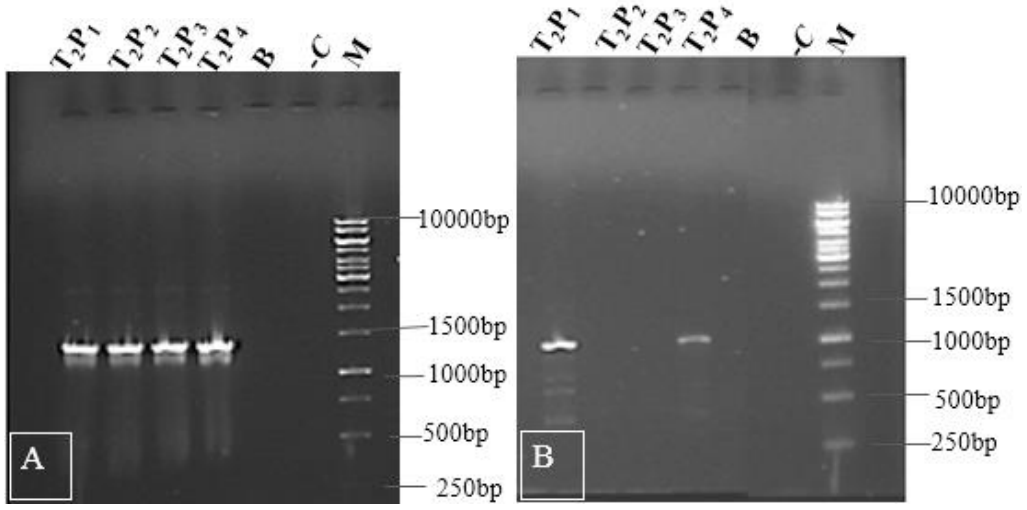
Tetrad 4						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	S	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
	P ₃	Açık yeşil	Katı	R	-	-
Tetrad 5						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
	P ₂	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
	P ₃	Açık yeşil	Akışkan	S	-	-
	P ₄	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₅	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
Tetrad 6						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₃	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
Tetrad 7						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
Tetrad 8						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
Tetrad 9						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	S	-	-

Çizelge 4.3' ün devamı

Tetrad 10						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
	P ₂	Açık yeşil	Akışkan	S	-	-
Tetrad 11						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
Tetrad 12						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
	P ₃	Koyu yeşil	Katı	R	-	-
Tetrad 13						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Akışkan	R	-	-
	P ₂	Koyu yeşil	Katı	S	-	-
Tetrad 14						
Projeni	P ₁	Açık yeşil	Açık yeşil	R	-	-
Tetrad 15						
Projeni	P ₁	Koyu yeşil	Katı	R	-	-

Bu tetradların projenilerinin %50' sinin SEC24B genindeki insersiyon kasetini bulundurduğunu belirlemek için T₂' den DNA izolasyonu yapılmıştır ve gDNA' lar PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri %1'lik TAE agaroz jelinde koşturularak UV tabanlı jel görüntüleme sistemindeki görüntüsü Şekil 4.25 'de gösterilmiştir. Şekil 4.25-A' da kontrol olarak SP24A genin primerleri kullanılmıştır. SP24A primerlerinden oluşacak ürün boyutu 1515bp dir ve beklenen ürün boyutunda ürün vermiştir. Şekil 4.25-B' de verilen görüntüde ise SEC24B geni için dizayn edilen SEC24B primerleri kullanılmıştır. SEC24B primerlerinden elde edilecek ürün boyutu 1070bp dir. T₂P₂ ve T₂P₃ ürün oluşturmaz iken T₂P₁ve T₂P₄ ürün oluşmuşve beklenen ürün boyutundadır. Bu sonuç ile

paromomisin fenotipik direnç testindeki sonuçlar birbirlerini doğrular niteliğindedir. T₂ %100 mayoz bölünme ile oluşmuştur.



Şekil 4.27. T₂'nin PZR sonuçları ;**M:** 1kb DNA markörü; **-C;** negatif kontrol; **B:** boş kuyucuğu göstermektedir; **A:** T₂'nin SP2-Up-24A-R ve SP1- Int20-24A-F primerleri ile yapılan kontrol PZR görüntüsünün sonucu; **B:** T₂'nin SEC24B-E6-F ve SEC24B-E7-R primerleri ile yapılan RT-PZR analizi

3. SONUÇLAR

Hücre içi trafik son zamanlarda üzerinde en yoğun çalışılmakta olunan hücre biyolojisi konuları arasındadır. *C. reinhardtii*'de COPII vezikül oluşumu üzerine yapılan literatürde hiçbir çalışma görülmektedir. SEC24B proteini COPII vezikül oluşumunun alt bileşenlerinden biridir.

Bu projede amacımız *SEC24B* insersiyonel mutantının genetik bağlantı ve fenotipik analizlerinin yapılarak bu genin fonksiyonel işlevini çözümlenektir. Bir gen modelinin fonksiyonunun belirlenebilmesi için bu gen modeli mutasyona uğratıldıktan sonra mutantta görülen fenotipe bakılarak genin fonksiyonu hakkında bilgi edinilebilir. Bu tez çalışmasında *C. reinhardtii*' de kromozom 1'de bulunan *SEC24B* geninin 6'ncı intronunda insersiyon kaseti bulunan *sec24b* mutant suşu ile çalışılmıştır. Kasetin içinde yer alan paromomisin direnç geninin varlığı paromomisin içeren TAP besi yerine ekildikten sonra hücrelerin büyüebilmesine bakılarak yapılan bu fenotipik test ile doğrulanmıştır. Ayrıca *sec24b* mutant suşunda bulunan insersiyon kaseti varlığı PZR ile belirlenmiştir. Mutant suşunun ARS ve ALP enzim aktiviteleri kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. Bu tayin sonucunda *sec24b* mutant suşun yabancı suş olan CC124 ve ebeveyn suş olan CC5325 ile aynı sekresyon kapasitesini sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak insersiyonun bu iki enzimin hücre dışına taşınımını etkilemediği görülmektedir.

sec24b mutant suşunun büyüme hızını belirlemek için hücre sayımı yapılmıştır. Bu sayımdan elde edilen en yüksek hücre yoğunluğu: CC5325 4. günde 6×10^6 hücre/ml'ye, CC124 5. günde 8×10^6 hücre/ml'ye ve *sec24b* mutantı 5. günde 6×10^6 hücre/ml'ye ulaştığı bulunmuştur. Elde edilen bu veriler sonucunda *sec24b* mutantının hücre yoğunluğu yabancı tip suşa kıyasla daha düşük olduğu ebeveyn tipsuş olan CC5325 ile arasında büyük bir farklılık görülmektedir. *SEC24B* genindeki mutasyonun transkripsiyonu etkileyip etkilemediğini belirlemek için mutant suş, yabancı tipten ve ebeveyn tip suştan RT-PCR yapılmıştır. Fakat ile bu bölge kopyalanamamıştır. İlerideki çalışmalarda farklı primer çiftleri denenerek RT-PCR tekrar edilecektir. *sec24b* mutantı yabancı tip suşa göre hücre morfolojisi incelendiğinde *sec24b* mutantının hücrelerin etrafında balon benzeri yapılar ve hücre yapısında anormallikler gözlenmiştir. Bu anormalliklerin sebebinin insersiyonun hücre duvarına etki ettiğinden dolayı oluştuğu düşünülmektedir.

Yaptığımız diğer bir çalışma ise çiftleşme kapasitesini incelemek amacıyla *sec24b (k-6)* mutantı yabancı tip ile çaprazlanmıştır. Çaprazlama sonrasında oluşan zigot peleti *sec24b (k-6)* mutant suşunun yabancı suş olan CC124 ve ebeveyni olan CC5325 suşuna göre daha küçük oluşmuştur. Bu bilgi sonucunda *SEC24B* genindeki insersiyonun çiftleşme kapasitesini etkilediği düşünülmektedir. Oluşan zigotun mayoz bölünmesi sonucu bazı küçük projeniler gözlenmiştir. Bu küçük projenilerin çoğu ölmüştür. Bu ölümlerin sebebinin SEC24B genindeki insersiyon kasetinden dolayı ER'dan Golgi'ye protein transferinde problem olduğundan hücreler yaşamına devam edemediği düşünülmektedir. Zigotlardan oluşan projenide paramomisin direnç fenotipik testi ile projenilerin %50' si insersiyon kasetini içerdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu projenilerin *SEC24B* bölgesi PZR yöntemi yapıldığında %50' si insersiyon kasetini içerdiği

belirlenmiştir. Bu iki çalışma sonuçları birbirlerini desteklemektedir. Böylece oluşan projenilerde genetik bağlantı olduğu belirlenmiştir.

C. reinhardtii SEC24B proteininin diğer organizmalardaki Sec24 proteinleri arasında bulunan evrimsel ilişkiyi belirlemek için, Clustal Omega programı kullanılarak analizi yapılmıştır. Bulunan en yüksek benzerlik %76 ile *V. carteri*' dir. *V. carteri* ve *C. reinhardtii* genomlarının boyutu arasında ve protein alanı repertuarında önemli bir farklılık bulunmamaktadır (Prochnik vd. 2010). *Saccharomyces cerevisiae*'de yapılan bir çalışma ile Sec24p proteinin heterodimeri olan Sec23p'e bağlanma bölgesindeki motif dizisi FLP' dir (Bi vd. 2002). Bu bölge diğer organizmaların Sec24 protein dizilerinde FXP şeklinde korunmuştur. *C. reinhardtii* SEC24B proteinin de bu motif dizisi FAP şeklinde korunmuştur. Predalgo ve Target P biyoinformatik veri tabanları proteinin hücre içi yerleşim yerinin belirlenmesi amacı ile kullanılmıştır. Kullanılan bu biyoinformatik veri tabanları SEC24B proteinini hücre içi lokalizasyonunu tahsis edilememiştir.

Protein homoloji modellemesi belirlemek amacıyla Phyre2 veri tabanı kullanılmıştır. Phyre2 veri tabanı proteinlerin fonksiyonu, yapısı ayrıca mutasyon analizinin tahmininde kullanılmaktadır (Söding, 2005). Bu veri tabanının sonucuna göre: modellenme yüzdesi %100 güven düzeyinde ve veri tabanındaki c3eg9b proteini (memelilerdeki sec23/sec24 transport proteini) model olarak kullanılmıştır. C3eg9b (*H. sapiens* Sec24D) proteini ile %70 oranında benzerlik göstermektedir. Phyre2 veri tabanı tarafından oluşturulan homoloji modellemesinde *C. reinhardtii*'de SEC24B proteinin üzerindeki FAP (Fenilalanin-Alanin-Prolin) motifinin ve c3eg9b proteininin üzerinde bulunan FVP (Fenilalanin-Valin-Prolin) motif dizisinin bulunduğu bölgeler benzemektedir. Yapılan diğer bir çalışma ise *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininde ve diğer organizmalardaki Sec24 proteinlerinin domain bölgesinin belirlemek amacıyla Pfam veri tabanı kullanılmıştır. *C. reinhardtii*'de SEC24B proteininde ve *V. carteri* 'de ki SEC24 proteininde gelsolin domaini bulunmamaktadır. Fakat diğer organizmalardaki SEC24 proteininde gelsolin domaini bulunmaktadır. Bu domain, aktin filamentlerin uçlarına bağlanan, monomer değişimini (uç bloke etme veya kapatma) önleyen, kalsiyum düzenleyici, aktin değiştirici bir proteindir. Bu domain, Sec23 / Sec24 ailesinin üyelerinin C-terminalinde de bulunabilir (Weeds vd. 1986).

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma SEC24B geninin fonksiyonel çalışılması için sonraki çalışmalara ışık tutucu niteliğindedir ve ilerleyen çalışmalarda sec24b mutantından BC3 (geri çaprazlama 3) elde edilip üzerinde çalışılmaya devam edecektir.

6. KAYNAKLAR

- Adams, E. J., Chen, X.-W., O'Shea, K. S., & Ginsburg, D. 2014. Mammalian COPII Coat Component SEC24C Is Required for Embryonic Development in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 289(30): 20858–20870.
- Antonny, B., Beraud-Dufour, S., Chardin, P., & Chabre, M. 1997. N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange †. *Biochemistry*, 36(15): 4675–4684.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature Cell Biology. Nature Cell Biology*, 3(6): 531-537
- Bailly, E., Walton, A., & Borg, J.-P. 2018. The planar cell polarity Vangl2 protein: From genetics to cellular and molecular functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 423(6936): 173-177
- Baines, A. C., & Zhang, B. 2007. Receptor-mediated protein transport in the early secretory pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(8): 381–388.
- Bannykh, S. I., Rowe, T., & Balch, W. E. 1996. The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *The Journal of Cell Biology*, 135(1): 19–35.
- 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. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends in Cell Biology*, 13(6): 295–300.
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2): 383-410.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N., et al. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 77(6): 895-907.
- 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.
- Bi, Xiping, Richard A. Corpina, and Jonathan Goldberg. 2002. “Structure of the Sec23/24–Sar1 Pre-Budding Complex of the COPII Vesicle Coat.” *Nature* 419(6904): 271–77.
- Bielli, A., Haney, C. J., Gabreski, G., Watkins, S. C., Bannykh, S. I., & Aridor, M. 2005. Regulation of Sar1 NH2 terminus by GTP binding and hydrolysis promotes membrane deformation to control COPII vesicle fission. *Journal of Cell Biology*, 171(6): 919-924
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. 2004. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell*, 116(2): 153–166.
- Brandizzi, F., & Barlowe, C. (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 171(6): 919-924.

- Brittle, E. E. 2000. CELL BIOLOGY: ER-to-Golgi Traffic--This Bud's for You. *Science*, pp. 403–404.
- Buchanan, Marty J., and William J. Snell. 1988. "Biochemical Studies on Lysin, a Cell Wall Degrading Enzyme Released during Fertilization in *Chlamydomonas*." *Experimental Cell Research* 179(1): 181–93.
- Cavalier-Smith, T. 1975. "Electron and Light Microscopy of Gametogenesis and Gamete Fusion In *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Protoplasma*, 86(1–3): 1–18.
- Claes, Hedwig. 1971. "Autolyse Der Zellwand Bei Den Gameten von *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Archiv for Mikrobiologie*, 78(2): 180–88.
- Conger, R., Chen, Y., Fornaciari, S., Faso, C., Held, M. A., Renna, L., & Brandizzi, F. 2011. Evidence for the involvement of the Arabidopsis SEC24A in male transmission. *Journal of Experimental Botany*, 62(14): 4927-4936
- Crabbendam, K. J., N. Nanninga, A. Musgrave, and H. van den Ende. 1984. "Flagellar Tip Activation in Vis-à-Vis Pairs of *Chlamydomonas Eugametos*." *Archives of Microbiology*, 138(3): 220–23.
- Dacks, J. B., & Robinson, M. S. 2017. Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats. *Current Opinion in Cell Biology*, pp.108–116.
- Dancourt, Julia, and Charles Barlowe. 2010. "Protein Sorting Receptors in the Early Secretory Pathway." *Annual Review of Biochemistry*, 79(1): 777–802.
- Detmers, Patricia A., Joan M. Carboni, and John Condeelis. 1985. "Localization of Actin in *Chlamydomonas* Using Antiactin and NBD-Phalloidin." *Cell Motility*, 5(5): 415–30.
- Fath, S., Mancias, J. D., Bi, X., & Goldberg, J. 2007. Structure and Organization of Coat Proteins in the COPII Cage. *Cell*, 129(7): 1325–1336.
- Forster, R., Weiss, M., Zimmermann, T., Reynaud, E. G., Verissimo, F., Stephens, D. J., & Pepperkok, R. (2006). Secretory cargo regulates the turnover of COPII subunits at single ER exit sites. *Current Biology*, 16(2):173-179
- Friedmann, I., Colwin, A. L., & Colwin, L. H. (1968). Fine-structural aspects of fertilization in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Cell Science*, 3(1): 115-128
- Füllekrug, J., & Nilsson, T. (1998). Protein sorting in the Golgi complex. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1404(1–2): 77–84.
- Gallaher, S. D., Fitz-Gibbon, S. T., Strenkert, D., Purvine, S. O., Pellegrini, M., & Merchant, S. S. (2018). High-throughput sequencing of the chloroplast and mitochondrion of *Chlamydomonas reinhardtii* to generate improved de novo assemblies, analyze expression patterns and transcript speciation, and evaluate diversity among laboratory strains and wild isolates. *The Plant Journal*, 93(3): 545–565.
- 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.

- Goodenough, Ursula W., and Richard L. Weiss. 1975. "Gametic Differentiation in *Chlamydomonas Reinhardtii*. III. Cell Wall Lysis and Microfilament-Associated Mating Structure Activation in Wild-Type and Mutant Strains." *The Journal of Cell Biology*, 67(3): 623–37.
- Goodenough, Ursula, Huawen Lin, and Jae-Hyeok Lee. 2007. "Sex Determination in *Chlamydomonas*." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3): 350–61.
- Gutman, Benjamin L., and Krishna K. Niyogi. 2004. "Chlamydomonas and Arabidopsis. A Dynamic Duo: Figure 1." *Plant Physiology*, 135(2): 607–10.
- Hardwick, K. G., & Pelham, H. R. B. 1992. SED5 encodes a 39-kD integral membrane protein required for vesicular transport between the ER and the Golgi complex. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 513–521.
- Harris, E. (2008). *The Chlamydomonas Sourcebook: Introduction into Chlamydomonas and its laboratory use*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp. 159–210.
- Harris, E. 2001. Chlamydomonas as a model organism. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1): 363-406
- Harris, E. H., D. B. Stern, and G. B. Witman. 2009. "The Sexual Cycle." In *The Chlamydomonas Sourcebook*, Elsevier Academic Press, San Diego, pp.119–57.
- Henry, Eric C. 2004. "Handbook Of Microalgal Culture: Biotechnology And Applied Phycology." *Journal of Phycology*, 40(5): 1001–2.
- Higashio, H., Kimata, Y., Kiriya, T., Hirata, A., & Kohno, K. 2000. Sfb2p, a yeast protein related to Sec24p, can function as a constituent of COPII coats required for vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 275(23): 17900–17908.
- Hooper, J. K. 1989. "The Chlamydomonas Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. Elizabeth H. Harris. Academic Press, San Diego, CA, 1989. Xiv, 780 Pp., Illus. \$145." *Science*, 246(4936): 1503–4.
- Hughes, Helen, and David J. Stephens. 2008. "Assembly, Organization, and Function of COPII Coat." *Histochemistry and Cell Biology* 129(2): 129–51.
- Hunnicut, Gary R., Maria G. Kosfisz, and William J. Snell. 1990. "Cell Body and Flagellar Agglutinins in *Chlamydomonas Reinhardtii*: The Cell Body Plasma Membrane Is a Reservoir for Agglutinins Whose Migration to the Flagella Is Regulated by a Functional Barrier." *The Journal of Cell Biology*, 111(4): 1605–16.
- Jensen, D., & Schekman, R. 2011. COPII-mediated vesicle formation at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(1): 1–4.
- Kelley, Lawrence A. et al. 2015. "The Phyre2 Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis." *Nature Protocols*, 10(6): 845–58.
- Komsic-Buchmann, K., Wöstehoff, L., & Becker, B. 2014. The Contractile Vacuole as a Key Regulator of Cellular Water Flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell*, 13(11): 1421–1430.
- Kung, L. F., Pagant, S., Futai, E., D’Arcangelo, J. G., Buchanan, R., Dittmar, J. C., Miller, E. A. 2012. Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *The EMBO Journal*, 31(4): 1014–1027.

- Lee, Jae-Hyeok, Huawen Lin, Sunjoo Joo, and Ursula Goodenough. 2008. "Early Sexual Origins of Homeoprotein Heterodimerization and Evolution of the Plant KNOX/BELL Family." *Cell*, 133(5): 829–40.
- Lee, M. C. S., & Miller, E. A. 2007. Molecular mechanisms of COPII vesicle formation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(4): 424–434.
- Lee, M. C. S., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. 2005. Sar1p N-Terminal Helix Initiates Membrane Curvature and Completes the Fission of a COPII Vesicle. *Cell*, 122(4): 605–617.
- 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 photosynthesis. *Nature Genetics*, 51(4): 627–635.
- Lu, C.-L., & Kim, J. 2020. Consequences of mutations in the genes of the ER export machinery COPII in vertebrates. *Cell Stress and Chaperones*, 25(2): 199–209.
- 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., Schekman, R., Orci, L., & Heuser, J. E. 2001. Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24): 13705–13709.
- Maul, J. E., Lilly, J. W., Cui, L., DePamphilis, 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.
- Merte, J., Jensen, D., Wright, K., Sarsfield, S., Wang, Y., Schekman, R., & Ginty, D. D. 2010. Sec24b selectively sorts Vangl2 to regulate planar cell polarity during neural tube closure. *Nature Cell Biology*, 12(1): 41–46.
- Michelle Wood, A., R.C. Everroad, and L.M. Wingard. 2005. "Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures." In *Algal Culturing Techniques*, Elsevier, pp.269–85.
- 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.
- Minami, SA, and UW Goodenough. 1978. "Novel Glycopolypeptide Synthesis Induced by Gametic Cell Fusion in *Chlamydomonas Reinhardtii*." *The Journal of Cell Biology*, 77(1): 165–81.

- Montcouquiol, M., Rachel, R. A., Lanford, P. J., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Kelley, M. W. 2003. Identification of Vangl2 and Scrb1 as planar polarity genes in mammals. *Nature*, 423(6936): 173–177.
- Mossessova, E., Bickford, L. C., & Goldberg, J. 2003. SNARE Selectivity of the COPII Coat. *Cell*, 114(4): 483–495.
- Nickelsen, J., and U. Kück. 2000. “The Unicellular Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii* as an Experimental System to Study Chloroplast RNA Metabolism.” *Die Naturwissenschaften*, 87(3): 97–107.
- Nobre, B. P., Villalobos, F., Barragán, B. E., Oliveira, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A. S. S., ... Gouveia, L. (2013). A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga – Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. *Bioresource Technology*, 135, 128–136.
- Ohisa, S., Inohaya, K., Takano, Y., & Kudo, A. 2010. sec24d encoding a component of COPII is essential for vertebra formation, revealed by the analysis of the medaka mutant, vbi. *Developmental Biology*, 342(1): 85–95.
- Orci, L., Ravazzola, M., Meda, P., Holcomb, C., Moore, H. P., Hicke, L., & Schekman, R. 1991. Mammalian Sec23p homologue is restricted to the endoplasmic reticulum transitional cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(19): 8611–8615.
- Pasquale, S. M., and U. W. Goodenough. 1987. “Cyclic AMP Functions as a Primary Sexual Signal in Gametes of *Chlamydomonas Reinhardtii*.” *The Journal of Cell Biology*, 105(5): 2279–92.
- Pucadyil, T. J., & Schmid, S. L. (2009). Conserved Functions of Membrane Active GTPases in Coated Vesicle Formation. *Science*, 325(5945): 1217–1220.
- Punta, Marco et al. 2012. “The Pfam Protein Families Database.” *Nucleic Acids Research*, 40(D1): D290–301.
- Rapoport, T. A., Li, L., & Park, E. 2017. Structural and Mechanistic Insights into Protein Translocation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 33(1): 369–390.
- Rothman, J. E. 1994. Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature*, 372(6501): 55–63.
- Rothman, J. E., & Wieland, F. T. 1996. Protein Sorting by Transport Vesicles. *Science*, 272(5259): 227–234.
- Sager, Ruth, and S. Granick. 1954. “Nutritional Control Of Sexuality In *Chlamydomonas Reinhardtii*.” *The Journal of General Physiology*, 37(6): 729–42.
- Salama, N. R., & Schekman, R. W. 1995. The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. *Curr Opin Cell Biol*, 7(4): 536-543.
- Sarmah, S., Barrallo-Gimeno, A., Melville, D. B., Topczewski, J., Solnica-Krezel, L., & Knapik, E. W. 2010. Sec24D-Dependent Transport of Extracellular Matrix Proteins Is Required for Zebrafish Skeletal Morphogenesis. *PLoS ONE*, 5(4): e10367.

- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., & Grossman, A. R. (2018). From molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *ELife*, 7.
- Sato, K. 2004. COPII coat assembly and selective export from the endoplasmic reticulum. *Journal of Biochemistry*, 136(6): 755–760.
- Schekman, R., & Orci, L. 1996. Coat Proteins and Vesicle Budding. *Science*, 271(5255): 1526–1533.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., & Usuda, H. 1998. High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics*, 148(4):1821–1828.
- Soding, J. 2005. Protein homology detection by HMM-HMM comparison. *Bioinformatics*, 21(7): 951–960.
- Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., & Rothman, J. E. 1993. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, 362(6418): 318–324.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8): 513–525.
- Sucic, S., El-Kasaby, A., Kudlacek, O., Sarker, S., Sitte, H. H., Marin, P., & Freissmuth, M. 2011. The Serotonin Transporter Is an Exclusive Client of the Coat Protein Complex II (COPII) Component SEC24C. *Journal of Biological Chemistry*, 286(18): 16482–16490.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700): 347–353.
- Tanaka, Yuji et al. 2013. “Redundant Function of Two Arabidopsis COPII Components, AtSec24B and AtSec24C, Is Essential for Male and Female Gametogenesis.” *Planta*, 238(3): 561–75.
- te Beest, M. et al. 2012. “The More the Better? The Role of Polyploidy in Facilitating Plant Invasions.” *Annals of Botany*, 109(1): 19–45.
- Triemer, Richard E., and R. Malcolm Brown. 1975. “Fertilization In *Chlamydomonas Reinhardi*, with Special Reference to the Structure, Development, and Fate of the Choanoid Body.” *Protoplasma*, 85(1): 99–107.
- Vahrenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B., & Michaelis, G. 1993. Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Current Genetics*, 24(3), 241–247.
- Votsmeier, C. (2001). An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export. *The EMBO Journal*, 20(23): 6742–6750.
- Walter, P., Gilmore, R., & Blobel, G. 1984. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell*, 38(1): 5-8.

- Wang, Qian, and William J. Snell. 2003. "Flagellar Adhesion between Mating Type Plus and Mating Type Minus Gametes Activates a Flagellar Protein-Tyrosine Kinase during Fertilization in *Chlamydomonas*." *Journal of Biological Chemistry*, 278(35): 32936–42.
- Wansleben, C., Feitsma, H., Montcouquiol, M., Kroon, C., Cuppen, E., & Meijlink, F. 2010. Planar cell polarity defects and defective Vangl2 trafficking in mutants for the COPII gene Sec24b. *Development*, 137(7): 1067–1073.
- WEEDS, Alan G., John GOOCH, Brian POPE, and Harriet E. HARRIS. 1986. "Preparation and Characterization of Pig Plasma and Platelet Gelsolins." *European Journal of Biochemistry*, 161(1): 69–76.
- Weeks, Donald P., and Philip S. Collis. 1979. "Induction and Synthesis of Tubulin during the Cell Cycle and Life Cycle of *Chlamydomonas Reinhardi*." *Developmental Biology*, 69(2): 400–407.
- Weissman, J. T., Plutner, H., & Balch, W. E. 2001. The Mammalian Guanine Nucleotide Exchange Factor mSec12 is Essential for Activation of the Sar1 GTPase Directing Endoplasmic Reticulum Export. *Traffic*, 2(7): 465–475.
- Weiss-Schneeweiss, H., K. Emadzade, T.-S. Jang, and G.M. Schneeweiss. 2013. "Evolutionary Consequences, Constraints and Potential of Polyploidy in Plants." *Cytogenetic and Genome Research*, 140(2–4): 137–50.
- 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.
- Xu, Dong, and Ruth Nussinov. 1998. "Favorable Domain Size in Proteins." *Folding and Design*, 3(1): 11–17.
- 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.

ÖZGEÇMİŞ

SİBEL KALA

Sibelkala01@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2020	Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Antalya
Lisans	Ege Üniversitesi
2013-2017	Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, İzmir