

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YEŞİL ALG *Chlamydomonas reinhardtii*'de SEC23B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Özgün MUSUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YEŞİL ALG *Chlamydomonas reinhardtii*'de SEC23B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Özgün MUSUL

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEMMUZ 2020

ANTALYA

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

**YEŞİL ALG *Chlamydomonas reinhardtii*'de SEC23B İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ**

Özgün MUSUL

**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez, T.C. Akdeniz Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2019-4901 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

TEMMUZ 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YEŞİL ALG *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'de *SEC23B* İNSERSİYONEL
MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ

Özgün MUSUL
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 13/07/2020 tarihinde jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof.Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

ÖZET

YEŞİL ALG *Chlamydomonas reinhardtii*'de *SEC23B* İNSERSİYONEL MUTANTLARININ GENETİK BAĞLANTI VE FENOTİPİK ANALİZLERİ

ÖZGÜN MUSUL

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

TEMMUZ 2020; 85 sayfa

Tüm ökaryotik organizmalarda, homeostazı korumak için protein trafiği gereklidir. Salgı yolu, çok çeşitli hücresel proteinlerin sentezinden, katlanmasından ve gerekli hedef bölgelerine gönderilmesinden sorumludur. Salgı yolağında yeni sentezlenen tüm salgı proteinleri, nihai hedeflerine teslim edilmeden önce endoplazmik retikulumdan (ER) Golgi'ye nakledilir. Birçok canlıda ve model organizma *Chlamydomonas reinhardtii* genomunda bulunan *SEC23B* geni, salgı proteinlerini ER'dan Golgi aparatına taşıyan ve örtü protein kompleksi II (COPII) veziküllerinin oluşumunda rol aldığı tahmin edilen bir genidir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında CLIP kütüphanesinden (University of Minnesota) alınan *SEC23B* insersiyonel mutantının, karakterizasyonu yapılmıştır. *sec23b* mutantının doğrulanması için PCR, mRNA seviyelerinin tespiti için RT-PCR ve genetik bağlantı analizleri için de projeni testi yapılmış ve tetratlar analiz edilmiştir. Ayrıca fenotipik analizler için; enzim aktivitesi, hücre sayımı ve zigot oluşturma testleri yapılmıştır. Enzim aktivitesi testleri *sec23b* mutantında sekresyon işlevinin olup olmadığının belirlenmesi için yapılmıştır ve arilsülfataz, fosfataz aktivitelerine bakılmıştır. Bu tez çalışmasında, *SEC23B* geninin mutasyonu sonucu, hücre içi trafikte herhangi bir aksama olup olmadığının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Tamamlanan çalışmanın sonuçlarına göre, özellikle projeni testleri yapılan tetratlarda gözlemlenen renk ve morfolojik farklılıklar dikkat çekmektedir. Literatürde bu konu hakkında daha önce çalışılmaması, daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Salgı yolu, *SEC23B*, *Chlamydomonas reinhardtii*, Projeni testi, İnsersiyonel mutant.

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Dr. Öğr. Üyesi Emre AKSOY

ABSTRACT

GENETIC CONNECTION AND PHENOTYPIC ANALYSIS OF SEC23B INSERSIONAL MUTANTS IN GREEN ALG *Chlamydomonas reinhardtii*

Özgün MUSUL

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

July, 2020; 85 sayfa

In all eukaryotic organisms, protein trafficking is required to maintain homeostasis. The secretory pathway is responsible for the synthesis, folding and delivery of a wide variety of cellular proteins to the required target regions. All secreted proteins newly synthesized in the secretory pathway are transported from the endoplasmic reticulum (ER) to Golgi before being delivered to their final destination. The *SEC23B* gene, which is found in the *Chlamydomonas reinhardtii* genome, in many living beings and model organisms, is a gene that carries secretory proteins from the (ER) to the Golgi apparatus and is involved in the formation of vesicles of the layer protein complex II (COPII). In the thesis study, the characterization of the *SEC23B* insertional mutant was done. PCR was done for detection of insertion in the genome of *sec23b* mutant, RT-PCR was done to detect mRNA levels, progeny test was done for genetic linkage analysis. Also for phenotypic analysis; enzyme activity, cell count and zygote formation tests were performed. Enzyme activity tests were performed to determine whether there is secretion function in the *sec23b* mutant and arylsulfatase, phosphatase activities were examined. The study was aimed to determine whether there is any disruption in the trafficking within the cell as a result of the mutation of the *SEC23B* gene. According to the tetrad analysis results, especially change in color and morphological differences were observed which draw attention. The lack of previous study on this subject in the literature indicates that more molecular studies are needed.

KEY WORDS: Secretory pathway, *SEC23B*, *Chlamydomonas reinhardtii*, Progeny test, Insertional mutant.

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Münevver AKSOY

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Asst. Prof. Dr. Emre AKSOY

ÖNSÖZ

C. reinhardtii genomunda COPII veziküllerin oluşumunda rol alması tahmin edilen iki *SEC23* gen modeli mevcuttur. Bunlar *SEC23A* (Cre03.g180850.t1.2) ve *SEC23B* (Cre10.g447350.t1.2) dir. Literatürde bu genler üzerine yapılmış fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında *SEC23B* insersiyonel mutantları incelenmiştir ve bu gen modelinin hücre içi trafikte rol alıp almadığı araştırılmıştır. İlk önce *sec23b* mutantında insersiyon olup olmadığı PCR ile kontrol edilmiştir. Bunun için transformantlardan genomik DNA izole edilmiş ve hedef alınan bölgeyi saran primerler kullanılarak PCR yapılmıştır. *sec23b* mutantında mRNA seviyeleri RT-PCR ile belirlenmiştir. *SEC23B* proteini, hücre içi trafikte rol alıyorsa mutantın büyüme ve salgılama işlevlerinde bozukluk olacağı tahmin edildiği için hücre sayımları ve zigot oluşturma yeteneklerine bakılmıştır. Sekresyon kapasitesi hücre dışına salgılanan proteinlerin aktivitelerine bakılarak belirlenmiştir. Bunu belirlemek için sülfat eksikliği altında salgılanan arilsülfataz ve fosfat eksikliği altında salgılanan alkalın fosfataz enzimlerinin aktivitelerine bakılmıştır. İnsersiyonun bir sonraki nesle geçip geçmediğinin tespiti için projeni testi yapılmıştır.

Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü Yüksek Lisans eğitim sürem boyunca tezimin yazım aşamasında ve son halini almasında büyük emeği geçen, bilgi, fikir ve tecrübelerinden yararlandığım, manevi desteğini esirgemeyen ve bana her türlü imkanı sağlayan, değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Münevver AKSOY'a, çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen bölüm içindeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma, bana her zaman maddi ve manevi destek olan, inanan ve güvenen aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca tez projemin gerçekleşmesi sürecini destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER VE TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Alglerin Sınıflandırılması	4
2.1.1. Alglerin kullanım alanları	4
2.1.2. Alglerin sentetik biyolojide kullanımı	5
2.2. Ökaryotik Organizmalarda Hücre İçi Trafik (Salgı Yolağı)	5
2.3. Kaplama Proteinleri (COPI ve COPII)	5
2.3.1. ER zarında COPII kaplama protein oluşumu	6
2.4. Vezikül Bağlama	9
2.5. Golgi İçindeki Trafik	10
2.6. <i>SEC23</i> veya <i>SEC23B</i> Geni İle Yapılan Moleküler Çalışmalar	11
2.7. <i>SEC23</i> Geninin Bulunduğu Organizmalar	14
3. MATERYAL ve METOT	15
3.1. <i>C. reinhardtii</i> 'deki <i>SEC23B</i> Geni.....	15
3.2. Besi Yerlerinin Hazırlanma Protokolleri	17
3.2.1. TAP besi yeri hazırlanışı	17
3.2.2. Azotsuz ortam	17
3.2.3. Fosfatsız ortam	18
3.2.4. Sülfatsız ortam	18
3.2.5. Paromomisinli (antibiyotik) ortam	18
3.3. Total DNA İzolasyonu Protokolleri	19
3.3.1. Fenol - kloroform protokolü	19
3.3.2. Thermo scientific GeneJET plant genomic DNA pürifikasyon mini kit protokolü.....	20
3.4. PCR Protokolü	21
3.4.1. PCR mix hazırlığı	21
3.5. Total RNA İzolasyonu	22
3.5.1. cDNA eldesi.....	23
3.5.2. RT-PCR reaksiyon mix hazırlığı	23
3.5.3. RT-PCR cihaz protokolü	25
3.6. Jel Elektroferez	25

3.7. Genetik Bağlantının Belirlenmesi	26
3.7.1. Zigot oluşturma aşamaları	26
3.7.2. Projeni testi (İnsersiyonun belirlenmesi)	28
3.8. Hücre Sayım Protokolü	29
3.9. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	29
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 'de bulunan SEC23B Proteininin Biyoinformatik Çalışmaları	31
4.1.1. <i>C. reinhardtii</i> 'deki SEC23B proteinin aminoasit dizilimi	31
4.2. CrSEC23B Proteinin 3D Yapı Konformasyonu	31
4.3. SEC23B Proteinin Sekonder Yapısı	35
4.4. <i>C. reinhardtii</i> 'deki SEC23B Proteini ve Farklı Organizmalardaki Domain Yapıları	37
4.5. Protein Alignment'ları (Hizalamaları)	37
4.5.1. CrSEC23A / CrSEC23B alignment	38
4.5.2. CrSEC23B / ScSEC23 alignment	40
4.5.3. CrSEC23B / VcSEC23B alignment	42
4.5.4. CrSEC23B / AtSEC23B alignment	44
4.6. Protein Alignment Benzerlikleri Tablosu	45
4.7. PCR Sonuçları	46
4.7.1. SEC23B primeri ve kontrol primerleri ile yapılan PCR sonuçları	46
4.8. RT-PCR Sonuçları	48
4.9. <i>sec23b</i> Mutantının Enzim Aktivitesi Sonuçları	50
4.10. Zigot Oluşturma Sonuçları	52
4.11. Projeni Testi ve İnsersiyon Belirlenmesi	54
4.12. Tetratların PCR Sonuçları	57
4.13. Hücre Sayımları	60
5. SONUÇLAR	62
6. KAYNAKLAR	64

ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Yeşil Alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de SEC23B 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

Özgün MUSUL



Simgeler

g	: Gram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
L	: Litre
μ l	: Mikrolitre
CC	: Santimetre küp
M	: Molar
∞	: Sonsuz
~	: Yaklaşık
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
kb	: Kilo baz
Mb	: Mega baz
bp	: Baz çifti
kDa	: Kilo dalton

Kısaltmalar

CLİP	: Chlamydomonas Kütüphane Projesi
DNA	: Deoksiribo nükleikasit
RNA	: Ribo nükleikasit
gDNA	: Genomik DNA
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
mRNA	: Mesajcı RNA
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Ters Transkriptaz PCR

dNTP	: Dinükleotit trifosfatlar
Taq	: Thermus Aquaticus
DTT	: Dithiothreitol
CDS	: RNA'da protein kodlayan dizi
ER	: Endoplazmik Retikulum
COP	: Sitoplazmik örtü proteini
SNARE	: Transmembran proteini
TRAPP	: Protein taşıma parçacığı
UBF	: Membran bağlanma faktörü
GEF	: Nükleotit değişim faktörü
GTP	: Guanozin trifosfat
GAP	: GTPaz aktive edici protein
Arf	: ADP ribosilasyon faktörü
VTC	: Veziküler tübüler kümeler
ERAD	: ER ile ilişkili protein yıkımı
pH	: Hidrojen gücü
UV	: Mor ötesi
CLİP	: Chlamydomonas kütüphane projesi
BAC	: Bakteriyel yapay kromozomu
QFC	: Quadriflagellated hücre
RPM	: Dakikadaki devir sayısı
TM	: Erime sıcaklığı
MgCl	: Magnezyum klorür
H2O	: Dihidrojen monoksit
NAOH	: Sodyum Hidroksit
K2HPO4	: Dipotasyum fosfat

KH ₂ PO ₄	: Monopotasyum fosfat
NH ₄ Cl	: Amanyum klorür
MgSO ₄	: Magnezyum sülfat
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
HCl	: Hidroklorik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
TAE	: Triasetat EDTA tamponu
CDAII	: Konjenital diseritropoietik anemi tip II
HSC	: Hematopoietik kök hücreleri
CRC	: Metastaz kolorektal kanser
EPCAM	: Epitelyal hücre yapışma molekülü
vd	: ve diğerleri
vb	: ve benzeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.3.1. Kaplama veziküllerinin oluşumu	7
Şekil 2.3.2. SEC23 ve SEC24 proteinlerinin üç boyutlu yapısı	8
Şekil 3.1. <i>C. reinhardtii</i> 'de bulunan <i>SEC23B</i> geninin özellikleri	15
Şekil 3.1.2. İnsersiyon bölgesini gösteren <i>SEC23B</i> genine ait insersiyon şeması.....	16
Şekil 3.1.3. İnseriyonun tespiti için kullanılan 23B primerlerinin hedef bölgesi; SP1 - R, SP2 - F	16
Şekil 3.1.4. CLIP veritabanında verilen ve insersiyonu çevreleyen flanking (kenar dizisi) sekansları arası tahmini insersiyon bölgesi	16
Şekil 3.2.5. Paromomisin sülfat Antibiyotik	19
Şekil 3.7.1. a) TAP besi yerinde büyümüş olan <i>sec23b</i> mutant hücreleri b) Hücrelerin toplanişı c) Azotsuz ortama alınan <i>sec23b</i> mutant hücreleri ve CC125 yabancı tip hücreleri	27
Şekil 3.7.1.2. a) CC125 yabancı tip gametleri b) <i>sec23b</i> mutantı gametleri c) <i>sec23b</i> -CC125'in gametlerinin zigot oluşturduktan sonra, bir gece ışık altında beklemiş pelet görüntüsü	28
Şekil. 3.7.2.1. TAP besi yerinde büyütülmüş <i>sec23b</i> /CC125 zigotlarına ait tetratlar	29
Şekil 4.1.1. CrSEC23B protein dizilimi, Phytozome veri tabanında.....	31
Şekil 4.2.1. ScSEC23 ve CrSEC23B 3D konformasyon karşılaştırması	31
Şekil 4.2.2. CrSEC23B proteininin 3D konformasyonu	32
Şekil 4.2.3. CrSEC23B proteininin sekonder yapısına göre renklendirilmiş hali.....	33
Şekil 4.2.4. ScSEC23/CrSEC23A/CrSEC23B proteinlerin karşılaştırması	35
Şekil 4.3. <i>C. reinhardtii</i> ' de bulunan SEC23B geninin protein sekonder yapısı	35
Şekil 4.5.1. CrSEC23A / CrSEC23B alignment	38
Şekil 4.5.2. CrSEC23B / ScSEC23 alignment	41
Şekil 4.5.3. CrSEC23A / VcSEC23B alignment	43
Şekil 4.5.4. CrSEC23B / AtSEC23B alignment	44
Şekil 4.7.1. Tek koloni seçimi yapılan <i>sec23b</i> mutantına ait k-1 ve k-2'nin <i>SEC23B</i> primeri kullanılarak yapılan PCR sonucu.....	46

Şekil 4.7.2. <i>sec23b</i> mutantına ait klonların diğer mutant, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tiple (CC124) olan PCR sonucu	46
Şekil 4.7.3. <i>SEC24A</i> geni için yapılan ve <i>sec23b</i> klonlarının ebeveyn (CC5325) ve yabancı tip (CC125) ile olan kontrol PCR sonucu.....	46
Şekil 4.7.4. <i>sec23b</i> mutantından, farklı iki klon örneklerinin (k-3, k-4) PCR sonucu....	47
Şekil 4.7.5. <i>sec23b</i> mutantına ait diğer iki klonun (k-3 ve k-4) OMJ kontrol primerleri ile PCR sonucu.....	48
Şekil 4.8.1. <i>sec23b</i> mutantı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tiple (CC124) ait RT-PCR sonucu (CBLP kontrol geni için) qCBLP kontrol primeri kullanıldı	48
Şekil 4.8.2. <i>sec23b</i> mutantı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tiple (CC124) ait RT-PCR sonucu; 23B primeri kullanıldı	49
Şekil 4.8.3. <i>sec23b</i> mutantı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tiple (CC124) ait RT-PCR sonucu; 23A primeri kullanıldı	49
Şekil 4.8.4. <i>sec23b</i> mutantı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tiple (CC124) ait RT-PCR sonucu; 23B primeri kullanıldı.....	50
Şekil 4.8.5. <i>sec23b</i> mutantı için, SEC23B-Exon-11 primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonucu	50
Şekil 4.9.1 a) <i>sec23b</i> mutantının TAP besi yerinde bir hafta büyümüş görüntüsü. b) TAP besi yerinden alınan hücrelerin paromomisinli (antibiyotik) ortamda büyümüş görüntüsü	50
Şekil 4.9.2. a) Fosfatsız ortamda, fosfataz aktivitesi sonucu, b) Sülfatsız ortamda sülfataz aktivitesi sonucu.....	51
Şekil 4.9.3. a) Fosfatsız ortamda, fosfataz aktivitesi sonucu b) Sülfatsız ortamda sülfataz aktivitesi sonucu; İkinci tekrar	51
Şekil 4.9.4. <i>sec23b</i> mutantlarından oluşturulan, 48 adet tek koloni örnekleri.....	52
Şekil 4.10.1. Çiftleşmeden önce azotsuz TAP besi yerinde bulunan, <i>sec23b</i> mutantına ait hücreler	52
Şekil 4.10.2. Aglütinasyon ve füzyon yapan <i>sec23b</i> mutantına ait hücreler.....	53
Şekil 4.10.3. a ve b) <i>sec23b</i> mutantına ait zigotlar	53
Şekil 4.10.4. a) CC124 yabancı tiple ait zigotlar b) CC5325 ebeveynine ait zigotlar	54

Şekil 4.11.1. TAP besi yerinde büyütülmüş <i>sec23b</i> /CC125 zigotlarına ait tetratlar.....	54
Şekil 4.11.2. a) TAP besi yerinde büyümüş T1 ve T2 projenileri b) Paromomisinli tabaklarda T1 ve T2 projenilerinin son hali	55
Şekil 4.11.3. a) TAP besi yerinde büyümüş T3, T4 ve T5'in projenileri b) Paromomisin tabaklarında T3, T4 ve T5 projenilerinin son hali	55
Şekil 4.11.4. a) TAP besi yerinde büyümüş T6, T7, T8'in projenileri b) Paromomisin tabaklarında T6, T7 ve T8 projenilerinin son hali	56
Şekil 4.11.5. T1 projenilerinin TAP besi ortamında büyümüş son hali	57
Şekil 4.12.1. 24A primeri ile T1 projenilerinin ve yabancı tiplerin kontrol PCR sonucu.....	56
Şekil 4.12.2. 23B primeri ile T1 projenilerinin ve yabancı tiplerin PCR sonucu	57
Şekil 4.13.1. Yabancı tip, ebeveyn ve <i>sec23b</i> mutantının sırasıyla günlere ait renkleri..	60
Şekil 4.13.2. Yabancı tip, ebeveyn ve <i>sec23b</i> mutantının sırasıyla günlere ait sayım grafiği	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.7.1. <i>SEC23</i> geninin bulunduğu organizmalar; mevcut gen sayıları	14
Çizelge 3.4.1. PCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar	21
Çizelge 3.4.2. PCR cihaz protokolü	22
Çizelge 3.5.2. RT-PCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar	24
Çizelge 3.5.3. RT-PCR cihaz protokolü	25

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 4.4. <i>C. reinhardtii</i> paralog ve ortologlarının domain yapıları	37
Tablo 4.6. <i>C.reinhardtii'nin</i> paroloğu ve başka organizmalardan olan ortologlarının benzerlik yüzdeleri	45
Tablo 4.11. <i>sec23b</i> /CC125 Tetrad Analizleri Tablosu	59

1) GİRİŞ

Algler denizlerin en önemli canlı kaynaklarından biri olup, besin zincirinin önemli bir parçasını oluştururlar. Alg türleri yeryüzünde başta denizler olmak üzere nehir, göl gibi tatlı veya tuzlu su içeren alanlarda ve kara habitatları arasında da toprak, kaya veya ağaçlarda yaşayabilirler (Aktar ve Cebe 2014). Mikroalgler, verimsiz karasal ortamlar, yüksek sıcaklık ve UV (mor ötesi ışın) / yüksek ışık radyasyonları dahil olmak üzere zorlu habitatlarda da gelişebilen çeşitli ökaryotik organizmalar grubudur (Siddigui vd. 2019). Mikroalgler birçok alanda kullanılmaktadır. Mikroalg ve türleri; insanlar için ek gıda, hayvan beslenmesi, su kültürü, kanalizasyon arıtma, çevre temizliği, biyoyakıt, ilaç sanayisi ve doğal bileşikler üretme gibi alanlarda kullanılır. Mikroalgler, hem akademik hem de endüstriyel uygulamalarda fotosentetik üretkenliği sayesinde biyokütle ve biyo-ürünler üretimini artırmak için genetik modifikasyonları önemli olan bir canlı türüdür (Baek vd 2016).

Fotosentetik organizmalar, özellikle yeşil bitkiler ve algler, yüksek değerli hedeflerin büyük ölçekli üretimi için en uygun fiyatlı sistemler olarak ortaya çıkmıştır. Mikroalgler, mevcut karbon kaynağının türüne bağlı olarak fotoototrofik veya heterotrofik olarak büyüebilir, bu da ekimini potansiyel olarak basit ve uygun maliyetli hale getirir (Siddigui vd. 2019). Tek hücreli organizmalar, mikroalgler farklılaşmadan yoksundur ve vejetatif döngülerinin çoğu için, haploid kalırlar, bu da genomlarının genetik manipülasyonunu bitkilerle karşılaştırıldığında nispeten daha kolay hale getirir (Siddigui vd. 2019).

Ilıman toprak habitatlarında bulunan ve tek hücreli bir yeşil alg türü olan *Chlamydomonas reinhardtii*, hem nükleer hem de kloroplast dönüşümü için bir dizi moleküler araç ve suş mühendisliği için sentetik biyoloji stratejilerinin devam eden gelişimi ile belki de en gelişmiş mikroalgal platformdur (Dyo ve Purton 2018). Ayrıca alg, bitki ve hücre biyolojisi gibi araştırma alanları için çok değerli bir model organizmadır (Ferenczi vd.2017). Kloroplast genetik sistemi, genomun küçük ve düşük karmaşıklıkta olması ve yabancı DNA'nın (Deoksiribo nükleik asit) önceden belirlenmiş herhangi bir lokusa tam entegrasyonu, homolog rekombinasyonla kolayca elde edilmesinden dolayı özellikle sentetik biyolojiye uygundur (Dyo ve Purton 2018). *C. reinhardtii* ilk olarak fotosentez, ışık algısı ve silyaların yapısı, işlevi ve biyogenezi gibi temel hücresel süreçleri aydınlatmak için kullanılmıştır (Sasso vd. 2018). Ayrıca bu organizma; besin açlığında verdiği yanıtlar, rekombinant ürünlerin geliştirilmesi (proteinler, enzimler vb.), biyo-yakıt, biyo-gübre üretimi, haploid genotip araştırmaları, gibi alanlarda tamamı sekanslanmış genomu ile son zamanlarda fazlasıyla ilgi görmektedir (Ferenczi vd. 2017; Molino vd. 2018). Alglerin büyüme ortamı için sadece tuzlar, su, hava ve ışık gerektirdiğinden, yüksek değerli moleküllerin büyük ölçekli üretimi için düşük maliyetli bir seçenek sunarlar. Kirpikli yeşil alg *C. reinhardtii* gibi tek hücreli algler kontrollü ortamlarda (sıcaklık ve ışık rejimleri) büyüme kolaylığı ve kültürlerin homojen yapısı nedeniyle, deneyler sırasında yüksek verim sağlar ve klasik bitki modellerinden çok daha hızlı büyürler (Salome ve Merchant 2019).

Tek hücreli yeşil alg *C. reinhardtii*, basit bir yaşam döngüsü, mutantların kolay izolasyonu ve moleküler genetik çalışmalar için büyüyen bir dizi araç ve teknik sunmaktadır. Optimal koşullar altında *C. reinhardtii* o kadar hızlı büyür ki sayıları yaklaşık 8 saatte bir, ikiye katlanabilir (Harris 2001). *C. reinhardtii*, laboratuvarında cinsel olarak çoğalmaya teşvik edilebilir, bu da tek bir haploid suşuna birden fazla özelliğin sokulmasını kolaylaştırır (örneğin, çift veya üçlü mutantlar üretmek için) (Je vd. 1988; Remacle vd. 2006). *C. reinhardtii*, tek bir çiftleşme tipi lokus tarafından kontrol edilen, çiftleşme tipi artı (MT+) ve çiftleşme tipi eksi (MT-) olmak üzere iki çiftleşme tipine sahip tek hücreli bir alg türüdür. Gametler arasındaki cinsel yapışmaya, kamçı zarlarındaki cinsiyete özgü aglütinin molekülleri aracılık eder. Hücre füzyonu MT+ ve MT- çiftleşme yapıları, yapışkan bir etkileşim ve ardından lokalize membran füzyonu ile başlatılır (Sekimoto vd. 2017). *C. reinhardtii* alg türünün cinsel döngüsü, sonunda mayoz geçiren hareketsiz sporlara farklılaşan diploid zigotların oluşumuyla sonuçlanır (Joo vd. 2017). *C. reinhardtii'nin* nükleer ve kloroplast genomları, genomik ve epigenomik analizleri tamamen dizilenmiştir. Yaklaşık 112-Mb haploid *C. reinhardtii* nükleer genomu, 17 kromozom içerir. Dairesel kloroplast DNA genomu 203 kb'dir ve hücre başına 80 ila 100 kopya halinde bulunur ve bunlar hücre içinde dağılmış olan nükleoid adı verilen sekiz ila 10 nükleoprotein kompleksine ayrılır (Maul vd. 2002). Birçok tek hücreli ökaryot gibi, *C. reinhardtii'nin* haploid hücrelerinin mitotik bölünme ile vejetatif olarak cinsel üreme geçirebileceği iki fazlı bir yaşam döngüsü vardır. Labaratuvar ortamında gametogenez, ışık koşullarının değişimiyle yada azot, sülfür, fosfor gibi besinlerin açlığıyla indüklenebilir ve uygun koşullar sağlanarak döngü sağlıklı bir şekilde devam edebilir (Treier vd. 1989). Örneğin azot açlığından sonra, hücreler bölünmeyi durdurur ve çiftleşme tipi, kromozom 6 üzerinde iki haplotip, MT+ veya MT- ile genetik olarak yaklaşık 300 kb'lik çiftleşme tipi, lokus tarafından belirlenen gametleri oluşturmak için mitoz geçirir (Umen 2011; Deltoff vd. 2013). Bu gametler, eksi ve artı hücreler arasında farklı olan ve zıt çiftleşme tipindeki hücrelerin birbirini tanımasına ve dörtlü bir zigot oluşturmak üzere kaynaşmasına izin veren bir çiftleşme ile ilişkili proteinleri eksprese etmekte görevlidir (Harris 2001). Çeper ve kamçı oluşturan gametler, ana hücreden ayrılırlar. Gametler (genellikle iki farklı eşeyli) birbirlerini çekerek büyük kümeler oluştururlar ve küme oluşturmuş hücreler çiftler halinde birbirinden ayrılırlar. Bir çiftin üyeleri, temas halindeyken, kamçıları ile uç uca birleşirler. Bu kamçıların uç kısımlarında türlere ve çiftleşme tipine özgü olarak bağlanma yerleri bulunmaktadır. Daha sonra hücrelerin çeperleri erir ve sitoplazmaları yavaşça temas halindeyken, kamçıları ile uç uca yerleşirler. Bu kamçıların uç kısımlarında türlere ve çiftleşme tipine özgü bağlanma yerleri bulunur. Daha sonra hücrelerin çeperleri erir ve sitoplazmaları yavaşça birleşir. Son aşamada ise bu hücrelerin çekirdekleri döllenme sırasında birleşir. Döllenme sonucu diploit zigot oluşur. Zigotun kamçısı kaybolur ve kalın bir koruyucu çeper oluşturur. Oluşan hücreler, buldukları ortamda kalabilirler (Gould ve Keeton 1996). Zigot oluşturmak, *C. reinhardtii'nin* koşullar sertleştiğinde hayatta kalmasını sağlar (Harris 2001). Uygun ışık ve besin maddelerine döndüğünde, zigosporlar vejetatif yaşam döngüsüne yeniden girebilen dört haploid dölünü (iki MT+ ve iki MT-) üretmek için mayoz bölünür ve eşeyli üreme döngüsü tamamlanmış olur (Harris 2001). Genellikle zigotların seleksiyon tayini için yapılan çalışmalarda, projeni testi ile yarı yarıya (% 50-50) oluşan bu dört haploid yapı sayesinde birçok özellik incelenebilmektedir.

C. reinhardtii organizmasının hücre biyolojisindeki yeri ve gen bazında çalışma kolaylığı ile hücre içi trafikte rol alan genler incelenebilir. Hücre içi trafik hücrenin normal fonksiyonlarını ve varlığını sürdürebilmesi için gerekli bir işlevdir (Sanderfoot ve Raikhel, 1999; Barlowe ve Miller, 2013). Secretuar yolda (salgı yolağı) bulunan proteinler, endoplazmik retikulum (ER) bağlı ribozomlarda sentezlendikten sonra, yine ER'a transfer edilirler ve daha sonra Golgi kompleksin'den (Golgi) geçerek vakuole, lizozoma veya veziküller aracılığıyla hücre membranına taşınmakta ya da hücre dışına salgılanmaktadırlar. Proteinlerin ER ve Golgi arasında transferi COPII ve COPI vezikülleri aracılığıyla olmaktadır. COPII içeren veziküller proteinlerin ER'dan Golgi'ye anterograde (ileriye doğru giden) transferinde, COPI içeren veziküller ise proteinlerin Golgi'den ER'a retrograde (geriye doğru giden) transferinde rol almaktadır (Barlowe vd. 1994; Salama ve Schekman 1995; Barlowe ve Miller 2013).

C. reinhardtii genomunda COPII veziküllerin oluşumunda rol alması tahmin edilen iki *SEC23* gen modeli mevcuttur. Bunlar *SEC23A* (Cre03.g180850.t1.2) ve *SEC23B* (Cre10.g447350.t1.2) dir. Literatürde bu genler üzerine yapılmış fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışması kapsamında, amacımız *SEC23B* insersiyonel mutantlarının incelenerek bu gen modelinin hücre içi trafikte rol alıp almadığını belirlemektir. Bildiğimiz kadarıyla literatürde *C. reinhardtii* üzerinde hücre içi trafik konusunda yapılan çalışma görülmektedir. Özellikle *SEC23B* geni üzerine yapılan fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Planladığımız çalışma bu gen modeli üzerine yapılacak olan ilk çalışma olacaktır.

C. reinhardtii organizmasına ait *sec23b* mutanını kullanarak, mutanın doğrulanması amacıyla DNA izolasyonu ve PCR yapılmıştır. Doğrulanmış mutanta tekrar RNA izolasyonu ve RT-PCR yapılarak mutan olan *sec23b'nin* mRNA üretilip üretilmediği tespit edilmiştir. *sec23b* mutanının, yabancı tipten farklı olarak arisülfataz ve alkalik fosfataz aktivitelerindeki farklılığı ölçmek için enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Mutan hücrelerinin, yabancı tipe oranla büyüme hızı ve sayılarındaki farklılık tespiti için hücre sayımı yapılmıştır. Ayrıca, mutan hücrelerinin zigot oluşturabilme yeteneklerinin tespiti ve mutasyonu bir sonraki nesle aktarabilme yetilerinin tayini için de projeni testi yapılmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Alglerin Sınıflandırılması

Algler yapısal olarak mikroalg ve makroalg olmak üzere iki gruba ayrılır ve 30.000 ila 1 milyondan fazla tür içerdiği tahmin edilmektedir (Guiry 2012). Temelde yedi sınıfa ayrılmaktadır (Aktar ve Cebe 2010). Bunlar:

- Chlorophyta (yeşil algler)
- Chrysophyta (altın sarısı algler)
- Pyrophyta (ateş rengi algler)
- Euglenophyta (kamçılı algler)
- Rhodophyta (Kırmızı algler)
- Phaeophyta (kahverengi algler)
- Cyanophyta (mavi-yeşil algler)

2.1.1. Alglerin kullanım alanları

İnsanlık kara bitkilerinin değerini binlerce yıldır yenilenebilir gıda, ilaç ve malzeme kaynağı olarak kabul etmiştir. İnsanlık tarihi boyunca tarımsal yöntemler sürekli olarak değiştirilmiş ve medeniyetin değişen ihtiyaçlarını karşılamak üzere iyileştirilmiştir. Günümüzde hızla büyüyen nüfus artışı yüzünden, mevcut endüstriyel ve tarımsal uygulamalarla ilgili pratik sınırlamaları ve ciddi çevresel endişeleri gidermek için daha fazla yenilik gerekmektedir. Mikroalgler, acil endüstriyel ve tarımsal talepleri karşılama potansiyeli ile yeni nesil kaynaklar olarak ortaya çıkan tek hücreli bir fotosentetik organizmalar grubudur. Alglerin geniş biyolojik çeşitliliği, doğal olarak veya genetik manipülasyon yoluyla çok sayıda değerli biyolojik ürün üretmek için kullanılabilir. Mikroalgler ayrıca birçok avantaja sahiptir, düşük üretim maliyetleri, ekilebilir araziye gerek yoktur ve hem büyük ölçekli dış mekan sistemlerinde hem de fotobiyoreaktörlerde hızla büyüme kapasitesi sayesinde üretilebilir (Fabris vd. 2020).

Artan küresel sıcaklıklar, aşırı hava kirliliği, değişen iklim kalıpları ve ekilebilir arazi kaybı mevcut agroteknolojide ciddi değişiklikler gerektirecektir (Wurtzel vd 2019). Fotosentetik mikroalgler, dünyada ki her habitata kolonize eden ve 200.000'den fazla tür olduğu tahmin edilen olağanüstü biyolojik çeşitlilik sergileyen mikroplardır (Guiry 2012), bu da çok çeşitli ekolojik adaptasyonları yansıtmaktadır. Maya ve bakteriler gibi biyo bazlı üretim için sıklıkla kullanılan diğer mikropların aksine, fototrofik algler, atmosferik karbonu sabitlemek için güneş ışığını kullanma ve fermantasyon için şekerlere olan bağımlılıklarını azaltma avantajına sahiptir. Aralıklı ve az miktarda besin mevcudiyeti olan ortamlarda doğal olarak gelişen birçok mikroalg türü, uygun koşullar altında hızla büyüme için etkili metabolik adaptasyonlar geliştirmiştir (Smetacek 1999; Litchman 2007). Sonuç olarak, algler genellikle bitkilerden daha yüksek bir fotosentetik verimliliğe sahiptir (Bhola vd. 2014), bu da biyokütle üretme kapasitesinin daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir (Benedetti vd 2018).

2.1.2. Alglerin sentetik biyolojide kullanımı

Sentetik biyoloji canlıların organizmalarının rasyonel tasarımına mühendislik prensiplerini uygular. Bu disiplin içinde biyolojik bir sistem, mevcut fonksiyonları değiştirmek veya alternatif konakçı organizmalarda tekrar oluşturmak için modifiye edilebilen ve yeniden birleştirilebilen karakteristik genetik parçaların bir koleksiyonu olarak görülmektedir. Genetik tasarımlar, biyoteknolojik uygulamalar için optimize edilmiş metabolik konfigürasyonlar elde etmek için bir tasarım-inşa-test-öğrenme döngüsünün tekrarları ile revize edilmektedir (Khalil ve Collins 2010; Nielsen ve Keasling 2016). Mikroalgelere uygulanan sentetik biyoloji, bu güçlü yeni yaklaşımı, gelecekteki çevresel zorluklara uyacak şekilde uyarlanmış yeni üretim türleri oluşturmak için, bir fotosentetik mikrobiyal konağın faydalarıyla birleştirecektir (Fabris vd. 2020). Mikroalgelerin genetik mühendisliği için araçlar, çok sayıda alg soyunda sıralı genomların artan kullanılabilirliği sayesinde hızlı bir şekilde gelişmektedir. Mikroalg genomlarının dizilenmesi yeşil alg genetik aracı gelişimini kolaylaştırmıştır (Fabris vd 2020).

2.2. Ökaryotik Organizmalarda Hücre İçi Trafik (Salgı Yolağı)

Her hücre beslenmeli ve çevresindeki diğer hücreler ile iletişim kurmalıdır. Prokaryotik hücrede, tüm beslenme ve iletişim plazma zarında gerçekleşmektedir. Prokaryotlar, hücrenin plazma zarından hücre dışına doğru sindirim enzimleri salgılar. Daha sonra, sindirimle üretilen küçük metabolitleri aynı zar üzerinden sitozele geçirir. Ökaryotik hücrelerde ise bunun aksine, endositoz işlemi yapılarak makro moleküllerin alınıp, hücre içindeki lizozomlarda depolanan sindirim enzimlerine taşınmalarını sağlayan bir iç zar sistemi evrimleşmiştir. Ayrıca endositoz yolağı ile makro moleküllerin alınmasına izin verilmesinin yanı sıra, iç zar sistemi ökaryotik hücrelerin yeni sentezlenmiş protein, karbonhidrat ve lipitlerin hücre dışına taşınmasını ve düzenlenmesini de sağlamaktadır. Biyosentetik salgı yolağı ise, hücre tarafından üretilen moleküllerin bir dizi adımlar halinde değiştirilmesi, ihtiyaç duyulana kadar depolanmaları ve eksositoz işlemi ile hücre dışına taşınmalarını sağlamaktadır (Kirchhausen 1999).

2.3. Kaplama Proteinleri (COPI ve COPII)

Ökaryotik hücrenin salgı yolu, zar bölmeleri için hedeflenen yeni sentezlenmiş proteinleri taşımak için gelişmiştir. Bu yola, bir alt bölümünden diğerine taşınmanın, donör organelleri üzerindeki düzenlenmiş sitoplazmik örtü proteinleri (COP)'ler tarafından oluşturulan veziküler taşıyıcıların aracılık ettiği düşünülmektedir (Sato ve Nakano 2007). Kaplama proteinleri, vezikülün etrafında bir kabuk oluşturur ve onu bir taşıma vezikülüne şekillendirir. veziküller tomurcuklanma reaksiyonunda oluşur, böylece sitoplazmik kaplama proteinleri (COP)'ler bir zar yüzeyinde toplanır, kargo moleküllerini yakalar ve zarı bir tomurcuk halinde deforme etmek için bir kafeste polimerize olurlar (Mancias ve Goldberg 2008). Hücreler, COPI, COPII ve birkaç klatrin / adapin kompleksleri dahil olmak üzere çeşitli COP'ler içerir ve veziküler taşımadaki özgüllük, kısmen belirli bir organel üzerindeki bir ihracat bölgesi için her bir kargo molekülleri, afinitesi ve taşıma sinyal sekansları için COP seçiciliği yoluyla türetilir (Mancias ve Goldberg 2008). COPI koatomer kompleksi, Golgi ve ER arasında

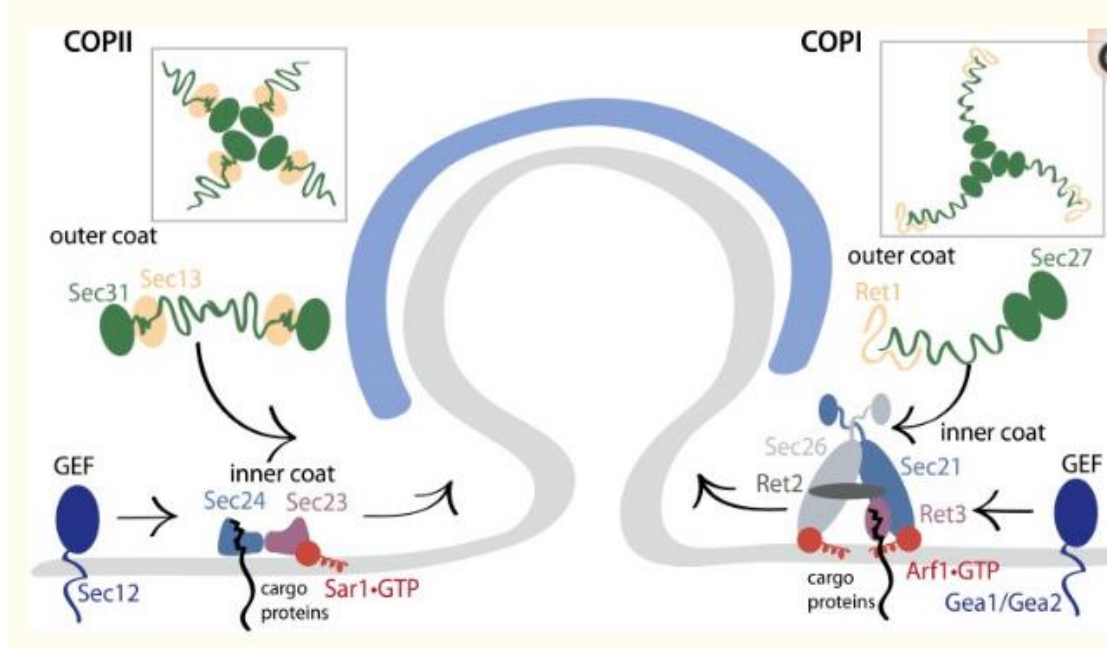
geriye doğru taşınmada işlev görür ve COPII kaplaması ER'den Golgi'ye proteinler iletir. Vezikül oluşumundaki rollerine ek olarak, kaplama proteinleri ayrıca proteinlerin sitoplazmik alanlarında bulunan spesifik sinyallerle etkileşerek proteinlerin veziküllere seçici olarak yakalanmasını sağlar. Çeket alımının doğru verici membrana kombinasyonu ve çeket ve kargo proteinleri arasındaki sinyale özgü etkileşimler veziküler taşınmanın yönlülüğüne ve doğruluğuna katkıda bulunur (Lee vd. 2004). Bu veziküler taşıyıcıların ortak bir özelliği, donör zarında kaplama montajını yönlendirmek için küçük guanin tirifosfataz (GTPaz)'lar kullanmalarıdır. Salgı yolundaki farklı aşamalarda farklı örtü proteinleri ve küçük GTPazlar kullanılır. Her vezikül oluşturma adımında, salgı kargo proteinleri seçici ve etkili bir şekilde taşıma veziküllerine ayrılırken, verici zarın bileşimi korunmalıdır (Sato ve Nakano 2007).

COPI veziküllerindeki (geriye doğru giden) retrograd yolağı geçen kargo proteinlerinin büyük çoğunluğunun doğası gereği tamamen katlanmış gibi görünmektedir; bu yol, kaçan ER sakinlerini geri almak ve vezikül oluşumu ve füzyonuna aracılık eden makineyi geri dönüştürmek için çalışır. Bununla birlikte, yanlış katlanmış çözünür proteinlerin kaderini inceleyen son çalışmalar, bazı yanlış katlanmış proteinlerin ER ile ilişkili bozulmaya, protein yıkımına (ERAD) geçmeden önce Golgiye gittiğini göstermiştir (Caldwell vd. 2001). Bu bağlamda, bir katlama gerekliliğinin tersi, bu yüklerin COPI veziküllerine alınmasında etkili olacaktır; sadece yanlış katlanmış proteinler bir veziküle erişebilir ve böylece salgı yolu boyunca daha fazla taşınması önlenir. Muhtemelen bu retrograd yolağı, yanlış katlanmış substratı sitoplazmik kaplamaya bağlayan bilinmeyen bir transmembran reseptörü yoluyla etki eder (Lee vd. 2004).

2.3.1. ER zarında COPII kaplama protein oluşumu

Ökaryotik hücrelerde sentezlenen tüm proteinlerin %20 ila %30'u, işlevlerini uygulamak için, hücre dışı boşluğa, plazma zarına ve iç organellere taşınması gerekmektedir (Tao vd. 2012). Bu kargo proteinlerinin neredeyse tamamı, ilk önce endoplazmik retikulum ER'den sentezlenir. COPII kaplı veziküller de, yeni sentezlenmiş proteinleri Golgi'ye taşımak için ER'den tomurcuklanır (Bi vd. 2007). ER, çeşitli hücresel şaperonlar yardımıyla katlama, montaj ve post-translasyon değişikliklerine tabi tutulur ve daha sonra proteinler COPII vezikülleri ile Golgi kompleksine taşınır. Golgi'den kargo proteinleri daha fazla ayrılır ve gerekli varış yerlerine taşınır.

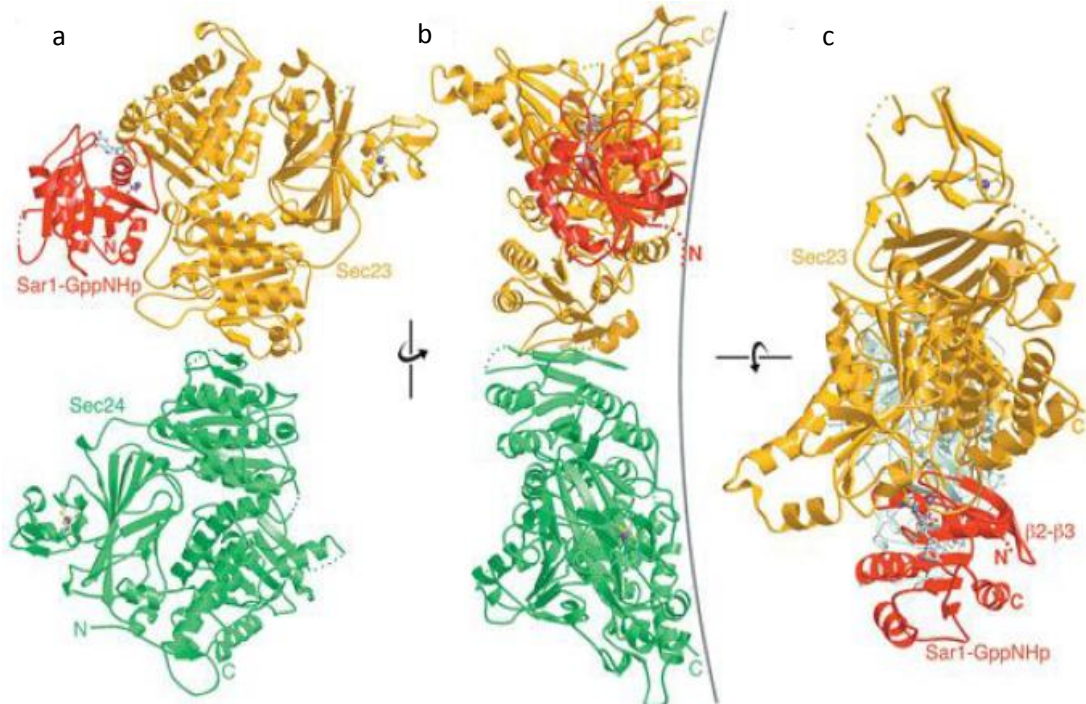
Proteinler salgı yolunda veziküller adı verilen küçük membranlı paketlerde bir organelden diğerine geçer. ER'den Golgi'ye vezikül hareketi, COPII ile kontrol edilir (Tao vd. 2012). COPII üç sitoplazmik protein alt birimlerinden; SAR1, SEC23/SEC24 ve SEC13/SEC31 ER membranı üzerine sıralı olarak bağlanmasıyla oluşur. COPII'nin tomurcuklanması G proteini Sar1'in GTP'ye bağlı formuna aktivasyonu ile başlatılır (Bi vd. 2007).



ŞEKİL 2.3.1. Kaplama veziküllerinin oluşumu: Kaplama düzeneği vezikül oluşumunu sağlar. Hem COPII (sol) hem de COPI (sağ) katlar, montajlarında Arf/Sar1 ailesinin küçük GTPazları tarafından yönlendirilir. COPII kaplamasında Sar1, ER membranına lokalize olan guanin nükleotit değişim faktörü (GEF) SEC12 tarafından aktive edilir. Aktif Sar1-GTP, “iç kaplama” katmanına karşılık gelen ve kargo bağlama fonksiyonunu sağlayan heterodimer SEC23/SEC24 dimerini alır. Daha sonra bir SEC13/SEC31 heterotetrameri alınır, "dış kaplama" oluşturulur ve membran eğriliğini sağlayan kafes benzeri bir yapıya polimerize olur. SEC13/SEC31 tarafından oluşturulan COPII kafesinde, SEC31'ün dört molekülü, kafenin (tepe noktası) “tepe noktasını” oluşturmak için β -pervane alanları aracılığıyla başa baş bir araya getirilir. COPI katmanı, gereksiz GEF'ler, Gea1 veya Gea2 tarafından tahrik edilen Arf1'in aktivasyonu üzerine toplanır. Arf1 sırayla klatrin AP-2 adaptör kompleksine homologisi olan SEC21 / SEC26 / Ret2 / Ret3'ün iç kaplama kompleksini işe alır. COPI dış kaplama, SEC27'nin üç β -pervane alanının (ek) etkileşimleri yoluyla bir triskelion yapısında bir araya gelen SEC27 / Ret1 / SEC28 tarafından oluşturulur (Barlowe ve Miller 2013)

Şekil üzerinde; iki farklı COPI VE COPII vezikülleri ve bu veziküllerin oluşması için gerekli olan proteinler belirtilmiştir. (Şekil 2.3.1.) Kaplama düzeneği küçük G proteinlerinin aktivasyonu ile başlar; COPII için Sar1 ve COPI için Arf1'in aktivasyonu gerekmektedir (Lee vd.2004). COPII vezikülü için, ER membranına ilk önce Sar1 bağlanır ve Sar1 tomurcuklanmanın başlaması için kaplama protein alt birimlerini ER zarına toplar (Antonny vd. 2001). Katmanın GTPaz aktivitesi, sırasıyla SEC12 (d'Enfert vd. 1991) ve SEC23'ün (Schekman vd. 1993) kanonik GEF ve GAP aktiviteleri ile örtü montajının/demontajının başlatılmasını düzenleyen birincil düzenleme modudur. Aynı zamanda, ilgili kargo proteinlerinin ayırt edilmesi (Sato ve Nakano 2005) ve vezikül bölünmesi gibi ek fonksiyonlara katkıda bulunur (Lee vd. 2005). SEC23 ve SEC31 diğer kaplama sistemlerinden farklı olarak COPII, örtü bileşenlerinin kendileri tarafından sağlanan bir birleşimsel GAP etkinliği kullanır

(Antonny vd. 2001). Bu GAP'ın minimal sistemlerde etkisi, kaplama tamamen monte edilir edilmez GTP'nin hidrolize edilmesi ve vezikülün hızlı bir salınmasıdır. Sar1-GDP'nin Sar1-GTP'ye dönüşümüne GEF aracılık eder (Sato ve Nakano 2007). Sar1-GTP, doğrudan kargo moleküllerine bağlanan iç tabakayı veya "tomurcuklanma" kompleksini oluşturmak için ilk olarak SEC23/SEC24'ün heterodimerik kompleksinin SEC23 alt birimine katalize yardımcı olan bir "arjinin bölgesi" sayesinde bağlanır (Barlowe ve Miller 2013). SEC23/SEC24 alt birimi temel zarlarla zenginleştirilmiş, altta yatan zarla geniş temas etmesi muhtemel olan ve membran deformasyonunu potansiyel olarak kolaylaştıran iç bükey bir yüzeye sahip papyon şeklinde bir kompleks oluşturur (Bi vd. 2007).



ŞEKİL 2.3.2. SEC23 ve SEC24 proteinlerinin üç boyutlu yapısı: Şerit gösterimi arka arkaya 90° dönüşler olarak gösterilmiştir. SEC23 sarı, SEC24 yeşil ve Sar1 kırmızı. **a)** Ön membran-proksimal yüzeyi öne bakacak şekilde, kaplama alt-birimleriyle ilişkili ikili görüntü. **b)** Görünüm Gri çizgi, ölçekli olarak çizilen 60 nm COPII vezikülün eğriliğini gösterir. **c)** Üstten görünüm. Üç Sar1'in membrana bakan bölgeleri C, N ve $\beta 2 - \beta 3$ olarak etiketlenir (Bi vd. 2002). Maya organizması model olarak alınmıştır

SEC23, GTPaz aktive edici proteindir (Yoshihisa vd. 1993). Ardından, Sar1/SEC23/SEC24 kompleksine dış tabakayı oluşturacak SEC13/SEC31 kompleksi de bağlanır. SEC31, SEC23'ün GAP (GTPaz aktive edici protein) aktivitesini uyararak, GTPaz aktivitesine katkıda bulunur. Her iki katman, Sar1'in katalitik döngüsüne katkıda bulunur. İç ve dış katman tamamen birleştiğinde maksimum GTPaz aktivitesi oluşmaktadır (Antonny vd.2001) Sar1; taşıma sinyallerine doğrudan bağlanarak, proteinlerin tanınmasında rol oynadığı gibi, ayrıca GTP hidrolizine bağlı olarak,

birleştirilmemiş kargo moleküllerinin COPII vezikül oluşumundan çıkarılmasını da destekler (Sato ve Nakano 2007). SEC23/SEC24, SEC13/SEC31 ve GTP kilitli Sar1'in bir karışımı, lipozomlardan kaplanmış veziküller oluşturmak için yeterlidir, bu proteinlerin kendiliğinden membranı deforme edebileceğini ve bir vezikülü sıkıştırabildiğini gösterir. COPII kaplı tomurcukların eğriliğinin oluşumuna ilişkin önemli bir ipucu, tomurcuklanma kompleksinin kristal yapısından gelir ve muhtemelen membranı oluşturan ve membran bükülmesini indükleyen pozitif yüklü, iç bükey bir yüzeye sahiptir. SEC13/SEC31 alt kompleksinin membran deformasyonuna katkısı hala net değildir, ancak bu alt kompleks tomurcuklanma öncesi kompleks tarafından üretilen eğriliği (bükülmeyi) stabilize edebilir (Bonifacino ve Glick 2004).

2.4. Vezikül Bağlama

Katlanmış bir salgı proteininin ER'dan sonra ziyaret ettiği bir sonraki istasyon, glikan yan zincir modifikasyonu ve proteolitik bölünmede işlev gören Golgidir (Lee vd. 2004). ER membranlarından COPII veziküllerinin serbest bırakılmasından sonra, bağlama ve füzyon makineleri ER türevi vezikülleri bir düzineden fazla gen ürününün etkisiyle Golgi alıcı membranlara yönlendirir (Barlowe ve Miller 2013). ER çıkış yerleri *cis*-Golgi (CGN) (giriş ara yüzü) yakınında ve hücre çevresinde meydana gelir. Periferik ER bölgeleri ve *cis*-Golgi arasında taşıma mikrotübüle bağlıdır ve nispeten büyük tübüler-veziküler membran kümeleri içerir (Presley vd. 1997). Toplu olarak, bu Golgi öncesi membranlara diğerleri arasında ER-Golgi ara bölmesi (Hauri ve Schweizer 1992) veya veziküler tübüler kümeler (VTC)'ler denir. *Trans*-Golgi ağı (TGN) (çıkış ara yüzü), proteinleri hücre yüzeyine gönderen veya protein yıkımından sorumlu olan vakuol / lizozom dahil olmak üzere endomembran sisteminin ek bölmelerine veya çeşitli endozomal bölmelere yönlendiren bir ayırma istasyonu görevi görür. Plazma membranı, TGN ve lizozom / vakuol arasındaki protein sıralama olaylarında geniş ölçüde işlev görür (Lee vd. 2004).

Vezikül ve Golgi alıcı membranlar arasındaki membran füzyonu, membran bölmelerinden SNARE protein komplekslerinin birleştirilmesi yoluyla katalize edilir. Vezikül bağlama ve füzyon eylemine COPII ile kaplanmış veziküllerin anterograd dağıtımına çeşitli bağlama ve füzyon kompleksleri aracılık eder. Protein taşıma parçacığı (TRAPP) kompleksi, bir COPII vezikülünün yüzeyinde ilk olarak Sec23'e bağlanır ve Rab ailesi üyesi Ypt1'in lokal aktivasyonuna aracılık eder. Anterograd yolda, dağılabilir veziküller, p115'in maya homologu olan Uso1 ilavesi ile Golgi zarlarına demirlenir (Barlowe 1997; Cao vd. 1998; Lord vd. 2011). Uso1 / p115, genişletilmiş oligomerik bir yapı oluşturan büyük bir sarmal bobin proteindir. Muhtemelen SNARE kompleks montajını kolaylaştırır (Sapperstein vd. 1996). TRAPP ayrıca, p115 / Uso1'in membranlara alımından sorumlu olan Rab1 homologu, Ypt1 (Jones vd 2000; Wang vd. 2000) için bir GEF olarak in vitro işlev görür (Cao vd. 1998; Allan vd. 2000). Bu nedenle, COPII veziküllerinin Golgi membranlarına bağlanması, muhtemelen YOP1'i Uso1'i toplamak için aktive edecek olan TRAPP yoluyla COPII veziküllerinin ilk bağlanmasını içerecektir. Uso1'in bağlanması, vezikülün membran ile birleşmesini stabilize eder ve ayrıca SNARE montajını kolaylaştırır, böylece vezikül içeriğinin membran füzyonuna ve verilmesine yol açar (Whyte ve Munro 2002). Uso1'e ek olarak vezikül bağlanmada ikinci bir büyük oligomerik kompleks de işlev görecektir. Ypt – GTP, uzun sarmal bobin ipine benzer ve Uso1 gibi akış aşağı efektörleri toplar. Bir Golgi-lokalize kinaz, Hrr25, SEC23'ü fosforile eder ve TRAPP'yi

yer değiştirir, belki de kat dökülmesine katkıda bulunur. Kaplamanın çıkarılması, membran karışımını sürmek için birleşen füzojenik SNARE proteinlerini ortaya çıkarır. Retrograd yolağında, COPI kaplı veziküller, gelen vezikülü tanımak ve örtü salımını ve SNARE eşleşmesini tanımak için Dsl1 / Sec39 / Tip20'den oluşan DSL1 kompleksini kullanır (Barlowe ve Miller 2013). Golgi alıcı membranlara COPII'ye bağlı taşıma için çok alt üniteli TRAPPI kompleksi gereklidir (Rossi vd. 1995; Sacher vd. 1998). *In vitro* analizler, TRAPPI'nin COPII veziküllerini Golgi membranlarına fiziksel olarak bağlamak için işlev görebildiğini ortaya koymuştur (Sacher vd. 2001). Yapısal analizler, TRAPPI'nin altı tane alt birimden oluşan bir 170 kDa (kilodalton) parçacığı olduğunu göstermektedir. Bunlar; Bet3, Bet5, Trs20, Trs23 Trs31 ve Trs33'dür (Kim vd. 2006). Bet3, doğrudan SEC23'e ve periferik olarak membranlara bağlı TRAPPI ile bağlanabildiğinden, bu aktivitenin kısmen kaplanmış COPII vezikülleri Golgi alıcı membranlara bağladığı düşünülmektedir (Cai vd. 2007). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada Golgi ile ilişkili Hrr25 kinazın, SEC23/SEC24'ü fosforile ettiği ve anterograd taşınmanın yönlülüğünü kontrol etmek için SEC23 ve TRAPPI arasındaki etkileşimleri düzenlediği bildirilmiştir. Ayrıca, TRAPPI Golgi alıcı membranların ve COPII veziküllerin yüzeyinde aktive edilmiş Ypt1 için bir GEF olarak işlev görür (Lord vd. 1998). TRAPPI doğrudan Usol ile etkileşime giriyor gibi görünse de, Ypt1 aktivasyonu Usol'in aracılık ettiği uzun mesafeli birleşme olayını daha yakın bir TRAPPI'ye bağlı, bağlama olayı ile koordine etmeye hizmet edebilir. TRAPPI'nin Golgi ve vezikül membranları üzerindeki kesin yönü bilinmemektedir, ancak mevcut modeller, bu çok alt üniteli kompleksin COPII veziküllerini *cis*-Golgi yüzeyine bağladığını ve SNARE aracılı membran füzyonuyla vezikül bağlamayı koordine etmekte ve bir merkez görevi gördüğünü göstermektedir. COPII vezikül bağlama ve füzyon için uyumlu bir modeldir (Barlowe ve Miller 2013). Çok üyeli TRAPPI, vezikül bağlama ve füzyon olaylarını koordine etmek için *cis*-Golgi membranları veya vezikülleri üzerinde bir organizasyon merkezi olarak hizmet edebilir. TRAPPI, COPII alt birimi SEC23 ile Ypt1 GTPaz ve potansiyel olarak SNARE proteinleri ile etkileşime girer, bağlama ve füzyon aşamalarına da katılır (Jang vd 2002; Kim vd. 2006).

Bağlı COPII veziküllerin *cis*-Golgi membranları ile füzyonu, bir dizi membrana bağlı SNARE proteinine bağlıdır. Çeşitli kanıtlar SNARE proteinleri Sed5, Bos1, Bet1 ve SEC22'nin mayadaki bu membran füzyon olayını katalize ettiğini göstermektedir (Cao ve Barlowe 2000). Ayrıca bu SNARE seti, Golgi membranları ile COPII vezikül füzyonu durumunda membran füzyonunu katalize etmek için yeterlidir (Parlati vd. 2000).

2.5. Golgi İçindeki Trafik

Vezikül aracılı organeller arasındaki taşınmanın son adımı, vezikülün alıcı bölmeyle kaynaşmasıdır. Bu işleme, vezikül ve alıcı zarları yakınlaştırarak füzyonu sürdürebilmek için spesifik kombinasyonlarda etkileşen transmembran SNARE proteinleri aracılık eder. SNARE'lerin sitoplazmik alanları, genellikle her bir sarmalın tek bir transmembran proteininin katkısıyla dört sarmallı bir demet halinde birleşir. Bu nedenle, membran füzyonunu sürdürebilmek için dört farklı SNARE kombinasyonu gereklidir. Sentetik lipozomlara yeniden yapılandırılmış SNARE'lerle yapılan *in vitro* füzyon deneyleri, membran füzyonuna aracılık eden SNARE'lerin spesifik kombinasyonlarının tanımlanmasında etkili olmuştur (Fukuda vd. 2000; Parlati vd.

2000). Yeni sentezlenen salgı proteinleri COPII veziküllerinde *cis* -Golgi'ye ve Golgi kompleksinden membran füzyonu ilerledikten sonra ulaşır. Salgı yükü, kargo farklı Golgi bölmelerinden ilerledikçe dış zincir karbonhidrat modifikasyonları ve proteolitik işleme alabilir (Barlowe ve Miller 2013).

2.6. SEC23 veya SEC23B Geni İle Yapılan Moleküler Çalışmalar

SEC23 ve *SEC23B* genleri ile daha çok insan hücreleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bitki ve hayvan biyoteknoloji alanlarının yanısıra, özellikle bu genler ve mutasyonları ile insanlarda kan hastalıkları ve kanser türleri en çok araştırılan konulardır.

Saccharomyces cerevisiae'nin COPII vezikülünün bir alt birimi olarak işlev görmediği görülen yeni bir SEC23 paralog Nell içerdiği gösterilmiştir. Nell, COPII bileşenlerinin hiç biriyle ilişkili değildir, ancak güçlü Sar1 GAP aktivitesi sergiler. Nell'in kromozomal silinmesinin sıcaklığa duyarlı sar1D32G'de önemli bir büyüme hatasına yol açtığı gösterilmiştir. Bu proteinler arasında olası bir fonksiyonel bağlantı olduğunu düşündürmektedir. ER membranındaki ER çıkış yerlerinde ağırlıklı olarak lokalize olan SEC23'ün aksine, Nell'in büyük bir kısmı sitozol boyunca lokalizedir. Bu makalaya göre, Nell'in Sar1 için yeni bir GAP olarak olası bir rolünü vurgulamaktadır (Kodera vd. 2014).

İnsanlarda SEC23B eksikliği, anormal kırmızı kan hücresi gelişimi hastalığı olan konjenital diseritropoietik anemi tip II ile sonuçlanırken, SEC23A eksikliği, kusurlu kollajen sekresyonuna bağlı kemik anormallikleri (ancak kırmızı olmayan) ile karakterize edilen bir hastalıktır (kan hücresi defekti). Bu çalışmada, SEC23A ve SEC23B'in işlevle örtüştüğünü, türler içinde ve arasında SEC23A/SEC23B eksikliğinin farklı fenotiplerinin büyük olasılıkla SEC23 paraloglarının farklı işlevlerinden ziyade gen ekspresyon programlarındaki evrimsel değişimlere bağlı olduğu gösterilmiştir. Bu makalede SEC23B eksikliğinde SEC23A'nın hücreyi ölmekten kurtardığı ve tek başına işlev görebileceği keşfedilmiştir (Khoriaty vd. 2018).

Kaplama protein kompleksi II'nin (COPII) temel bileşeni olan *SEC23*, yeni sentezlenmiş proteinleri ve lipitleri salgılama için hücrelerdeki Golgi kompleksine, ER'dan taşıma işlevi görür. SEC23 proteininin iki izoformu (SEC23A ve SEC23B) vardır ve bunların anormal ekspresyonu ve mutasyonlarının insan hastalıklarına ve onkogeneze neden olduğu bildirilirken, SEC23A ve SEC23B'nin insan kanserinde belirsiz bir nedenden ötürü ters aktiviteye sahip olabileceği bildirilmiştir. Bu derleme SEC23, COPII vezikül nakli, otofaji ve kanserle ilgili son araştırmaları özetlemektedir. Bugüne kadar, SEC23A ve SEC23B ile ilişkili çeşitli mutasyonlar insan hastalıklarında rapor edilmiştir, ancak hastalarda tam SEC23B eksikliğinin hücreler için ölümcül olabileceğini gösteren iki boş SEC23B alelinin olmadığı belirtilmiştir (Jing vd. 2019).

SEC23B, salgı proteinlerini endoplazmik retikulumdan (ER) Golgi aparatına taşıyan örtü protein kompleksi II (COPII) veziküllerinin bir bileşenidir. Fonksiyon kaybı *SEC23B* mutasyonları, azalmış SEC23B seviyelerinden kaynaklanan nadir bir anemi formuna neden olur. Son zamanlarda germline heterozigot *SEC23B*'yi belirlemiştir ve potansiyel olarak kanser yatkınlığı olan varyantlardır. Mutant SEC23B,

ER stres aracılı tümör oluşumu ile ilişkilidir ve SEC23B'de ekspresyonu azalmadığı görülmüştür. Burada, ER/Golgi'deki klasik dağılıma ek olarak, SEC23B mutantının nükleol içinde var olduğu gösterilmiştir. Bu, diğer COPII proteinlerinden bağımsız olarak meydana gelir ve salgı fonksiyonundan ödün vermez. Mutant hücreler, ER stresi varlığında artmış ribozomal protein ve translasyonla ilişkili gen ekspresyonuna ve artmış translasyon kapasitesine sahiptir. SEC23B mutantının, ribozomal DNA promotöründe artan UBF transkripsiyon faktörü bağlanması ile UBF transkripsiyon faktörüne bağlandığı gösterilmiştir. Sonuçlar, SEC23B'nin özellikle ribozom biyogenez yolağında, kanonik olmayan potansiyel COPII'den bağımsız fonksiyona sahip olduğunu göstermiştir (Yehia vd. 2018)

Konjenital diseritropoietik anemi tip II (CDAII), kemik iliğinde artmış birçok çekirdekli eritroid öncüleri ile karakterize, etkisiz eritropoezde otozomal resesif bir hastalıktır. CDAII, SEC23B'deki mutasyonlardan kaynaklanır. SEC23 proteini, salgı proteinlerini endoplazmik retikulumdan golgiye taşıyan örtü proteini kompleksi II ile kaplanmış veziküllerin temel bileşenidir. CDAII'nin altında yatan genetik defekt tanımlanmış olmasına rağmen, bu hastalığın patofizyolojisi bilinmemektedir. Daha önce, SEC23B eksikliği olan farelerin, pankreatik dejenerasyon gösteren, perinatal olarak öldüğünü ve yetişkin hematopoietik kompartımanın bu erken mortalite sınırlamasını değerlendirdiği bildirilmiştir. Şimdi ise hematopoietik kompartımanla sınırlı SEC23B eksikliğine sahip farelerin normal hayatta kaldığını ve anemi veya diğer CDAII özellikleri göstermediği bildirilmektedir. Ayrıca, SEC23B eksikliği olan hematopoietik kök hücrelerin (HSC), rekabetçi bir repopülasyon analizinde doğrudan vahşi tip HSC ile karşılaştırıldığında hematopoezin sulandırılmasında bir dezavantaj göstermediği de gösterilmektedir. İkincil kemik iliği nakilleri, hematopoietik rekonstitüsyon potansiyellerinde SEC23B eksikliği ve vahşi tip HSC'nin eşdeğerliğini sürekli olarak göstermiştir. SEC23B eksikliği olan fareler ve insanlar arasındaki fenotiplerdeki şaşırtıcı uyumsuzluk, SEC23 paralog fonksiyonu ve ekspresyonunda evrimsel bir değişimi veya eritropoez için kritik olan spesifik bir COPII yükündeki bir değişikliği yansıtabilmektedir (Khoriaty vd. 2014).

Konjenital diseritropoietik anemiler (CDA'lar) fenotipik ve genotipik olarak heterojen hastalıklardır. CDA tip II (CDAII) en sık görülen CDA'dır. Etkisiz eritropoez ve kemik iliğinde iki ve çok çekirdekli eritroblastların varlığı ile karakterize edilir, sitokinez bozukluğu gösteren eşit büyüklükte ve DNA içeriğine sahip çekirdeğe sahiptir. Periferik kırmızı kan hücrelerinin diğer özellikleri protein ve lipit disglukosilasyonu ve endoplazmik retikulum çift membran kalıntılarıdır. Diğer hematopoietik soyların gelişimi normaldir. CDAII'si olan bireyler, potansiyel olarak karaciğer sirozu veya kalp yetmezliği ile progresif splenomegali, safra taşı ve aşırı demir yükü gösterir. Bu makalede, salgı COPII bileşenini SEC23B kodlayan genin CDAII'de mutasyona uğradığı gösterilmiştir. *SEC23B* ekspresyonunun kısa saç tokasına benzer ve RNA (shRNA) aracılı baskılanması, sitokinez kusurunu yeniden özetlemektedir. Zebra balıklarında, *sec23b*'in mutasyonu da anormal eritrosit gelişimine yol açmaktadır. Sonuçlar, eritroid farklılaşmasında SEC23B seçiciliği için in vivo kanıt sağlamakta ve SEC23A ve SEC23B'nin, yüksek oranda ilişkili paralog sekretuar COPII bileşenleri, olmasına rağmen eritrosit olgunlaşmasında gereksiz olmadığını göstermiştir (Schwarz vd. 2018).

Metastaz kolorektal kanser (CRC) ölümcül kanser türlerinden biridir. Bununla birlikte, CRC metastazında yer alan protein taşıma işlemi belirsizliğini korumaktadır. Bu makalede, CRC numunelerindeki somatik mutasyonları ve protein taşıma geni *SEC23* homolog B'nin (*SEC23B*) bulunan mutasyonlarını tanımlamak için metakron karaciğer metastazı olan hastalarda, tam ekzom sekanslama ve biyoinformatik analizi kullanılmıştır. *SEC23B*'nin silinmesinin yapışma proteinlerinin membran lokalizasyonunun baskılandığı ve hücre hareketliliğini artırdığı gösterilmiştir. *SEC23B* mutasyonları erken durmaya (C649T) neden olur veya protein taşıma aktivitesini (C1467G ve T488C + G791A + G2153A) bozar. Ayrıca, *SEC23B* mutasyonları epitelyal hücre yapışma molekülünün (EPCAM) ve CD9 molekülünün taşınmasını engeller, böylece hücre yapışmasını azaltır ve hem in vitro hem de in vivo invazivliği artırır. Birlikte ele alındığında bu veriler, *SEC23B* mutasyonlarının metastaz üzerindeki önemli etkisini göstermektedir ve *SEC23B*'nin CRC metastazının potansiyel bir baskılayıcı olduğu gösterilmiştir (Yang vd. 2020).

İnsanlarda, *SEC23B*'deki fonksiyon mutasyonlarının kaybı, kusurlu eritroid gelişimiyle sınırlı bir hastalık olan Konjenital Diseryropoietik Anemi tip II (CDAII) ile sonuçlanır. Daha önceki çalışmalarda, *SEC23B* eksikliği olan farelerin perinatal olarak öldüğünü, masif pankreatik dejenerasyon sergilediğini ve hematopoietik *SEC23B* eksikliği olan farelerin CDAII sergilemediğini bildirilmiştir. Şimdi küresel *SEC23B* eksikliği olan farelerde gözlenen ölümcüllüğü açıklamak için pankreasla sınırlı *SEC23B* eksikliğini yeterli olduğunu gösterilmiştir. İmmünohistokimyasal lekeler asiner hücre defekti gösterir, ancak normal adacık hücrelerini gösterir. Memeli genomları *SEC23A* ve *SEC23B* olmak üzere iki *SEC23* paralog içerir. Kodlanan proteinler ~ % 85 amino asit dizisi özdeşliğini paylaşmaktadır. Pankreatik *SEC23A* eksikliği olan fareler üretilmiştir ve bu farelerin normal olarak hayatta kaldıklarını, normal pankreatik ağırlıklar ve histoloji sergiledikleri gösterilmiştir. Birlikte ele alındığında, bu veriler murin pankreas gelişimi için *SEC23B*'nin değil *SEC23A*'nın gerekli olduğunu göstermektedir. *SEC23B*'yi kapsayan iki BAC transgeninin, bir *SEC23B* gen tuzağı aleli için homozigot farelerin ölümcüllüğünü kurtardığını, pankreas ölümcüllüğünün nedeni olarak bir yolcu gen mutasyonu hariç tuttuğunu ve *SEC23B* pankreatik fonksiyonu için kritik olan düzenleyici elemanların BAC içinde bulunduğunu göstermektedir (Khoriaty vd. 2016).

Arabidopsis thaliana genomunda *SEC23*, bir COPII bileşeninin yedi homologunu (*SEC23A*, *SEC23B*, *SEC23C*, *SEC23D*, *SEC23E*, *SEC23F*, *SEC23G*) kodlamaktadır. Ancak, bu çeşitliliğin fonksiyonel önemi hala açıktır. Burada sırasıyla *A. thaliana SEC23* homologlarından ikisi olan *AtSEC23A* ve *AtSEC23D* için nakavt ve nakavt hatları analiz edilmiştir. Tek *atsec23a* ve *atsec23d* mutant bitkiler, normal doğurganlığa rağmen, bozulmuş ekin paterni gösterdi. Çift *atsec23ad* mutant bitkileri yarı sterildir. Polen ve teyp hücrelerinde gelişimsel kusurlar sergilemiştir. *Atsec23ad mutantının* polen taneleri kusurlu, *eksine* ve *intine*'ye sahipti ve hücre dejenerasyonu belirtileri göstermiştir. Ayrıca, teyp hücrelerinin gelişimi organellerde yapısal anormallikler ile değiştirilmiştir. *AtSEC23A* ve *AtSEC23D*, COPII proteinlerinin karakteristik lokalizasyon paternini sergiledi ve tapetumda yüksek oranda eksprese edilmiştir. Bu çalışma, *AtSEC23A* ve *AtSEC23D*'nin polen duvarı oluşumu için gerekli lipidlerin ve proteinlerin ER ihracatını düzenleyerek polen duvarı gelişimi ve ekin

paterni düzenleyebileceğini göstermektedir. Ayrıca sonuçlar *SEC23* homologlarının fonksiyonel heterojenliğine ışık tutmuştur (Aboulela vd. 2018).

2.7. *SEC23* Geninin Bulunduğu Organizmalar

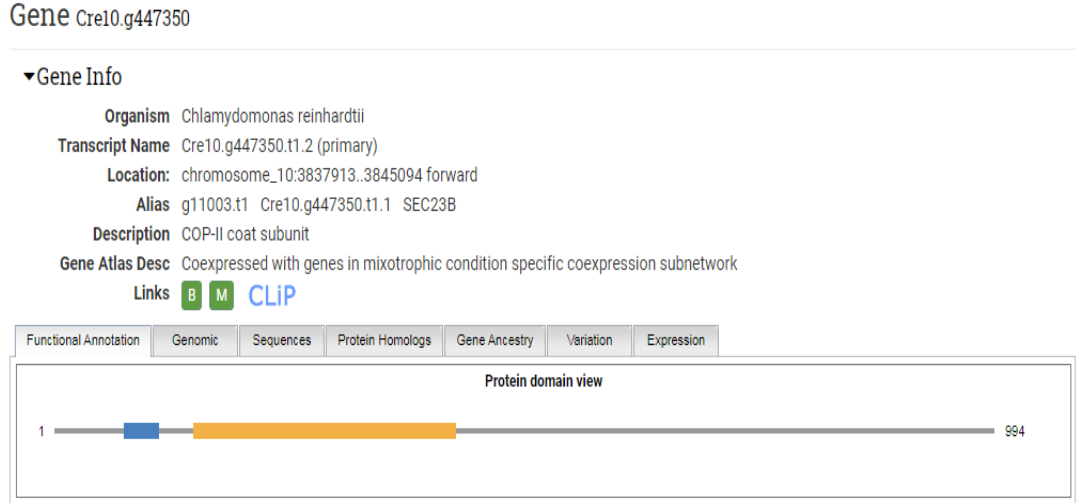
ÇİZELGE 2.7.1. *SEC23* geninin bulunduğu organizmalar; mevcut gen sayıları

<u>Organizmanın ismi</u>	<u><i>SEC23</i> Gen Sayısı</u>	<u>Gen Sayıları</u>
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	<i>SEC23A, SEC23B</i>
<i>Volvox carteri</i>	1	<i>SEC23B</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	<i>SEC23, SEC23A,</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	7	<i>SEC23A,</i> <i>SEC23B,SEC23C,</i> <i>SEC23D, SEC23E,</i> <i>SEC23F, SEC23G</i>
<i>Mus musculus</i>	2	<i>SEC23A, SEC23B</i>
<i>Homo sapiens</i>	2	<i>SEC23A, SEC23B</i>

3) MATERYAL ve METOT

3.1. *C. reinhardtii*'deki *SEC23B* Geni

SEC23B geni ve gene özgü bilgiler, phytozome veri tabanından alınmıştır. Bu veri tabanında gen ve gene ait olan protein sekansı, genin insersiyon tahminleri gen bölgesine göre oluşturulan primerler, domain ve daha birçok bilgiye ulaşılabilir.



ŞEKİL 3.1. *C. reinhardtii*'de bulunan *SEC23B* geninin özellikleri; organizmanın ismi, bulunduğu konumu, görevi, genomik ve protein sekansları vb. gibi

CLiP sekmesinden *SEC23B* genine uygun olan primerlere ulaşılabilir. CLiP web sitesi, yeşil alg *Chlamydomonas reinhardtii*'deki mutant suşların bir koleksiyonuna erişim sağlar. Kloroplastların biyolojisi, fotosentez, kirpikler / flagella ve alg lipit birikimi dahil olmak üzere birçok çeşitli temel süreçleri incelemek için güçlü bir model sistemdir. Suşlar [Chlamydomonas Kütüphane Projesi \(CLiP\)](#) tarafından üretilmiştir. Bu sitede bulunan suşlar Minnesota Üniversitesi'ndeki [Chlamydomonas Kaynak Merkezi](#)'nden sipariş edilebilmektedir. Çalışmamızda karakterizasyonu yapılan *sec23b* mutanı da bu merkezden alınmıştır.

Phytozome veri tabanından, bağlantılı olduğu CLiP sayfasına gidilerek güvenilirliği % 95 olan primerler seçilmiştir. *sec23b* mutanı, bu çalışmada CC5325 suşundan insersiyonel mutagenез yöntemiyle oluşturulmuştur (Li vd. 2019). Bu primerlerin ekson bölgesini hedef alması, mutasyonu doğrulamada önemli etkenlerdendir.

PCR için kullanılacak *SEC23B* genine ait primerler:

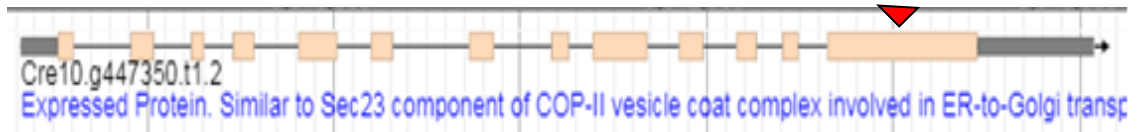
SP1-3utr-23B-R 5' - CCACACAGCATTGTTATCCG - 3'

SP2-Int12-23B-F 5' - ATTACCCAGCGCCTTACCT - 3'

SEC23B primerinin TM sıcaklığı (°C) 58'dir. Primerlerin çoğaltacağı tahmini genom parçası boyutu yaklaşık 1.5 kb büyüklüğündedir.

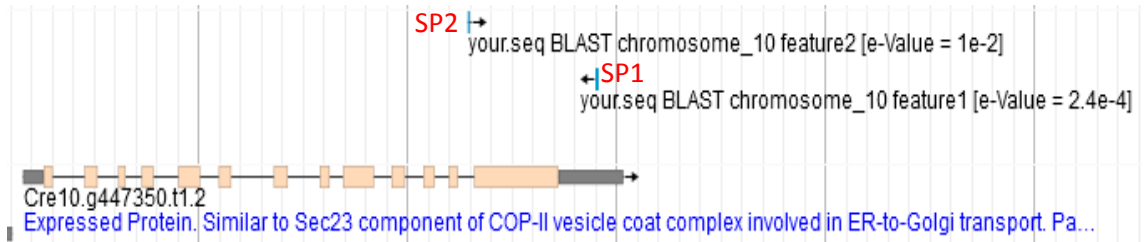
PCR için kullanılacak kontrol primerleri:OMJ-282-5' - ATGCTTCTCTGCATCCGTCT - 3'OMJ-284-5' - ATGTTTTACGTCCAGTCCGC - 3'SP1-Int20-24A-F 5' GCTGCCTCCCTCTCTCTCTT - 3'SP2-Up-24A-R 5' CACTGTACAGGCAGCCATTG - 3'

OMJ primerlerinin TM sıcaklığı (°C) 54, 24A primerlerinin TM sıcaklığı (°C) 58'dir. OMJ primerlerin çoğaltacağı tahmini genom parçası boyutu yaklaşık (1.270bp) 1.2 kb, 24A primerlerinin boyutu ise (1.414 bp) büyüklüğündedir.

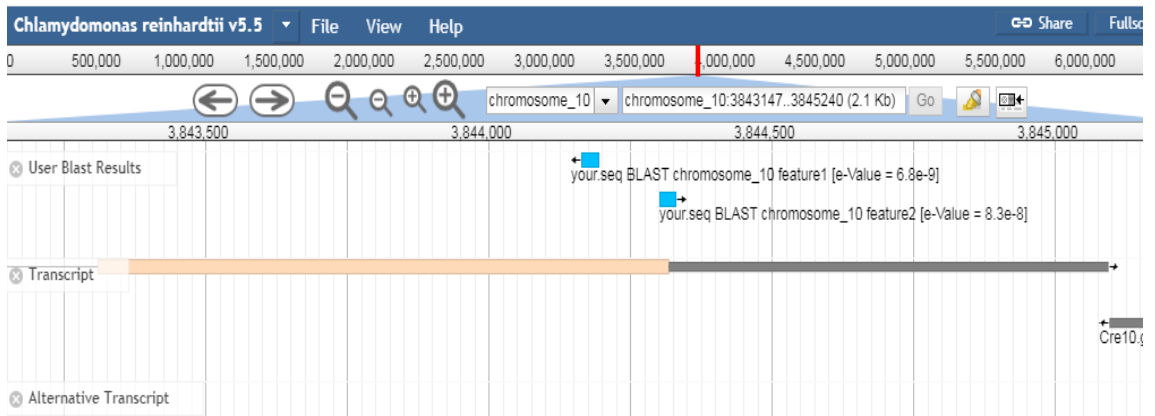


ŞEKİL 3.1.2. İnsersiyon bölgesini gösteren *SEC23B* genine ait insersiyon şeması

C. reinhardtii'de bulunan *SEC23B* geninin insersiyonu, 13. ekson (CDS) bölgesindedir. Gen üzerinde bulunan ekson bölgesindeki mutasyonlar, mRNA seviyelerindeki değişiklik ile bize insersiyon olup olmadığı hakkında bilgi verebilmektedir.



ŞEKİL 3.1.3. İnsersiyonun tespiti için 23B primerlerinin hedef bölgesi; SP1- R, SP2 - F



ŞEKİL 3.1.4. CLIP veritabanında verilen ve insersiyonu çevreleyen flanking (kenar dizisi) sekansları arası tahmini insersiyon bölgesi

SEC23B geni için CLİP veritabanında verilen bilgilere göre, insersiyon bölgesinin iki tarafı da % 95 oranında bilinmektedir. Bu iki bölgedeki flanking sekansların BLAST analizi sonucu kaç bazlık bir delesyon olduğu tahmin edilebilir. **Şekil 3.1.4.**'te gösterildiği üzere mavi renk ile belirtilen bölgeler arasında kalan alan delesyon bölgesidir ve yaklaşık 104 bazlık bir alandır.

3.2. Besi Yerlerinin Hazırlanma Protokolleri

3.2.1. TAP besi yeri hazırlanışı

TAP Ortamı için; (1L için) (nihai pH 7.0'a ayarlandı.)

1M Tris bazı (örn. Trizma)	20 ml (2,42 g)
Fosfat Tampon II	1.0 ml
Solüsyon A	10.0 ml
Hutner's iz elementleri	1.0 ml
*Glacial asetik asit	1.0 ml

*Tris-minimal ortam için asetik asit atlandı ve yerine pH 7.0'a, HCl ile besi yeri ortamı tamamlandı.

Fosfat Tampon II: (100 ml için)	
K ₂ HPO ₄	10,8 g
KH ₂ PO ₄	5,6 g

Solüsyon A: (500 ml için)	
NH ₄ Cl	20 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	5 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	2,5 g

Karışım tamamlandıktan sonra, üzeri ultra-filtre su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan TAP besi yeri, deneyler için sıvı veya katı olarak kullanılabilir. *C. reinhardtii* hücrelerinin normal büyümesi için, sıvı TAP besi yerine % 1,5 (15 g) agar eklenmiştir ve ardından otoklavlama (120°C basınç- 30 dakika) işlemi yapılmıştır. Hafif soğuyan besi yeri petri kaplarına dökülmüştür.

3.2.2. Azotsuz ortam: (1L için)

N içermeyen Beijerinck	50 ml
Minimal fosfat	75 ml
Hutner's iz elementleri	1 ml

N-free (Azotsuz) Beijerinck'in: (1L için)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g

Çökelmeyi önlemek için karıştırarak konmuştur.

Minimal için Fosfat Tamponu: (1L için)	
K ₂ HPO ₄	14,34 g
KH ₂ PO ₄	7,26 g

Karışım tamamlandıktan sonra, üzeri ultra-filtre su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2.3. Fosfatsız ortam: (1L için)

1M Tris bazı (örn. Trizma)	20 ml (2,42 g)
KCl solüsyon	1.0 ml
Solüsyon A	10.0 ml
Hutner's iz elementleri	1.0 ml
*Glacial (buzlu) asetik asit	1.0 ml

*Tris-minimal ortam için asetik asit atlandı ve yerine pH 7.0'a, HCl ile besi yeri ortamı tamamlandı.

Karışım tamamlandıktan sonra, üzeri ultra-filtre su ile 1 L'ye tamamlanmıştır.

3.2.4. Sülfatsız ortam: (1L için)

1M Tris bazı (örn. Trizma):	20 ml (2,42 g)
-S Beijerinck (1x)	50 ml
Fosfat Tampon II	1 ml
Hutner's iz elementleri	1.0 ml
*Glacial asetik asit	1.0 ml

*Tris-minimal ortam için asetik asit atlandı ve yerine pH 7.0'a, HCl ile besi yeri ortamı tamamlandı.

-S Beijerinck: (1L için)

NH ₄ Cl	8 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1 g
MgCl ₂ . 6H ₂ O	1,6 g

Karışım tamamlandıktan sonra, üzeri ultra-filtre su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Ek olarak sülfatsız ortama agar değil, agaroz konulmuştur.

3.2.5 Paromomisinli (antibiyotik) ortam

Otoklavlanmış falkon tüp içerisine 0,100 g (100 mg) olacak şekilde antibiyotik tartılarak konuldu ve üzeri yine otoklavlanmış su ile 10 ml'ye tamamlandı. Ardından 0,22 mg'lık filtreden geçirilen antibiyotik, önceden hazırlanmış sıvı TAP besi yerine eklendi. Eklendiği TAP besi yerinin otoklavdan yeni çıkmış ve henüz soğuma aşamasında olmasına dikkat edildi çünkü; antibiyotiğin TAP besi yeri henüz sıvı iken eklenmesi gereklidir. Bu aşamadan sonra antibiyotikli besi yeri, petri kaplarına döküldü. (Şekil 3.2.5.)



ŞEKİL 3.2.5. Paromomisin sülfat Antibiyotik; GOLDBIO (Gold Biotechnology) şirketinden satın alınmıştır

3.3. Total DNA İzolasyonu Protokolleri

3.3.1. Fenol - kloroform protokolü

- 1) Lizis tampon, her bir örnek için 300 μ l olacak şekilde 2 ml'lik steril ependorf tüplere dağıtılmıştır.
- 2) Steril kabin içerisinde izolasyonu yapılacak mutant, yabancı tip ve ebeveyn hücrelerine ait örnekler, steri tahta çubuklar ile lizis tampon içerisine eklenmiştir ve 15-20 dakika boyunca bekletilmiştir. Ardından 10-15 saniye boyunca vorteks yapılmıştır.
- 3) Her bir örneğe 4 μ l RNaz eklenmiş ve devamlı el ile çalkalanmıştır.
- 4) Hemen sonra her bir örneğe 300 μ l de fenol konulmuştur. Elde iyice çalkalandıktan sonra 5 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından 12.000 RPM'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Alttaki katı faza dokunulmadan, üstteki sıvı faz pipet ile çekilerek yeni steril ependorf tüplere alınmıştır. Buz üzerinde bekletilmiştir.
- 5) Fenölü temizlemek için iki defa kloroform aşaması yapılmıştır. Her bir örneğe 300 μ l kloroform konulmuş ve elde iyice çalkalandıktan sonra beş dakika buzda bekletilmiştir. Ardından 14.000 RPM'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır; yeni ependorf tüplere, üst faz alınmış ve alt faza dokunulmamıştır. Bu işlemler iki kere tekrarlanmıştır.
- 6) Yıkama işlemine geçilmiştir. %100'lük alkolden her bir örneğe 300 μ l eklenmiştir. 15 dakika buzda bekletilmiştir. Ardından 14.000 RPM'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır.
- 7) Santrifüjden çıkan örnekler, yavaşça sıvı kısım tamamen dökülerek temiz bir havlu üzerine kurumaya bırakılmıştır.

8) Her bir örneğe, % 70'lik alkolden 200 μ l konularak 14.000 RPM'de santrifüj yapılmıştır. Örnekler, temiz bir havlu üzerine 5 dakika kurumaya bırakılmıştır.

9) DNA-RNA free sudan örnekler kuruduktan sonra her birine 20 μ l konulmuştur. Buzdolabında +4'e kaldırılmıştır.

3.3.2. Thermo scientific GeneJET plant genomic DNA pürifikasyon mini kit protokolü

1) Mutantlara ait hücreler, steril tahta çubuklar ile alınarak hızlıca 350 μ L Lizis Tamponu A içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Örnekler iyice karıştırmak için 10-20 saniye vortekslenmiştir.

2) Hemen ardından 50 μ l Lizis Tamponu B ve 20 μ l RNaz A eklenmiştir. 1 dakika vorteks yapılmıştır. Örnekler, 65°C su banyosunda ara sıra vortekslenerek 10 dakika inkübe edilmiştir ve ters çevirerek karıştırıldıktan sonra buz üzerine konmuştur.

3) Örnekler 130 μ l precipitation (çökeltme) solüsyonu eklenmiştir ve tüpler 2-3 kez ters çevirerek karıştırılmıştır. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Ardından 14.000 RPM'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.

4) Süpernatantı yaklaşık 450-550 μ l olan üst faz yeni steril tüplere alınmıştır. Üzerine 400 μ l gDNA bağlama solüsyonu ve 400 μ l % 100 etanol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Bu karışımın yaklaşık olarak yarısı yeni filtreli tüplere alınmıştır. 8.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır ve filtrenin ucuna dokunmadan alttaki sıvı kısım dökülmüştür. Ardından karışımın diğer yarısı da filtreli tüpe aktarılmıştır ve 8.000 RPM'de santrifüj yapılmış ve yine tüpün altında ki akışkan çözelti atılmıştır.

5) Kolona 500 μ l yıkama tamponu I eklenmiştir. 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Tüpün altındaki akışkan çökelti atılmıştır.

6) Kolona 500 μ l yıkama tamponu II eklenmiştir. 14.000 RPM'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır. Tüpün altındaki akışkan çökelti atılmıştır. Ardından kolona hiçbir madde eklenmeden boş bir şekilde 14.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

7) Filtreli kısım yeni steril ependorf tüp içerisine alınmıştır. Genomik DNA elüe etmek için, kolon membranının merkezine 60 μ l elüsyon tamponu eklenmiş ve 10.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Aşağıda kalan sıvı kısım ependorf içerisinde kalmıştır ve numaralandırılarak -20'ye kaldırılmıştır.

8) Aynı filtreli tüpe ikinci elüsyon da yapılmıştır. Bu sefer kolona 30 μ l elüsyon tamponu eklenmiştir. 12.000'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Aşağıda kalan sıvı kısım ependorf içerisinde kalmıştır ve numaralandırılarak -20'ye kaldırılmıştır.

3.4. PCR Protokolü

sec23b mutantına ait örneklere (k-1, k-2, k-3, k-4), yabancı tiplere (CC124, CC125) ve ebeveyn olan CC5325'e yapılan DNA izolasyonu için aşağıdaki PCR protokolü uygulanmıştır.

3.4.1. PCR mix hazırlığı

- 1) İlk önce primerler hazırlanmıştır.
- 2) Tek bir tüpe, öncelikle saf su eklenip sırasıyla; Q solüsyon, 10× buffer (tampon), dNTP, primerler, Taq enzimi koyularak her kimyasal eklendiğinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- 3) Kimyasal karışımı 500 µl'lik mikrosantrifüj tüplerine aynı oranda 11,5 µl olacak şekilde eklenmiştir.
- 4) Son olarak numaralandırılan her bir tüpe kendi DNA örneğinden 1 µl eklenmiştir.
- 5) Kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıda **Çizelge 3.4.1'de** verilmiştir.

Çizelge 3.4.1. PCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar

<u>Kimyasallar</u>	<u>1X</u>
<u>Miktar/Reaksiyon</u>	
Q solution	2,5 µl
10× Buffer	1,25 µl
dNTPs	0,25 µl
Left primer	1,25 µl
Right primer	1,25 µl
Örnek DNA	1 µl
Taq	0,05 µl
H2O	4,95 µl
Toplam Hacim	12,5 µl

Temel mix (karışım) hazırlama protokolüne bağlı kalınarak, her seferinde örnek sayısına göre hesaplama yapılmıştır. Ayrıca her kimyasal ve su miktarından % 10 fazlası hesaplanmıştır. (**Çizelge 3.4.1.**)

Çizelge 3.4.2. PCR cihaz protokolü

SICAKLIK °C		ZAMAN
Denatürasyon	95 °C	5 dakika
Hibridizasyon 40 döngü:	95 °C	30 saniye
	54 °C	45 saniye
	70 °C	1 dakika 45 saniye
Polimerizasyon	72 °C	10 dakika
	72 °C	∞

sec23b mutantına ait SP1-3utr-23B-R ve SP2-Int12-23B-F primerleri ve kontrol primerleri olan OMJ primerleri için PCR'da bağlanma sıcaklığı 54 °C olarak ayarlanmıştır (**Çizelge 3.4.2.**). Biorad Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

3.5. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu; MACHEREY-NAGEL şirketine ait nukleoSpin RNA izolasyon kiti kullanılarak yapılmıştır.

- 1) İlk önce RNA kitinden çıkan ependorf tüplere; örnek sayısına göre her bir tüpte 350 μ l lizis enzimi RA1 ve 3,5 μ l β -mercaptoethanol (merkaptöetanol) olacak şekilde bu kimyasallar eklenmiştir. Bu karışım içerisine; *sec23b* mutantına ait (k-1, k-2) hücreleri, CC124 yabancı tip hücreleri ve CC5325 ebeveyn hücrelerinden steril tahta çubuklar ile örnekler alınıp eklenmiştir. Yaklaşık otuz saniye vorteks yapılmıştır.
- 2) Örnekler, kit içerisinde bulunan mor filtrelili 1,5 μ l'lik mikrosantrifüj tüpleri içerisine numaralandırılmalarına göre ~ 500-600 μ l dağıtılmıştır. Ardından hücreler; 21G, 10CC'lik steril enjektör şiringadan daha iyi parçalanması için 10-15 kez geçirilmiştir ve 11.000 RPM'de santrifüj yapılmıştır. Alt fazda bulunan pelete dokulmadan üst fazdaki süpernatant (sıvı kısım) yeni steril ependorf tüplere alınmıştır.
- 3) Homojenize edilmiş ependorf tüplerde ki her bir lizata %70'lik alkolden 350 μ l eklenmiştir, 5-6 kere pipetaj yapılarak ve el yardımıyla karıştırılmıştır. Örnekler kit içerisinde bulunan steril mavi tüplere aktarılmış, 11.000 RPM'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- 4) Mavi tüplere ait kolonlar 2 ml'lik yeni kapaksız ependorflara alınarak alt kısım atılmıştır. Her bir örneğe 350 μ l MDB (Membran Tuz Giderme Tamponu) eklenmiş ve membranı kurutmak için 11.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.

- 5) Her bir örneğe, önceden hazırlanan DNaz reaksiyon mix'ten, kolonun tam ortasına gelecek şekilde 95 μ l DNaz dağıtılmıştır. Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 6) Örnekler için kolonlara 200 μ l RAW2 tamponu eklenmiştir ve 11.000 RPM'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- 7) Kolonlar, yeni kapaksız steril 2 ml'lik tüplere alınmıştır. 600 μ l RA3 tamponu eklenmiştir ve 11.000 RPM'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır.
- 8) Kolonlar, yeni kapaksız steril 2ml'lik tüplere alınmıştır. Tekrar 250 μ l RA3 tamponu eklenmiştir ve 11.000 RPM'de 2 dakika santrifüj yapılmıştır.
- 9) Kolonlar, kit içerisinde çıkan 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Kolonun ortasına dokunmadan 50 μ l RNaz-free H₂O eklenmiştir. 11.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- 10) Santrifüj sonrası tüpün altında kalan sıvı kısım tekrar kolona dokunulmadan aynı kolona eklenmiştir ve 11.000 RPM'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır.
- 11) Ependorfta kalan son hacim not edilmiştir ve RNA RT-PCR işlemine kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.5.1. cDNA eldesi

Örneklerden izole edilen RNA'lar, Invitrogen şirketine ait SuperScript III Ters Transkriptaz protokolü uygulanmıştır.

- 1) Tek bir steril ependorf tüp içerisine; 1 μ l oligo (dT), 1 μ l dNTP ve her bir örnekten yaklaşık kaç nanogram olduğu hesaplanmış RNA miktarları 13 μ l'ye tamamlanacak şekilde eklenmiştir. RNA miktarı az eklenmesi gereken örnekler ise steril distile su ile tamamlanmıştır. 65 °C 5 dakika inkübe edilmiştir.
- 2) Başka bir steril ependorf tüp içerisine; bir örnek için 4 μ l First-strand tampon, 1 μ l DTT ve 1 μ l RNaseOUT eklenmelidir. Örnek sayısına göre bu hesap değişmiştir. Toplam miktar örnek sayısına göre eşit paylaştırılmıştır. PCR cihazında 60 dakika 55 °C'de inkübe edilmiştir.
- 3) PCR'dan çıkan örnekler, RT-PCR işlemine kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.5.2. RT-PCR reaksiyon mix hazırlığı

RT reaksiyonu için Invitrogen SuperScript III kiti kullanılmıştır.

1) RT-PCR için kullanılacak primerler hazırlanmıştır.

RT-PCR için kullanılacak SEC23B primerleri:

SP1-3utr-23B-R 5' - CCACACAGCATTGTTATCCG - 3' TM sıcaklığı 58°C derecedir
qSEC-23B-3utr-F 5' - TTTCGTGTGACTCGCTTACAAG - 3' TM sıcaklığı 64 °C derecedir. Primerler, gen üzerinde intron bölgesini hedef almıştır.

23B-exon-10 ve exon-11-R 5' - CGGTCTGACCTGGAAGACAT - 3'

23B-exon-F 5' - TCCCGAGTCACCTCCAGAC - 3' TM sıcaklığı 57°C derecedir. Primerler 209 bp büyüklüğündedir.

RT-PCR için kullanılacak kontrol primerleri:

qCBLP- F1 - CTTCTCGCCCATGACCAC

qCBLP-R1 - CCCACCAGGTTGTTCTTCAG TM sıcaklıkları 52 °C derece olarak belirlenmiştir.

SEC-23A-3utr-R TCAAACACTCCGCTACCCAT

SEC23A-E10-F GCCTACTTCTACGTGGTGGT TM sıcaklıkları 54 °C derece ve uzatma 50 saniye olarak belirlenmiştir.

2) Tek bir tüpe, öncelikle saf su eklenip sırasıyla; Q solüsyon, 10× buffer (tampon), dNTP, primerler, Taq enzimi koyularak her kimyasal eklendiğinde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

3) Kimyasal karışımı 500 µl'lik mikrosantrifüj tüplerine aynı oranda 11,5 µl olacak şekilde eklenmiştir.

4) Son olarak numaralandırılan her bir tüpe kendi cDNA örneğinden 2 µl eklenmiştir.

5) Kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıda **Çizelge 3.5.2'de** verilmiştir.

Çizelge 3.5.2. RT-PCR mix hazırlığında kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	1X
Miktar/Reaksiyon	
Q solution	2,5 µl
10× Buffer	1,25 µl
dNTPs	0,25 µl
Left primer	1,25 µl
Right primer	1,25 µl
Örnek cDNA	2 µl

Devamı Arkada

Taq	0,05 μ l
H2O	4,95 μ l
Toplam Hacim	13,5 μ l

Temel mix hazırlama protokolüne bağlı kalınarak, her seferinde örnek sayısına göre hesaplama yapılmıştır. Ayrıca her kimyasal ve su miktarından % 10 fazlası hesaplanmıştır.

3.5.3. RT-PCR cihaz protokolü

Primerlerin TM sıcaklıkları, *sec23b* mutantına ve kontrol primerlerine göre farklı derecelerde ayarlanmıştır. Biorad Thermal Cycler cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.5.3. RT-PCR cihaz protokolü

SICAKLIK °C		ZAMAN
Denatürasyon	95 °C	5 dakika
Hibridizasyon	95 °C	30 dakika
35-39 döngü	52 °C	40 dakika
Polimerizasyon	72 °C	50 saniye/20 dakika
	72 °C	5 dakika
	72 °C	∞

3.6 Jel Elektroforez

50× TAE; Elektroforez tamponu (1L için)

Tris	242 g
*Glacial asetik asit	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8.0	100 ml

*Glacial asetik asit yerine HCl kullanılmıştır.

0,5 M EDTA pH 8.0 (250 ml için)	
EDTA.2Na.2H2O	46,5 g
NaOH	~ 5 g

Yaklaşık 5 gr tartılan NaOH taneleri dH₂O'da ilk önce yavaş yavaş çözdürülmüştür. Aynı bir yerde EDTA yaklaşık 150 ml dH₂O'da karıştırılmaya başlanmıştır. Üzerine pH 8.0 olana kadar çözdürülmüş NaOH eklenmiştir. TAE elektroforez tamponu, pH ayarlandıktan sonra dH₂O ile 250 ml'ye tamamlanmıştır.

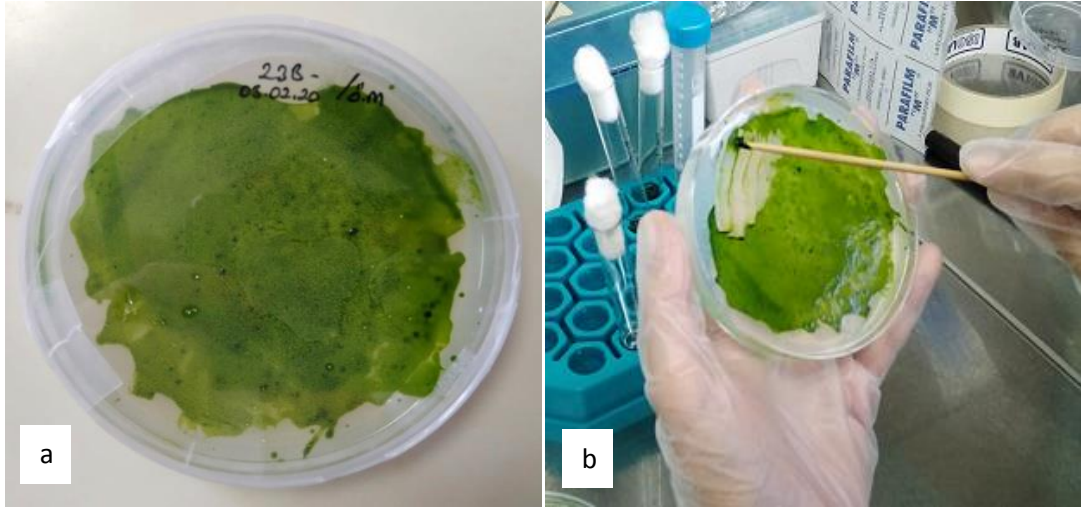
3.7. Genetik Bağlantının Belirlenmesi

3.7.1. Zigot oluşturma aşamaları

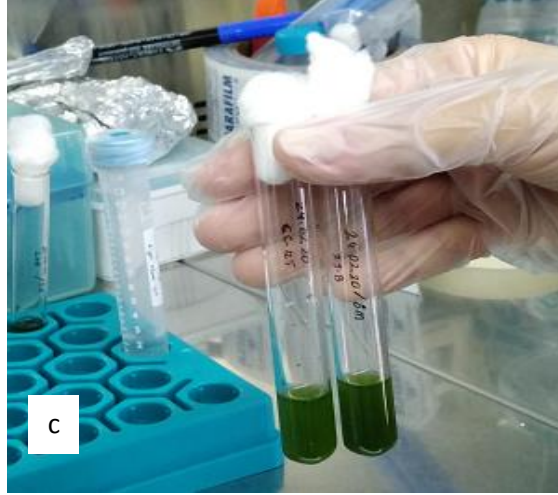
Genetik bağlanmanın belirlenmesi ve projeni testi için ilk önce zigotlar oluşturulmuştur. Zigot oluşturma aşamaları sırasıyla verilmiştir:

1) *sec23b* (MT-) mutantına ait 1 numaralı klonun, yabancı tip olan CC125 (MT+) ile çiftleştirilmesi ile zigot oluşturulmuştur. İlk önce %1,5' luk sıvı TAP besi yeri içerisine her iki örnekten de hücreler alınarak birkaç saat bekletilmiştir. Daha sonra hücreler, sıvı besi yerinden katı besi yerine pipet ile yaklaşık 250-300µl alınarak damlatılmış ve besi yerine yayılmıştır. Hemen ardından 1 hafta büyümeye bırakılmıştır. (Şekil 4.7.1a)

2) Hücreler, yeterince büyüdüktan sonra katı TAP besi yerinden, içinde azotsuz sıvı TAP besi yeri bulunan cam tüplere alınmıştır (Şekil 4.7.1c). *sec23b* ve CC125'e ait örnekler gamet oluşturmak için bir gece (~ 10-16 saat) ışık altında beklemek üzere laboratuvarında bırakılmıştır.



Devamı Arkada



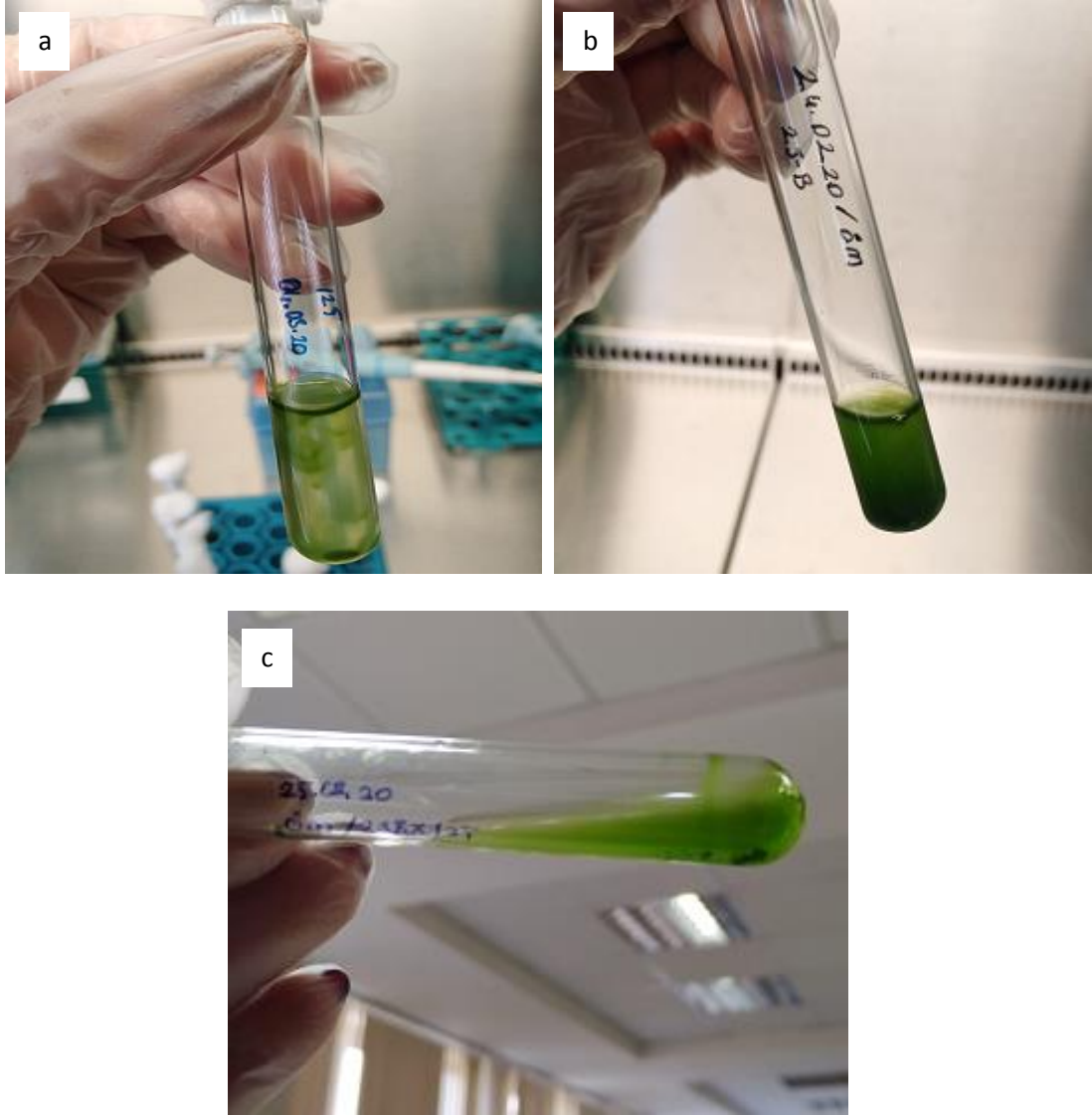
ŞEKİL 3.7.1. a) TAP besisi yerinde büyümüş olan *sec23b* mutant hücreleri. b) Hücrelerin toplanışı. c) Azotsuz ortama alınan *sec23b* mutant hücreleri ve CC125 yabancı tip hücreleri

3) Azotsuz ortamda bir gece ışık altında ($\sim 10-16$ saat) bekleyen *sec23b* mutantına ve CC125 yabancı tipe ait gametlerden, steril kabin içerisinde $100\ \mu\text{l}$ örnek alınıp tek bir ependorf içerisinde birleştirilmişlerdir. Aglütünasyon, füzyon vb. gibi diğer fenotipik davranışlar incelenmiştir. Sonuçlar, bulgular ve tartışma kısmında yer almaktadır.

4) Gözlemler tamamlandıktan sonra, içinde azotsuz ortam bulunan cam tüplerde en son karıştırılan *sec23b*-CC125 'in gametlerinin oluşturduğu zigotlardan $250-300\ \mu\text{l}$ alınmıştır. % 4'lük katı TAP besisi yeri petrilere yayılmıştır.

5) Petrilere ve cam tüplerde artan diğer gamet hücreleri de bir gece ışık altında bırakılmıştır ($\sim 10-16$ saat). Petrilere ertesi gün folyoya sarılarak karanlık alana kaldırılmıştır.

6) Cam tüplerdeki artan gametler ise, birleştirilip zigot oluşturduktan sonra % 4'lük katı TAP besisi yeri petrilere yayılmış, bir gece ışık altında bırakılmıştır. Ertesi gün bu petrilere de folyoya sarılarak karanlık alana kaldırılmıştır. Bu petrilereki zigotlara bir hafta olgunlaşma süresi verilmiştir.



ŞEKİL 3.7.1.2. a) CC125 yabancı tip gametleri b) *sec23b* mutan gametleri c) *sec23b*-CC125 gametlerinin zigot oluşturduktan sonra, bir gece ışık altında beklemiş pelet görüntüsü

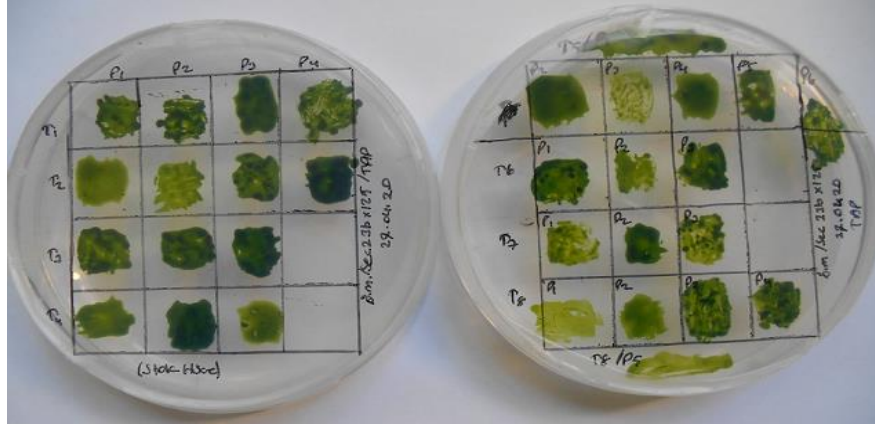
7) Bir hafta karanlıkta tutulan zigotlardan, birer tane alınarak yeni tabak dörde bölünerek ekilmiştir. Zigotların mayozla gitmesi için, ışık altında tutulmuştur.

8) Ertesi gün zigotların, mayozla gidip tetrad yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Tetratlar yeni tabaklara alınarak 10 gün büyümeye bırakılmışlardır.

3.7.2. Projeni testi (insersiyonun belirlenmesi)

10 gün boyunca TAP besi yerinde büyümeye bırakılan tetrad hücreleri, paromomisinli besi yerine alınmıştır ve dirençli/hassas olanlar belirlenmiştir. İncelenecek tetrad projenilerinin çiftleşme türünün (+/-) bulunması için her bir projeni, CC124 (-) ve CC125 (+) yabancı tipler ile çiftleştirilmiştir. Çiftleşme türü belirlenen ve seçilen projenilerin, insersiyonlarının tanımlanması için DNA izolasyonu ve PCR'ları yapılmıştır. Sonuçlar, bulgular ve tartışma kısmında verilmiştir.

Şekil. 3.7.2.1.'de Tetrat hücreleri ve projenilerinin büyümüş halleri verilmiştir. Tetrat 1 (T1)'de dört, T2'de dört, T3'de üç, T4'de üç, T5'de altı, T6'da üç, T7'de üç, T8'de beş Projeni gözlemlenmiştir.



ŞEKİL 3.7.2.1. TAP besi yerinde büyütülmüş *sec23b/CC125* zigotlarına ait; Tetratlar (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8)

3.8. Hücre Sayım Protokolü

sec23b mutantına ait k-1 hücreleri, yabanıl tip CC124 ve ebeveyn olan CC5325 hücrelerinin hücre sayımı yapılmıştır. Bu örneklerin hepsi tek koloniden çoğaltılmıştır.

- 1) 5ml'lik uzun cam tüpler içerisine 2ml sıvı TAP besi yeri eklenmiştir. Örnekler tek tek steril tahta çubuklar ile besi yerine karıştırılmıştır. 2 gün büyümeye bırakılmıştır
- 2) 100ml'lik flaska 50ml sıvı TAP koyulmuştur. Her bir örneğe büyüyen hücrelerden 2-3 damla damlatılmıştır. Bu başlangıç kültürü kabul edilmiştir. 2 gün büyümeye bırakılmıştır.
- 3) 2 gün sonra hücreler sayıldığında her mililitre başına $2,4 \times 10^6$ hücre / μ l hesaplanmalıdır. İstenilen hücre sayısına ulaştığında mililitreye 20×10^3 hücre / μ l ile asıl sayım için 250ml'lik flasklarda ikinci başlangıç kültürü oluşturulmuştur.
- 4) Yaklaşık iki gün sonra hücreler tekrar sayılmıştır ve bu sayım sıfırcı gün olarak kabul edilmiştir. 0, 3, 5, 7, 9 ve 10. günler sayılmıştır. Gerekli grafik oluşturulmuştur. Sonuçlar, bulgular ve tartışma kısmında verilmiştir.

3.9. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Pipetler ve pipet uçları: AXYGEN

Ependorf tüpler: ISOLAB

Mikroskoplar: EUROMEX ve ZEİSS PRİMOVERT

Santrifüj: ISOLAB

Tartı: KERN PLJ (Max 360g - Min 0.02g)

Steril kabin: Tez-San (CLASS 11A2)

Vorteks: Dragon Lab. MX-S

Otoklav: TOMY SX-500E (High-pressure steam sterilizer)

-80 Buzdolabı: Thermo SCIENTIFIC

Ultrasteril ve Steril su cihazı: MESS (mp minipure)

PCR ve RT-PCR cihazı: Biorad Thermal cyclers cihazı

BioDrop: PT. INDOLABUTAMA (BIODROP DUO)

Elektroforez: Fisher Scientific

Jel Görüntüleme Cihazı: DNR Bio-Imaging System (Mini Lumi cihazı)

Kullanılan tüm kimyasal maddeler SİGMA şirketinden alınmıştır.

4) BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. *Chlamydomonas reinhardtii*'de bulunan SEC23B Proteininin Biyoinformatik Çalışmaları

4.1.1. *C. reinhardtii*'deki SEC23B proteinin aminoasit dizilimi

>Cre10.g447350.t1.2

```

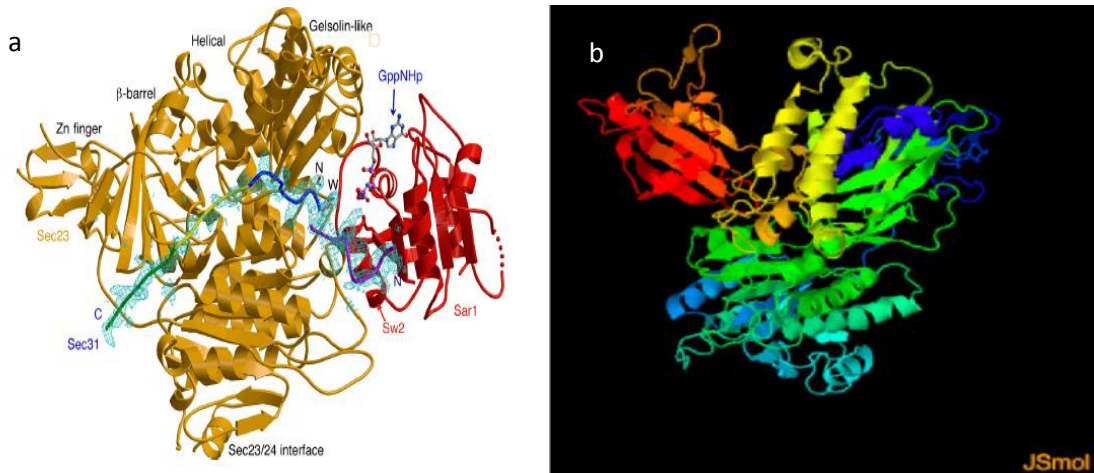
MQSPTQPAASASNGGAAVAAPGVVPCDHVLTIVAGCVVNQRAFANTCGVPLG
AHMDFVPSAALRLPQITGRTPPRCNGCSGFMNVYCKTNLTKWVWKCNCGAV
NVHKDQLGHSADVASYAELCGEAVEYVQPLRNGAAGPAHTPQAVPPHVFAV
DTTLEPSDLRAVKEAVLASAASLPPATLISLITFDGAVLHNLGPEHRASYTLPA
AFAAQVPGAGGVAAAPSGGGVVPGAEHSTDQQAVIQQLLDKFCSTRAGSGV
GPGGSGLLVAPAGEVAALLPKVLATLRTVQGDVPVVRARCLCAA VEASRL
VAAAHLDDLGRHHHLAASRVVMAAGPATRPGAVPLNLLDQAVGEKGR
SPDNKAVAAALDLGVALGAMAAGKIGVAVDIFTSTCIGINAPLLTAIAHTSGGEL
MPQVLPPhHLPTQHAAHNPSHGASHSHSSHGGHGHGHGHSHPTGVSAAPVG
ATAGGFVPGLLSRQLRAALGRRWGVVEGRLD CYCSEGLKLTQWMGPLDPIRS
LEDMAGTPAVAVPTAGGAAEQLPRPGTARDPGAGVGGAPWRLSSAACGITAL
EVGRGASLRLEVTRDLVPSLLLQVALHYTDLEAQQRVVRVVTRKIQVVESRS
EFLRTVNPTAAALLGKRAVLDAKKAGAFRDSRKAEEARLAVGAQLSLVAAR
CGREVMTSRGLLGFGGRKLWQWPELMPPLAYALYHFTRGLLIGAPAPPPGTH
PASAHALHALWDCDTRLVGINTLLWSAWGDAYRAMAPKLYAVLPAAPPPPA
TPFPDAAAAPLPLPPPQLAALPCVSLAAVMARTVPLVLDAGTAVLVSPTTEPAP
GGSTAPGAATGAAAGLTPELIEAALQAAGAAATEGGAASSSGLSPSPGRFPMPSV
VLTPGAQAGGGQLAARLIPVHRDPYDEQALQQPQLQQLGQAVAAQLSKQLE
SSKQATVAAVAALAAAGLPPVQAKQAAAAAASFAEWCRGVNVQPPFVQ

```

ŞEKİL 4.1.1. CrSEC23B protein dizilimi, Phytozome veri tabanında alınmıştır

4.2. CrSEC23B Proteinin 3D Yapı Konformasyonu

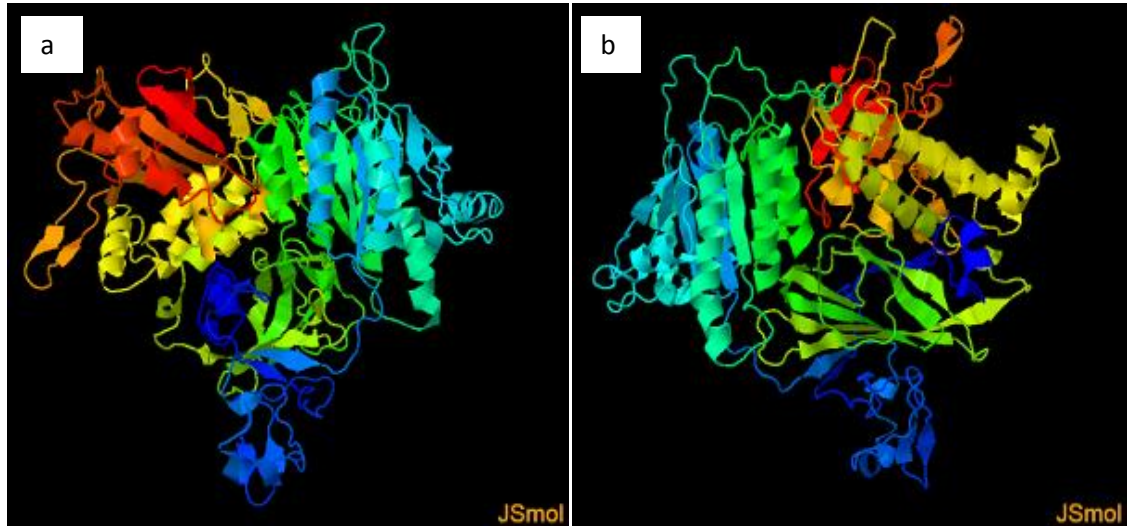
Analizler için, PHYRE 2 programı ve PDB veri tabanı kullanılmıştır. PHYRE 2'de maya organizması model olarak kullanılmıştır. Ayrıca PDB veri tabanından proteinlerin 3D yapısı incelenmiştir.



ŞEKİL 4.2.1. ScSEC23 ve CrSEC23B 3D konformasyon karşılaştırması;

a) Maya organizmasına ait ScSEC23B proteininin üç boyutlu yapısı, model olarak kullanılmıştır. SEC23 turuncu ve SAR1 kırmızı renktedir. Sar1 ile etkileşime giren N-terminal elemanı mor renktedir. SEC23 ile etkileşime giren iki eleman mavi ve yeşil renktedir. Mavi kontür çizgileri, SEC31 aktif fragmanının eklenmesinden önce hesaplanan fark elektron yoğunluğunu göstermektedir (Bi vd. 2007). b) *C. reinhardtii* organizmasındaki CrSEC23B proteininin 3D konformasyonunun maya proteini ile benzerliği gösterilmiştir

COPII vezikülleri küçük GTPaz Sar1, iç kaplama kompleksi Sec23/Sec24 ve dış kaplama kompleksi Sec13/Sec31 içerir. COPII kaplı veziküllerin oluşumu, guanin-nükleotit değişim faktörü (GEF), Sec12 ile Sar1'in aktivasyonu ile başlar (Barlowe ve Schekman 1993; Barlowe vd. 1993). Aktive edilmiş Sar1, kargo proteinleri ile tomurcuklanma öncesi kompleksi oluşturmak için Sec23 ve Sec24 heterodimerlerini işe alır (Matsuoka vd. 1998; Bi vd. 2002; Sato ve Nakano 2005). Sec13/Sec31 daha sonra Sec23/Sec24'e bağlanır ve bu etkileşim Sec23'ün Sar1'e yönelik GTPaz aktive edici protein (GAP) aktivitesini artırır ve kaplama düzeneğini tamamlar (Yoshihisa vd. 1993; Antony vd. 2001; Bi vd. 2007).



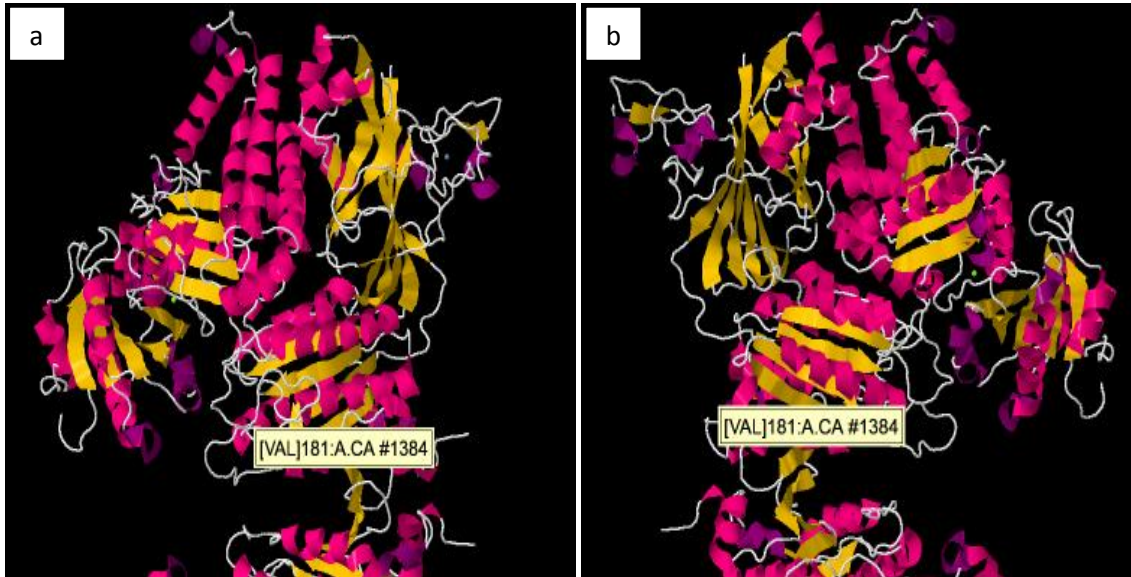
ŞEKİL 4.2.2. CrSEC23B proteininin 3D konformasyonu

a) CrSEC23B proteininin önden görünüşü. b) CrSEC23B proteininin (180°) arkadan görünüşü. JSmol görüntülerinin hepsi için **PHYRE 2** programı kullanılmıştır

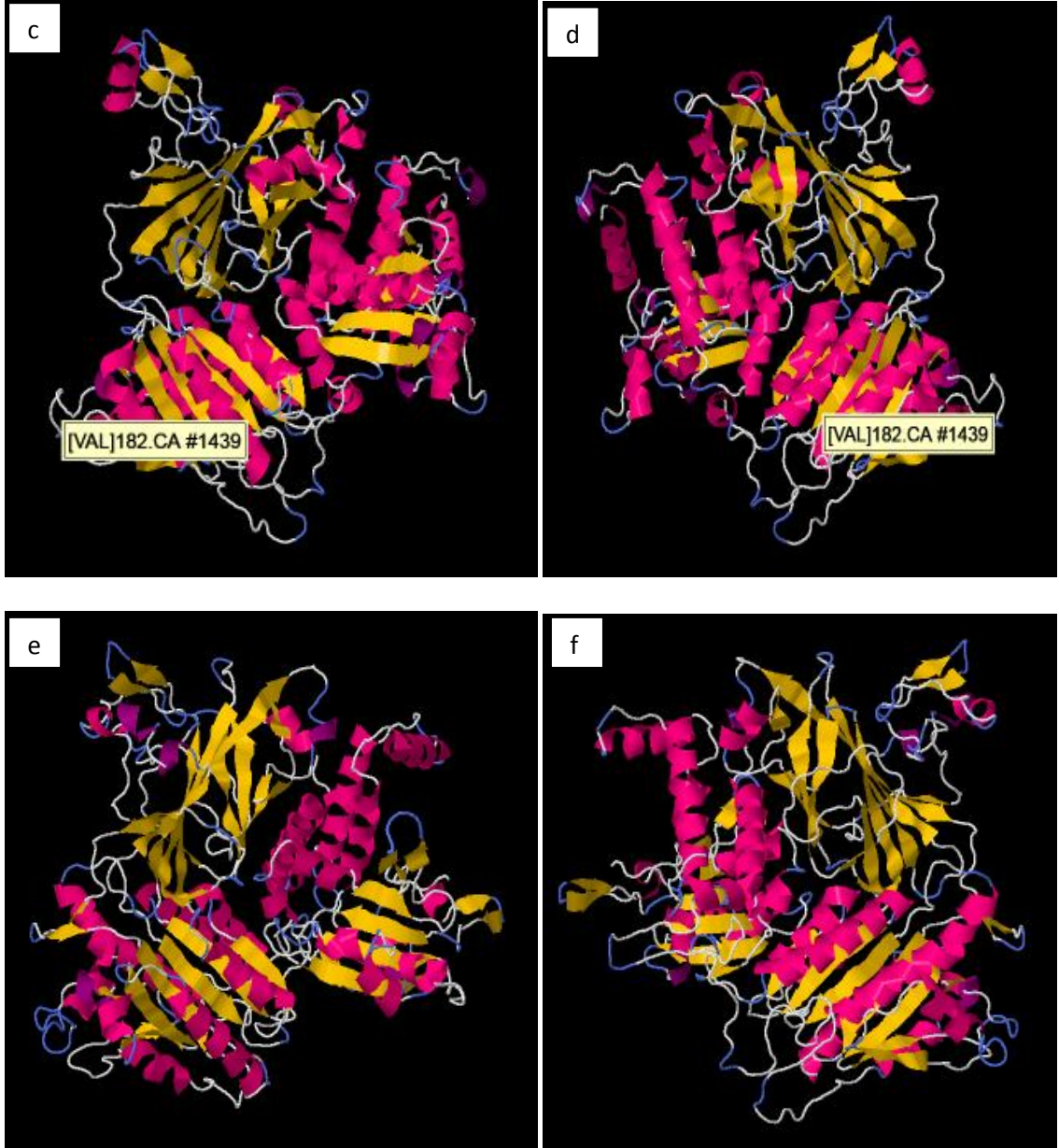


ŞEKİL 4.2.3. CrSEC23B proteininin sekonder yapısına göre renklendirilmiş hali
Pembe: α heliks, **Mor:** 3_{10} sarmal, **Sarı :** β -stran, **Mavi:** turns (dönüşler), **Beyaz:** coils yapısını göstermektedir

PHYRE 2 programı oluşturduğu 3D konformasyon yapısını, % 100 güven derecesi belirterek vermiştir ve CrSEC23B proteini, ScSEC23 proteini örnek alınarak modellenmiştir. PDB veri tabanında 1M2O numaralı ScSEC23 proteinine ait şablonda SEC24 ile bağlanmayı sağlayan VFR bölgesinde valin (181 numaralı) aminoasiti belirtilerek, önden ve arkadan fotoğrafları verilmiştir. Ayrıca benzerliklerin karşılaştırılması için CrSEC23A ve CrSEC23B proteininin de önden ve arkadan fotoğrafları verilmiştir (Şekil 5.2.4.).



Devamı Arkada

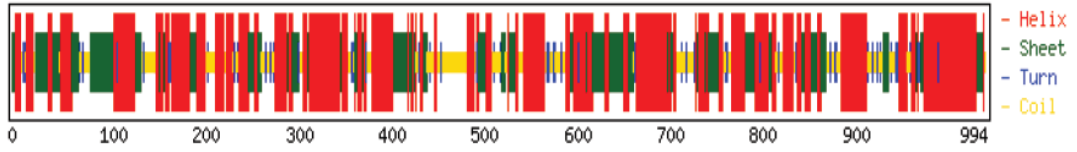


ŞEKİL 4.2.4. ScSEC23/CrSEC23A/CrSEC23B proteinlerin karşılaştırması:

a) ScSEC23 proteininin önden görünümü **b)** ScSEC23 proteininin (180°) arkadan görünümü **c)** CrSEC23A proteininin maya organizması örnek alınarak modellenmiş, önden görünümü **d)** CrSEC23A proteininin (180°) arkadan görünümü **e)** CrSEC23B proteininin maya organizması örnek alınarak modellenmiş, önden görünümü **f)** CrSEC23B proteininin (180°) arkadan görünümü

4.3. SEC23B Proteininin Sekonder Yapısı

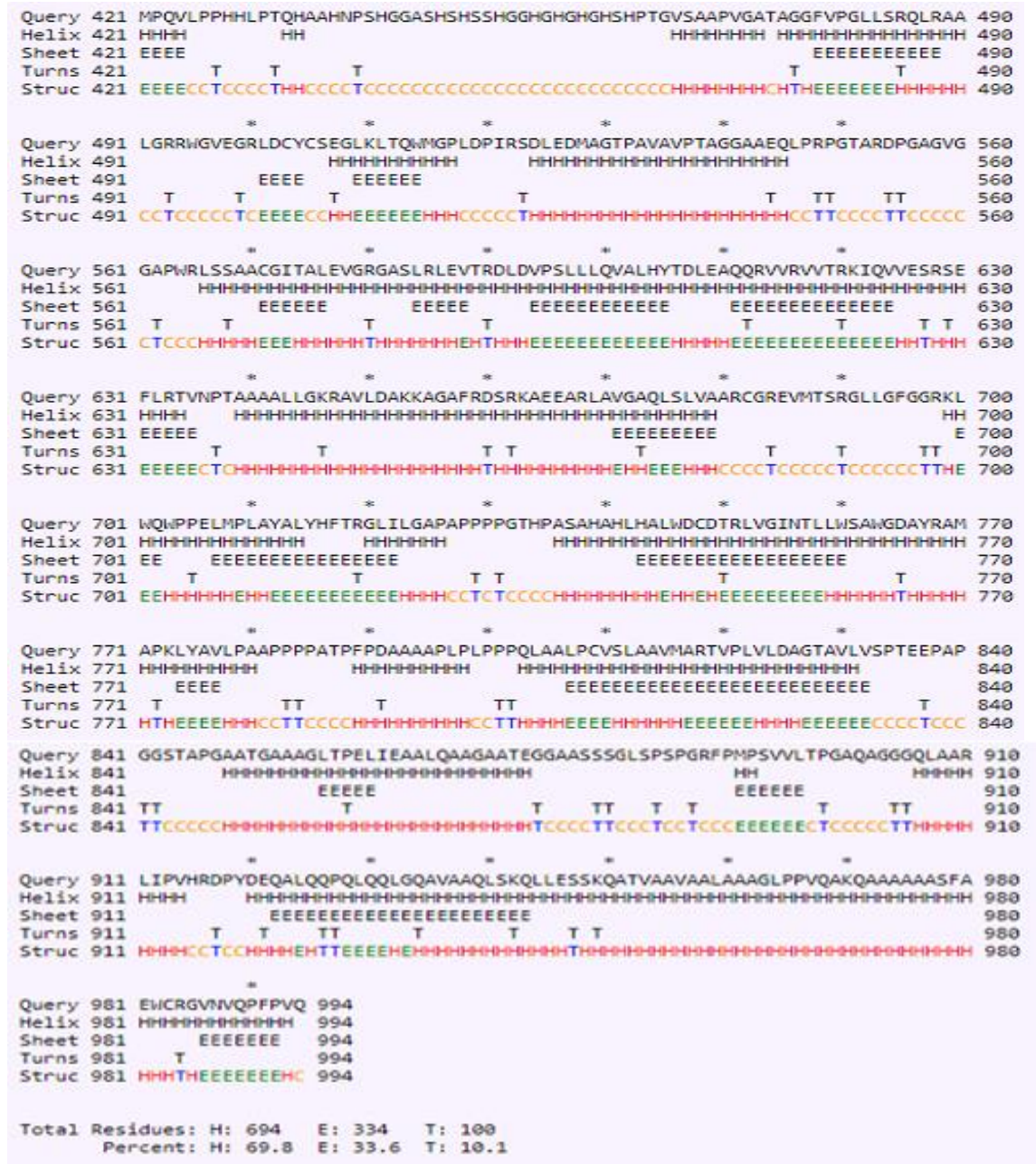
a



b

Query 1	MQSPTQPAASASNGGAAVAAPGVVPCDHVLT LVAGCVVNR AFANTCGVPLGAHMD FVPSAALRLPQITG	70
Helix 1	HHHHH HHHHHH HHHHHHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHH	70
Sheet 1	EEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	70
Turns 1	T TT TT	70
Struc 1	EETEHHHHHCCTTCHHHHHHCEEEEEEEEEEEHHHEEEEEEECHHHHHHHHHHEEEEEET	70
Query 71	RTPPRCNGCSGFMMVYCKNTLTKMVKCNLCGAVMVHKDQLGHSADVASYAELCGEAVEYVQPLRNGAAG	140
Helix 71	HHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	140
Sheet 71	EE	140
Turns 71	T T T T T	140
Struc 71	CCCTCCCCCEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEHHHTHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEECCTCCCC	140
Query 141	PAHTPQAVPPHVFAVDTTLEPSOLRAVKEAVLASAASLPPATLISLITFDGAVALHNLGPEHRASYTLP	210
Helix 141	HHH	210
Sheet 141	EEEEEEEE EEEEEEE	210
Turns 141	T TT T T T	210
Struc 141	CCCCCCHHHEEHHEEHHTTHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEEHHHHHHHHCCTCCCCCHH	210
Query 211	AAFAAQVPGAGGVAAAPSGGGVPGAHS TDQQAVIQQLLDKFC SRTAGSGVGP GSGLLVAPAGEVAA	280
Helix 211	HHHHHH HHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	280
Sheet 211	EE	280
Turns 211	T T T T T	280
Struc 211	HHHHHHCCCHHHHCCTCTCHHHHHHHHEEEEEHHHEEECCCCCTCCCTCCTCHHHHHHHHH	280
Query 281	LLPKVLATLRTVQGDVPRVVRARCLCAAVEASLRLVAAAHLDDLGRHHHLAASRVV LMAAGPATRGP	350
Helix 281	HHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	350
Sheet 281	EE	350
Turns 281	T T T T T	350
Struc 281	HEEHHEEEEEETCCCCHHHEEHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEHHHHHHCCCTTC	350
Query 351	AVPLNLLDQAVGKGRSPDNKAVAAALDLGVALGAMAAKIGVAVDIFTSTCIGINAPLLTAIAHTSGGEL	420
Helix 351	HHHHHHHHHH HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH	420
Sheet 351	EEEEEEEE EEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEEE	420
Turns 351	T T T T T	420
Struc 351	HEEHHHHEHHHTCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHEEEEEEEEEEHHEEHHECCCTTH	420

Devamı Arkada



ŞEKİL 4.3. *C. reinhardtii*' de bulunan SEC23B geninin protein sekonder yapısı verilmiştir. **a)** Kırmızı renk DNA'nın helix (sarmal), yeşil renk sheet, mavi renk turn (dönüş) ve sarı renk coil (halka, yumak) yapısını göstermektedir. **b)** Helix, sheet, turn, ve coil yapıları protein dizilimi üzerinde sırası ile gösterilmiştir. CFSSP programı kullanılmıştır

4.4. *C. reinhardtii*'deki SEC23B Proteinini ve Farklı Organizmalardaki Domain Yapıları

PROTEİN	DOMAİN SAYISI	DOMAİN YAPILARI	AMİNOASİT SAYISI
CrSEC23A	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	762
CrSEC23B	2*	ZF TD _{Sec23_trunk}	994
VcSEC23B	2	ZF TD _{Sec23_trunk}	1051
AtSEC23A	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	880
AtSEC23B	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	783
AtSEC23C	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	761
AtSEC23D	3	ZF TD _{Sec23_trunk} HD	745
AtSEC23E	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	765
AtSEC23F	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	772
AtSEC23G	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	794
ScSEC23A	1	TD _{Sec23_trunk}	630
ScSEC23	5	ZF TD _{Sec23_trunk} BS HD GR	768

*: *C. reinhardtii*'deki SEC23B proteinine ait domaindir; 994 aminoasite sahiptir

TABLO 4.4. *C. reinhardtii* parolog ve ortologlarının domain şekilleri; **ZF**: Zink finger domain, **TD**: Trunk domain, **BS**: Beta - Sandwich domain, **HD**: Helical domain, **GR**: Gelsolin repeat. Domain analizi için **PFAM** programı kullanılmıştır. **Katılım numaraları**; [CrSEC23A (XP_001702936.1), CrSEC23B (XP_001698301.1), VcSEC23B (XP_002957090.1), AtSEC23A (NP_567217), AtSEC23B (NP_563741), AtSEC23C (NP_179757), AtSEC23D (NP_565651), AtSEC23E (NP_189008), AtSEC23F (NP_193152), AtSEC23G (NP_568626), ScSEC23A (ONH_80463.1), ScSEC23 (NP_015507.1)] **NCBI** veritabanından alınmıştır

C. reinhardtii'de iki tane domain bulunmaktadır. Diğer organizmalar arasında domain benzerliği açısından en çok kendi familyasından olan *Volvox carteri* ile benzerlik göstermektedir.

4.5. Protein Alignment'ları (Hizalamaları)

C. reinhardtii'deki CrSEC23A'daki gibi CrSEC23B proteininde de, SAR1'a bağlanarak GTP hidrolizini sağlayan katalitik arjinin bölgesi bulunmaktadır (**Şekil 4.5.1.**) ve yıldız ile gösterilmiştir. CrSEC23A proteininde, SEC24'e bağlanmayı sağlayan ve Trunk domainde yer alan VFR bölgesi bulunmaktadır. (**Şekil 4.5.1.**) (Bi vd. 2002). CrSEC23A proteininde iki tane VFR bölgesi var gibi görülüyor olsada, hangi VFR protein diziliminin doğru olup olmadığını doğrulanması gerekmektedir. İlk önce CrSEC23B protein modelinin üç boyutlu yapısı, PHYRE 2 programına göre maya organizması örnek alınarak modellendiği için ScSEC23'ün protein dizilimine bakılmıştır

CrSEC23A	SGE-----ASVTKYSEVYADVEYALGSTFTRKLCILDSEYS	456
CrSEC23B	GPLDFIRSDLEDMAGTPAVAVP TAGGAAEQLP RFGTARDPGAGVG-GAPWRLSSAACGIT	574
	* . : . * .:* : *:*.* . : :	
CrSEC23A	VALLVEITATANREAGDAGSROQFFLQPTKYLRHTGMLRCKVYTVTRRMID-GTQIGEV	515
CrSEC23B	ALEV-GRGASLRLEVTRDLVPSLLLQVALHYTDLEAQQ--RVVRVTRKIQVVESRSEF	631
	. : * : . * . : : : * : . * : . : * : * . * * : . . *	
CrSEC23A	ITGFDOEAAAVLMARLATHKME TEEDF DATRWLDRALI-----RLAQRFGDYR-----	563
CrSEC23B	LRTVNPATAAALLGKRAVLDAKKGAFRDSRKAEEARLAVGAQLSLVAARC GREVMTSRG	691
	: . : * : * . * : . * . : . * : * : . : * : * * *	
CrSEC23A	---KDDPQSFNLRPELSFYPQFMFNLRRSQFVQVFGNSPDETAYYRMALFRVAVPDAMVM	620
CrSEC23B	LLGFGRKRLWQWPPPELMPPLAYALYHFT RGLILGAP-----	726
	. . : : * * * : : : * . : . .	
CrSEC23A	IQPQLTAYHFNGE SEVLLIUSSTIPEVLLIDAYFYVWVEHGTIAQHRKAEYHLOPEE	680
CrSEC23B	-----APPPPGTHPASA-HAHLHALWDCDTRLVGINILLWSAWGDAYRAMAPKL	774
	. * * * . * : . * * . * : : : * * . * : *	
CrSEC23A	YAVLPAAPPPPAT PFPDAAAFLPLPPQLAALPCVSLAAVMARTVPLVLDAGTAVLVSP	692
CrSEC23B	* . . * *	834
CrSEC23A	-----EAKIVRITFPVPIK	707
CrSEC23B	TEEPAPGGSTAPGAATGAAAGLTPELIEAALQAAGAAATEGGAASSSGLSPSPGRFFMPSPV	894
	. . . * : * : *	
CrSEC23A	VCDHNSQC-----ARFLVVKLNFSSTYTSATFMS-----AEVINTDD-----	745
CrSEC23B	VLIPGAQAGGGQLAARLIPVHRDPYDEQALQQPQLQQLGQAVAAQLSKQLLESSKQATVA	954
	* : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
CrSEC23A	-----VSLATFTEHLKRLAVQS*-----	762
CrSEC23B	AVAALAAAGLPPVQAKQAAAAAASFAEWCRGVNVQPFVQ*	994
	. : * : * : * : * : *	

ŞEKİL 4.5.1. Yeşil renk: Zink finger, kırmızı renk: Trunk domain, lacivert: Beta-sandwich domain, sarı renk: Helical domain, mor renk: Gelsolin repeat. İlk açık mavi renk (VFR): CrSEC24 ile bağlanma bölgesi. Katalitik arjinin bölgesi sarı yıldız ile gösterilmiştir

CrSEC23B

SEC23 / SEC24 Zinc finger (73/105)

SEC23 / SEC24 Trunk domain (149/420)

CrSEC23A

SEC23 / SEC24 Zinc finger (53/91)

SEC23 / SEC24 Trunk domain (120/389)

SEC23 / SEC24 Beta - Sandwich domain (402/506)

SEC23 / SEC24 Helical domain (520/617)

SEC23 / SEC24 Gelsolin repeat (634/720)

4.5.2. CrSEC23B / ScSEC23 alignment

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

CrSEC23B      MQSFTQPAASASNGGAAVAAPGVVPCDHVLTLVAGCVVNQRAFANTCGVPLGAHMDVFPS 60
ScSEC23       MDFETNE-----DINGV-----RFIWNVFPSTRSDANSNVVVGCL--YTPL 40
*: *:                **                . . . . *: **: **:*. :.*

CrSEC23B      AALRLPQITGRTFRCH--GCSGFMVYCRINLTKWVWPCNLGGMVIVHKDQLGHSADVA 118
ScSEC23       KEYDELNVAPYNFVCSGGERCKSILNPKCVIDPPNSSWSCPICNSRNHLEPCINLSQEN 100
::: .* *. *..:** ** : : *. * :.: * * : ::

CrSEC23B      SYAELCGEAVEYVQPLRNGAAGPAHTPQAVFPPVWVFAVDTTLEPSDLRAVKLEAVLASAA 178
ScSEC23       MPLELQSTITIEYI-----TNKPVTFFPIFFVVDLTSSETENLDLKESEIITSLSE 150
** . :***:                :.* :*** ..*.* * * .** :*:***: :

CrSEC23B      LPPATLISLITFDGAVALHNLGPEHRAASYTLDA-----AFAAQPVFGAGGVAA 226
ScSEC23       LPPNALIGLITYGNVVQLRHLSSETIDPCNVFRSDREYQLEALTIMLTGQVPTGPGGAAS 210
*** :*.***:..* **.* * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

CrSEC23B      APSGGGVVFGAESHSTGQAVIQQLDKFCSTFAGSGVGPGGSGLLVAFASVVAALLPKVI 286
ScSEC23       R-----LPRAMGC-----VTPFSLN-----RFFLPLEQVEFHLNQLL 242
:*. * :. * * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :

CrSEC23B      ATLRTVQGVY----FVRVRAKCLCAAVEASLRIVAAAHLDDLGRHHHLAASHVYVLMR 341
ScSEC23       ENLSPDQMSVFAGRPLRATGSALN-----IASLLLOGCVKNIPTIILFA 288
.* * .* * :.*. . .* * * * * : : : : : : : : : : : : : : : : :

CrSEC23B      NSPATRPGAVPINLLDQAVGKGRSPDNK--AVAAA LDLGVALGAMAARKI GVAVDIFTS 399
ScSEC23       SGPQTVAAGLIVNSELNDPLRSHEDIDSDERQHYKKACHFYNQIAQRVAANGHTVDIFAG 348
:*. * .* * : . * : : : : : : : : : * : : . * * :*****.

CrSEC23B      TCIGINAPLITAIARTSGEEMPVQLP FHHLPTQMAAHNP SHGGASH SHSS HGGHGHGHG 459
ScSEC23       CYDQIGSENKQLTDSGGVLLITDAFSTAFRQSYLHL----- 387
* . :. : : : : ** * : : . * :

CrSEC23B      HSHPTGVSAAPVGTAGGFVPGLLSRQLRAALGRRWGVEGRLD CYCSEGLKLTQWMPGLD 519
ScSEC23       ----- 422
.. * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

Devamı Arkada

4.5.3. CrSEC23B / VcSEC23B alignment

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CrSEC23B      MQSP-----TQPR-----ASASNGGAAVAAPGVVPCDHVLTILVAGCV      37
VcSEC23B      MTSFSGTGSFSGSSEAPQVSRQOPQSQOQKEHPQMVS SPVQPSLTVAPADHVLTILVSSCV      60
* **                **                .. . : *.,*****:..**

CrSEC23B      VNQRAFANTCGVPLGAHMDFVPSAALRLPQITG-RT-PPNSGCGFPMNVYVQSTNLIENIV      96
VcSEC23B      VNQRGFANTCGVPLGAHMDFQPPAVLGLPRIGPNRF-LSNSGCGFPMNVYVQSTNLEKGVV      120
****_*****_***** * *,* **;* * * *****_*,***** * **

CrSEC23B      [redacted]VHKDQLGHSADVA SYAELCGEAVEYVQPLRNGAAG-----PAH      143
VcSEC23B      [redacted]IHKDRMGATEVSAFPEL CSEAVEYVAPLPLSHPISLPSSPSPSPSPPNP      180
****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*: *.:*:*:*: * **_***** ** . *

CrSEC23B      TPQAV [redacted]PPEYVFAVDITLEPSELFAVKEAVLAS--AASIFPATLIELITFDGAVALENIGH      201
VcSEC23B      NQTRF [redacted]APELVFAVDISLEERDLQAVFEALDNLRNPSLDPITLVSELVTFEGCVAVNHLG      240
. * :*:*:*:*:*: * * :*:*:*: * . * * :*:*:*:*:*: * :*:*:*:

CrSEC23B      [redacted]EHRASYTLFAATAAQPVFGGGVAAAE SGGGVVFGAE HSTLQQAVIQQLLDFCSHTAG      261
VcSEC23B      [redacted]QRCSE-VLPR-----SAGGAVP---LSLDTQSAVQQLLDRQVATAAE      279
:: : .***                *.,*.* * * * * :.:*****:.* **

CrSEC23B      [redacted]EVC-----FGGSELLVAPAGEVAALLPKVLATLRTVQGDVYVYVRAKLCAAVEAS      312
VcSEC23B      [redacted]RAGAGATAAAAVAGGVVVEAGFCA SLLPQVLSGLRTVDSVYVYVRAAKCFCTAVEAS      339
.*                .*,*:*: * * * : * * * : *****_*****_*****:

CrSEC23B      [redacted]LRLVAAARLDLLEGRHHLAA SRVVLNAGFATRGP GAVFENLLDQAVSEKRSPPDNKI      372
VcSEC23B      [redacted]LRLTAA--KAGLDITRHHLYGSKVIVLAGGFPTAGP GAVFELLDQAVSEKRSQAEIK      397
****:* * ,*** *:*: * .*:*:*:*: * * *****:*****_*****_***** :*:

CrSEC23B      [redacted]VAAALDVGALGAMAARTGVAVDITFTSTCIGTNAPLLTAIARTSGH [redacted]MPQVLPFPHLPT      432
VcSEC23B      [redacted]VAAALDVGALGDMAAKIGVAVDITFTSVFTGINKALLTAISECGG [redacted]E FMPQNTHT--LPH      455
:*****:.* ** *****_*****_***** * * * * * : * : * : * * *

CrSEC23B      QHAAH--NPSHGGASHSHSHGGHGHGHSHFTGVSAAPVGTAGGFVPGLLSRQLRAA      490
VcSEC23B      VHPQPHQTPSTPSPITL--PQQQQQ--QQQLASAAA SAGGWGGGGFNGWLLARQLWAS      512
* .** . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
    
```

Devamı Arkada

CrSEC23A / VcSEC23B

CrSEC23B	LGRRWVVEGRLDICYCSEGLKLTQWMPFLDPIRSDLEDMAGTPAVAVPTAGGARE-----	544
VcSEC23B	LTRRFVVEGRLDICYCSEGLRLVQWLGLDITIQVELES GSGGGDGGAPGGGGGGGGGTGP	572
	* **;*****;*,**;*** * : ** . : * . . * . * . *	
CrSEC23B	-----QLP-----RPGTARDPGAGVGGAPWRLSSAACG	572
VcSEC23B	HQQQQQSIPTAAALQPPSPSPPESTPMATASAAAAGGGGGGGGGGGGGP YRLSS SACG	632
	* * * : . * . * . * . * . * . * . *	
CrSEC23B	ITALEVGRGASLRLEVTRDL-DVPSLLLQVALHYTDLEAQQRVVRVVRTRKI QVVESRSEF	631
VcSEC23B	VMALGRCASLRLEVTRDLTEVPSSL LQVALHFVDPVARCRVVRVVRTRRI AVVESRVEF	692
	: **,* * ***** :*****;,* * : *****;* ***** **	
CrSEC23B	LRTVNPATAAALLGKRAVLDAKKGAFRDSRKAEEARLAVGAQLSLVAARC GREVMTSRG	691
VcSEC23B	LRGVNPTAAALLGKRAALDAKKGAFRDARKAEEARYLLAAQLALVATRCGQEQQASRG	752
	** * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CrSEC23B	LLGFGGRKLNQWPELMPALYALYHFT RGLI LGAPAPPPPPTHASAHHLHALWDCDTR	751
VcSEC23B	VLGFGGRKSWQWPAELMPLAYALYHMQRGPLL GPPAPPPPFPAAHSHLHSLWDSAR	812
	:***** * * * *****: ** :** *****,* :**;***:***,* :**	
CrSEC23B	LVGINILLWSAWGDYRAMPKLYAVLPAAPP PPA TPFPDAAAAPLP LPPPQLAALPCVS	811
VcSEC23B	LANLNALLRTAWGDYRAMSPKLYVVL PSSGGGG-----GNRASAPAQTPQLVALPCVS	867
	* . . : ** : *****;***,* : * . * * * * * * * * * * * * * * * * *	
CrSEC23B	LAVMARTVPLVLDAGTAVLVSPTEEPAPGGS TAPGAATGAAAGLTPELIEAALQAAGAA	871
VcSEC23B	LAVMARTAPLLLDVGTAVLVSPTEEP GHVGDADGD-GGSGGLTPALLAAAMA AVAAS	926
	*****,* :**,* ***** . * * * . . * . * . * . * . * . * . *	
CrSEC23B	TEGG-----AASSSGLSPSPGRFMP SVVLTPGAQAGGGQLAARLIPVHRDPYDEQAL	924
VcSEC23B	SSSATAAMGPQGAVAAASAAVSRFPVPSVVF TPGAQAGGGLAKRLIPVHLDSPDQCM	986
	: . . . * : . : : . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *	
CrSEC23B	QQPQLQQLGQAVAAQLSKOLLESSKQATVAAVAALAAAGLPPVQAKQAAAAAASFAEWCR	984
VcSEC23B	QHPQLQQLGLAVAAQLSKOLTEGAA-----ATAAAAAAGLPPAQAKQAAAAAASFVWCR	1041
	* :***** ***** * : * . * * * * * . * . * . * . * . * . * . *	
CrSEC23B	GVNVQPPFVQ* 994	
VcSEC23B	TVQVRPPFVQ* 1051	
	* :*****	

ŞEKİL 4.5.3. Yeşil renk: Zink finger, kırmızı renk: Trunk domain

CrSEC23B

SEC23 / SEC24 Zinc finger (73/105)

SEC23 / SEC24 Trunk domain (149/420)

VcSEC23B

SEC23 / SEC24 Zinc finger (97/129)

SEC23 / SEC24 Trunk domain (186/443)

CrSEC23B
 SEC23 / SEC24 Zinc finger (73/105)
 SEC23 / SEC24 Trunk domain (149/420)
 AtSEC23B
 SEC23 / SEC24 Zinc finger (56/94)
 SEC23 / SEC24 Trunk domain (139/410)
 SEC23 / SEC24 Beta - Sandwich domain (421/525)
 SEC23 / SEC24 Helical domain (539/635)
 SEC23 / SEC24 Gelsolin repeat (651/739)

4.6. Protein Alignment Benzerlikleri Tablosu

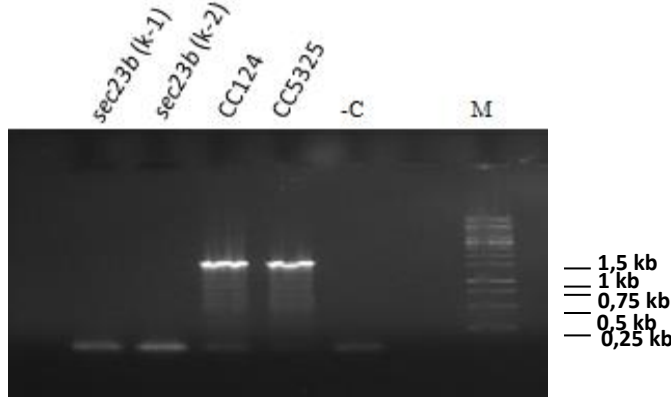
GENLER	BENZERLİK ORANLARI
CrSEC23A - CrSEC23B	%14,528
CrSEC23B - VcSEC23B	%54,312*
CrSEC23B - ScSEC23A	%9,574
CrSEC23B - ScSEC23	%16,329
CrSEC23B - AtSEC23A	%18,319
CrSEC23B - AtSEC23B	%14,815
CrSEC23B - AtSEC23C	%16,393
CrSEC23B - AtSEC23D	%14,681
CrSEC23B - AtSEC23E	%15,493
CrSEC23B - AtSEC23F	%14,394
CrSEC23B - AtSEC23G	%13,423
CrSEC23B - HsSEC23A	%16,12
CrSEC23B - HsSEC23B	%16,91
CrSEC23B - MmSEC23A	%15,927
CrSEC23B - MmSEC23B	%16,91

*: *C.reinhardtii*' ile en çok benzeyen *Volvox carteri*'dir.

TABLO 4.6. *C.reinhardtii*'nin paroloğu ve başka organizmalardan olan ortologlarının benzerlik yüzdeleri. *: *C.reinhardtii*' ile en çok benzeyen *Volvox carteri*'dir

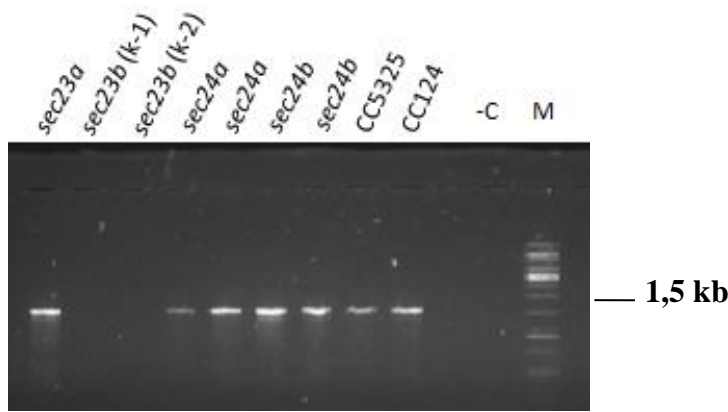
4.7. PCR Sonuçları

4.7.1. *SEC23B* primeri ve kontrol primerleri ile yapılan PCR sonuçları



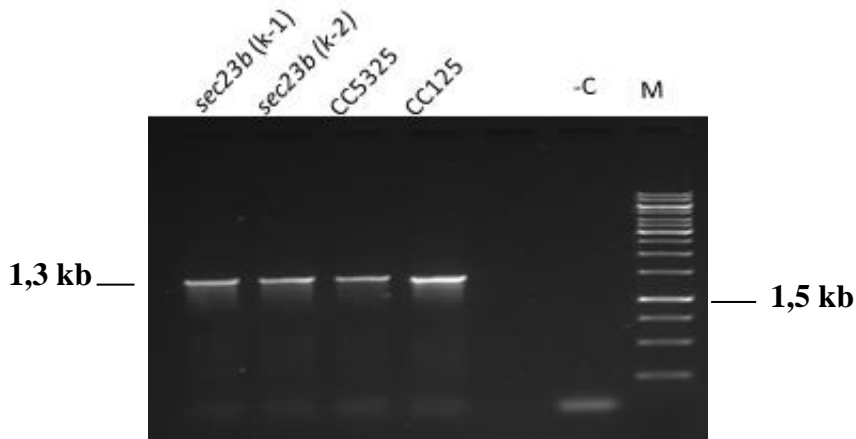
ŞEKİL 4.7.1. Tek koloni seçimi yapılan *sec23b* mutantına ait k-1 ve k-2'nin *SEC23B* primeri kullanılarak yapılan PCR sonucu

Katı TAP besi yeri ortamı 6'ya bölünmüş ve tek koloniler seçerek hücreler ekilmiştir. Bu hücreler (1,2,3,4,5,6) olmak üzere numaralandırılmıştır. Hücreler çoğaldıktan sonra numaralandırılanlardan iki tane klon seçilmiş (k-1, k-2) ve DNA izolasyonları yapılmıştır. *SEC23B*'ye ait olan primerler ile PCR'ları yapılmıştır. **Şekil 4.7.1.**'de gösterildiği üzere çalıştığımız *sec23b* mutantların bant vermemesi onların mutant olduğunu doğruladığımızı göstermektedir. Yabanıl tip olan CC124 ve ebeveyn olan CC5325'in bant vermesi gerekmektedir. *SEC23B* primerlerinin büyüklüğü 1,5 kb olarak hesaplanmıştır.



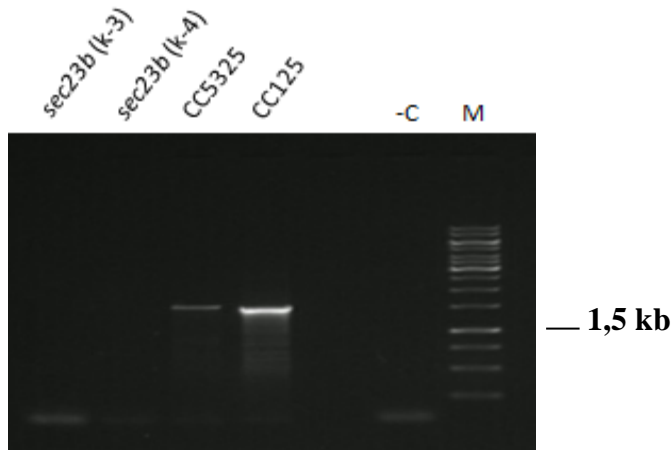
ŞEKİL 4.7.2. *sec23b* mutantına ait klonların diğer mutant, ebeveyn (CC5325) ve yabanıl tipte (CC124) olan PCR sonucu; *SEC23B* primerleri kullanılmıştır

sec23b mutantına ait olan klonlara ve yabanıl tiplere *SEC23B* primerleriyle tekrar PCR yapılmıştır. Kendi klonlarımızın dışında diğer örneklerin hepsinin bant vermesi, elimizdeki *sec23b* mutantında bir mutasyon olduğunu doğrulamaktadır. (**Şekil 4.7.2.**)



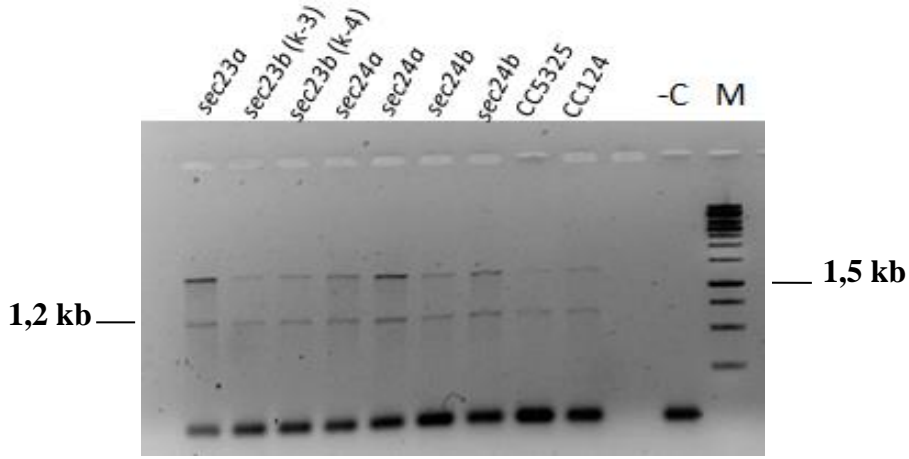
ŞEKİL 4.7.3. *SEC24A* geni için yapılan ve *sec23b* klonlarının ebeveyn (CC5325) ve yabancı tip (CC125) ile olan kontrol PCR sonucu

SEC24A primerleri kontrol PCR için kullanılmıştır. *SEC24A* primerleri yaklaşık 1,3 kb büyüklüğündedir. Bu primerler, *sec23b* klonlarında yabancı tipte ve ebeveynde bant vermiştir. *sec23b* mutantını doğrulamak için önemlidir.(Şekil 4.7.3.)



ŞEKİL 4.7.4. *sec23b* mutantından, farklı iki klon örneklerinin (k-3, k-4) PCR sonucu; *SEC23B* primerleri kullanılmıştır

sec23b mutantına ait k-1 ve k-2 klonları haricinde k-3 ve k-4 olarak yeni iki örnek daha alınmıştır. DNA izolasyonları ve PCR'ları yapılmıştır. Toplamda 4 klon da *SEC23B* primerleri ile yapılan PCR'da bant görülmemiştir; yabancı tipler bant vermiştir. Böylece ikinci tekrarlardan da olumlu sonuç alınmıştır.

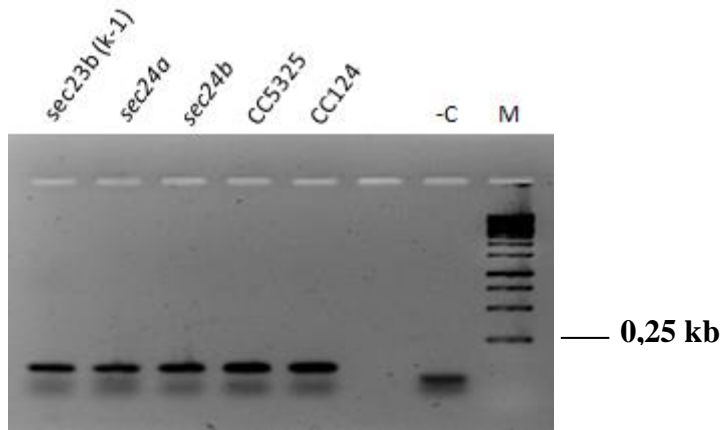


ŞEKİL 4.7.5. *sec23b* mutantına ait diğer iki klonun (k-3 ve k-4) OMJ kontrol primerleri ile PCR sonucu

sec23b mutantının klonları, diğer mutantlar ve yabancı tipler ile yapılan PCR sonucunda hepsinin bant vermesi gerekmektedir. Görüntüde tüm DNA'lar bant vermiştir. (Şekil 4.7.5.) OMJ primerleri yaklaşık 1,2 kb büyüklüğündedir.

4.8. RT-PCR Sonuçları

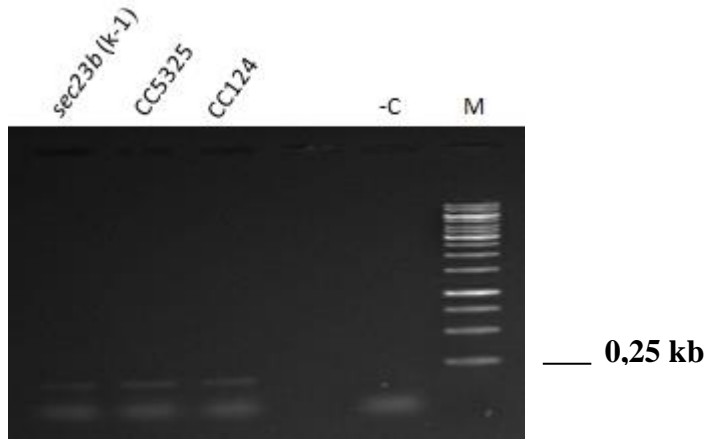
SEC23B genindeki mutasyonun, transkripsiyonu etkileyip etkilemediğini belirlemek için mutant ve yabancı tipten total RNA izolasyonu yapılmıştır ve RT-PCR yöntemi ile mRNA'nın varlığı ve miktarı tespit edilmiştir. Mutantlar, ebeveyn ve yabancı tipten CBLP kontrol primerleri ile yapılan RT-PCR'da tüm örnekler bant vermiştir. (Şekil 4.8.1.)



ŞEKİL 4.8.1. *sec23b* mutantı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tipe (CC124) ait RT-PCR sonucu (CBLP kontrol geni için). qCBLP kontrol primerleri kullanılmıştır, ürün boyutu 105 bp'dir

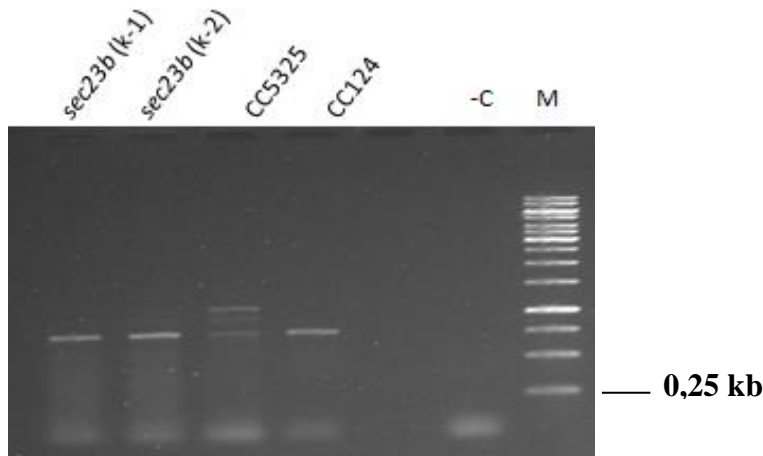
SEC23B primerleri kullanılan RT-PCR sonuçlarına göre; sadece yabancı tip ve ebeveynin bant vermesi *sec23b* mutantının bant vermemesi beklenmiştir, ama mutant

bant vermiştir (Şekil 4.8.2.). Mutantlarda mRNA üretimi yabancı tiplere oranla daha azdır.

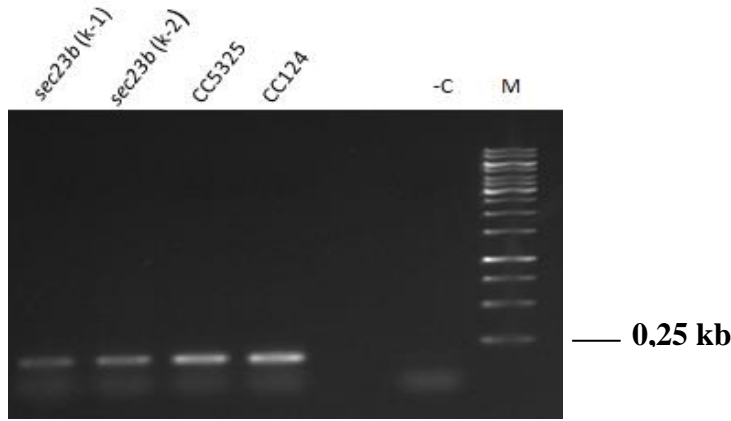


ŞEKİL 4.8.2. *sec23b* mutanlığı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tipe (CC124) ait RT-PCR sonucu; *SEC23B* primerleri kullanılmıştır. Ürünün boyutu 165 bp'dir

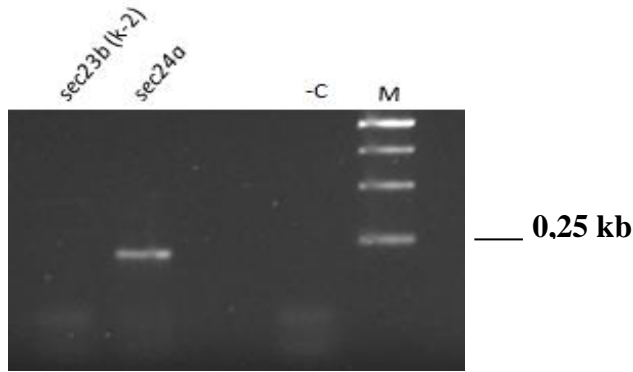
sec23b mutanlığı, ebeveyn ve yabancı tip örneklerine tekrar RT-PCR'ları yapılmıştır. Hem kontrol hem *SEC23B* primerleri ile yapılan tekrarlarında yine aynı sonuçlar gözlemlenmiştir. Tekrar RT-PCR'ında *SEC23A* primeri kontrol primeri olarak kullanılmıştır ve bütün örnekler bant vermiştir (Şekil 4.8.3). *SEC23B* primerleri ile yapılan RT-PCR'da ise k-1, k-2 haricinde diğer örneklerin bant vermesi gerekmektedir ama hepsi bant vermiştir. Sonuç olarak mutantlarda mRNA üretimi yabancı tiplere göre daha azdır (Şekil 4.8.4). mRNA miktarının az olmasından dolayı farklı bir *SEC23B* primerleri daha dizayn edilmiştir (23B-exon-11) ve bu primerlerde mRNA'ya ait bant/ürün görülmemektedir (Şekil 4.8.5). Örneklerin RNA miktarları $\sim 300 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 'ye göre hesaplanmıştır.



ŞEKİL 4.8.3. *sec23b* mutanlığı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tipe (CC124) ait RT-PCR sonucu. *SEC23A* primerleri kontrol olarak kullanılmıştır, ürünün boyutu 765 bp'dir

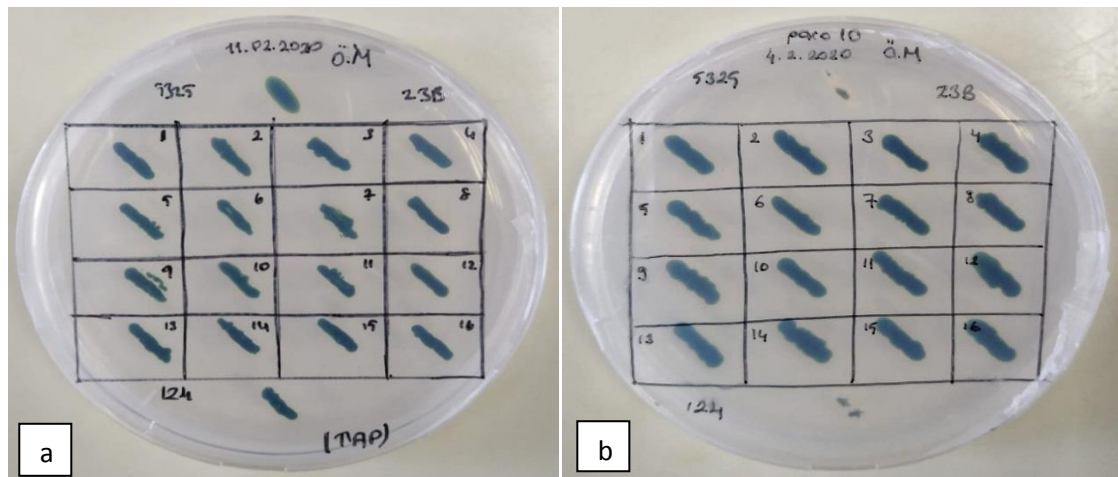


ŞEKİL 4.8.4. *sec23b* mutanlığı, ebeveyn (CC5325) ve yabancı tıpe (CC124) ait RT-PCR sonucu. SEC23B primerleri kullanılmıştır



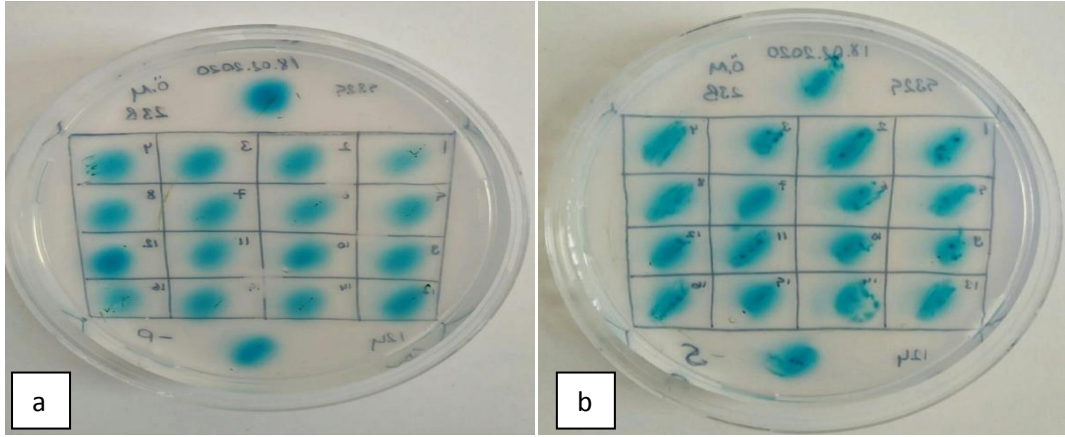
ŞEKİL 4.8.5. *sec23b* mutanlığı için, SEC23B-Exon 10 ve Exon 11 primerleri kullanılarak yapılan RT-PCR sonucu

4.9. *sec23b* Mutanlığının Enzim Aktivitesi Sonuçları

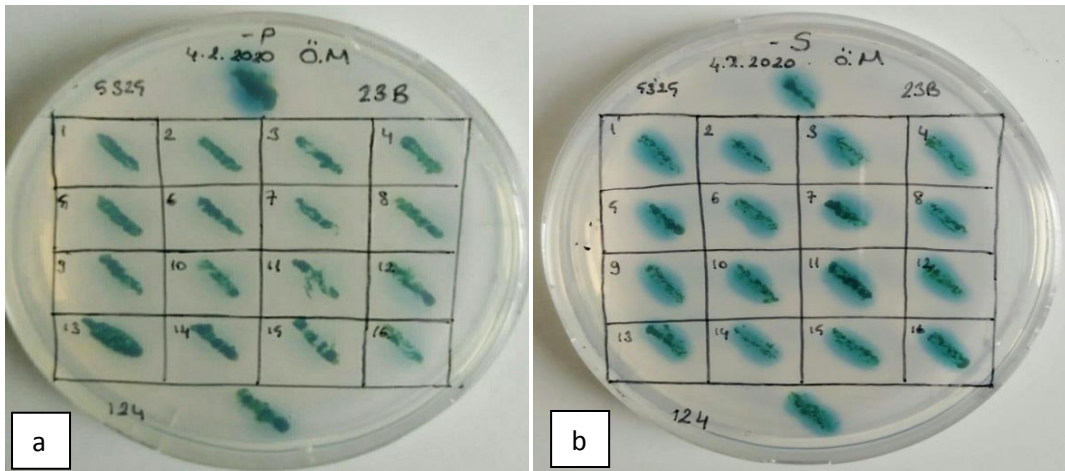


ŞEKİL 4.9.1 a) *sec23b* mutanlığının TAP besi yerinde bir hafta büyüme görünüşü. **b)** TAP besi yerinden alınan hücrelerin paromomisinli (antibiyotik) ortamda büyüme görünüşü

sec23b mutantının TAP besiyerinde sorunsuz büyümesi ve paromomisinli ortamda ise mutantların büyüüp, yabancı tiplerin büyümemesi bizim mutantlarımızda insersiyon olma ihtimalini desteklemiştir. Çünkü insersiyon kaseti içerisinde seleksiyon için paromomisine dirençli gen bulunmaktadır. Sonuç olarak insersiyon kaseti içermeyen yabancı tipler (CC5325 ve CC124) antibiyotikli ortamda yaşayamamıştır (**Şekil 4.9.1.**). Sekretuar yolla bozukluk olup olmadığını anlamak için, transformantların arilsülfataz ve alkalik fosfataz aktivitesine bakılmıştır. Sülfatsız ortamda arilsülfataz sentezi olurken, fosfatsız ortamda alkalik fosfataz sentezinin görülmesi beklenmektedir. *sec23b* mutantları TAP besiyerinden alınarak ekildiği fosfatsız ve sülfatsız ortamlarda, enzim aktivitesi testi yapılmıştır. Fosfatsız ortamda büyüyen hücreler, peçete ile temizlenerek üzerlerine fosfataz enzimi damlatılmıştır. Hepsinde fosfataz aktivitesi görülmüştür (**Şekil 4.9.2.**). Sülfatsız ortamda büyüyen hücrelere de aynı uygulama sülfataz enzimi uygulanarak yapılmıştır ve hepsinde sülfataz aktivitesi görülmüştür. Yabancı tipler (CC5325 ve CC124) ve mutantlarda da her iki aktivite görülmüştür.



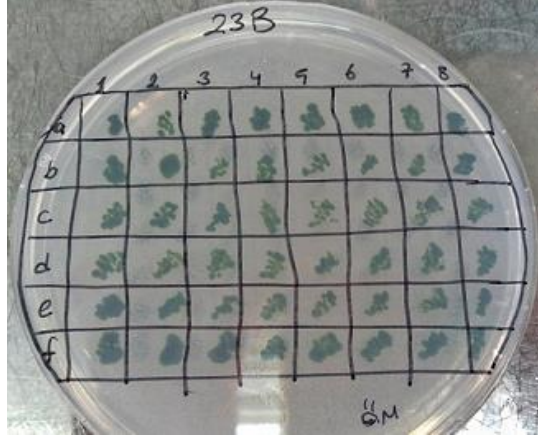
ŞEKİL 4.9.2. a) Fosfatsız ortamda, fosfataz aktivitesi sonucu, b) Sülfatsız ortamda sülfataz aktivitesi sonucu



ŞEKİL 4.9.3. a) Fosfatsız ortamda, fosfataz aktivitesi sonucu, b) Sülfatsız ortamda sülfataz aktivitesi sonucu; İkinci tekrar

Fosfataz ve sülfataz aktivitelerinin tekrar deneyi yapılmıştır. **Şekil 4.9.2.** ve **şekil 4.9.3.**'de gösterildiği üzere iki deneyde de ebeveyn olan CC5325, mutantlara göre daha çok fosfataz aktivitesi göstermiştir. Sülfataz aktivitesinde ise yabancı tipler ve diğer mutantların hepsi eşit aktivite göstermiştir.

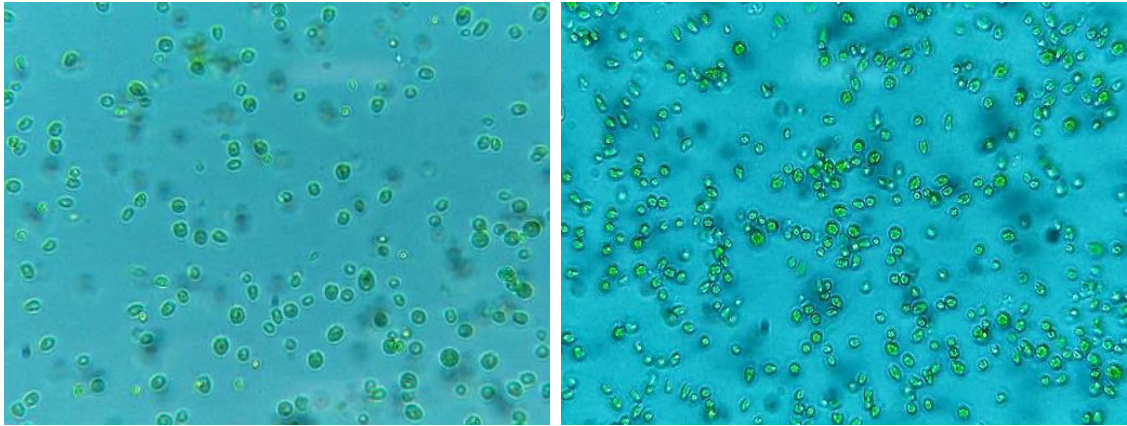
Enzim aktivitesi için yapılan tüm deneylerde, ilk dört sıra PCR görüntüleriyle doğrulanmış olan *sec23b*'ye ait k-1, k-2, k-3 ve k-4 klonlarıdır. Geriye kalan 12 klon ise; yine tek koloni seçilerek büyütülmüş 48'li tabaktan, *sec23b*'ye ait olan mutant hücreleridir. (**Şekil 4.9.4.**)



ŞEKİL 4.9.4. *sec23b* mutantlarından oluşturulan tek koloni hücreleri; 48 tane örnek oluşturulmuştur

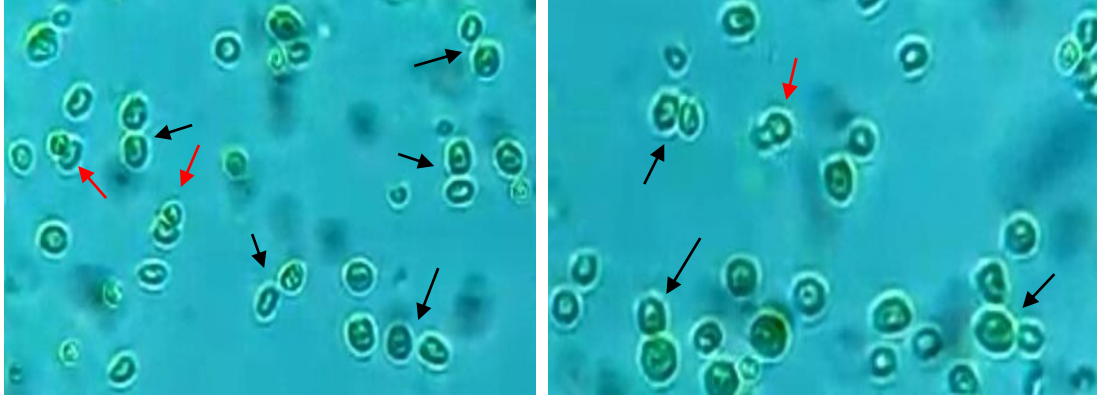
4.10. Zigot Oluşturma Sonuçları

Genetik bağlantının belirlenmesi için ilk önce zigot oluşturulmuştur. Azotsuz TAP besi yerinde hücrelerin hareketleri ve şekilleri gözlemlenmiştir. Hücrelerde, hareket ya da şekil sorunu görülmemiştir. *sec23b* mutantının hücreleri, diğer mutantlara ait hücelere göre boyut olarak daha küçüktür (**şekil 4.10.1.**). Ayrıca daha küçük gruplar oluşturmuşlardır. Aglütinasyon, füzyon veya zigot oluşturmada problem görülmemiştir.



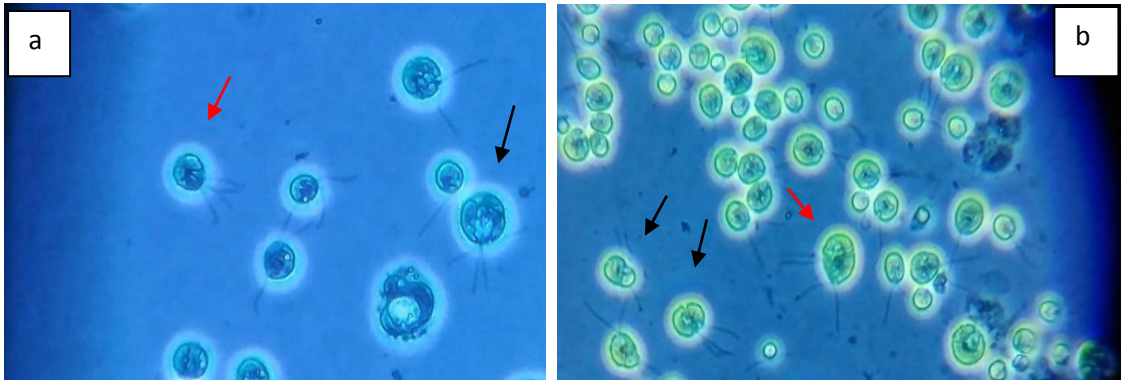
ŞEKİL 4.10.1. Çiftleşmeden önce azotsuz TAP besi yerinde bulunan, *sec23b* mutantına ait hücreler

sec23b (-) mutantının, CC125 (+) yabancı tiple çiftleştirme işlemi sonrası hücreler arasında aglütinasyon (kümeleşme), küçük gruplar halinde hemen başlamıştır. (Şekil 4.10.2.)'de siyah ve kırmızı oklarla gösterilen hücreler, aglütinasyon yapmaya ve ardından da füzyon yaparak zigot oluşturma aşamasına geçmiştir. Özellikle kırmızı oklarla belirtilen hücreler, füzyon eylemi daha net görülen hücrelerdir. Bu süreçte de herhangi bir problem gözlenmemiştir.

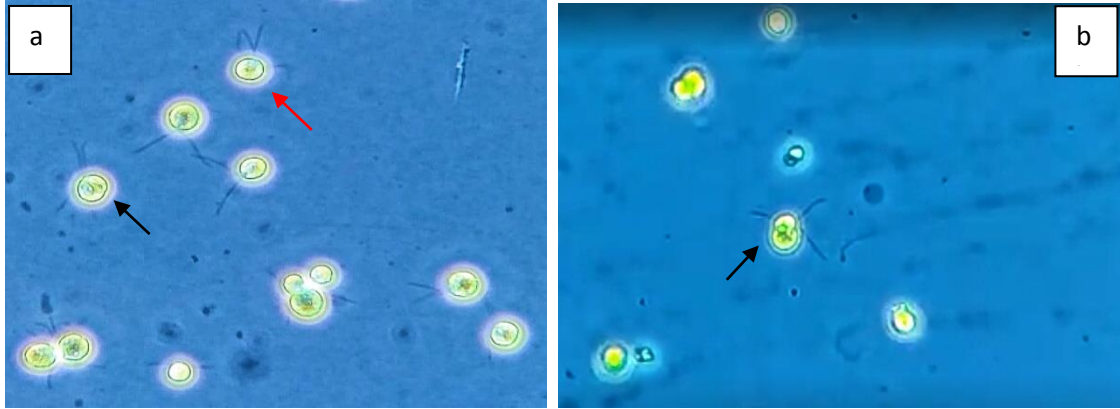


ŞEKİL 4.10.2. Oklar, aglütinasyon ve füzyon yapan *sec23b* mutantına ait hücreleri işaret etmektedir

Aglütinasyon sonrasında iki hücre füzyon yaparak, üç ya da dört flagellası olan ve diğerlerinden daha büyük görünen zigotlar oluşturmuştur. Şekil 4.10.3. ve şekil 4.10.4.'de oklar QFC (quadriflagellated cell) dörtlü kamçılı hücre'lerden bazılarını işaret etmektedir. Kırmızı oklarla gösterilen QFC'nin dört kamçısının dördü de görülmektedir. Siyah oklarla gösterilen QFC'lerde ise hücrenin aldığı pozisyonundan dolayı dört kamçıdan üçü görülmektedir. *sec23b* mutantının zigot oluşumunda da herhangi bir problem gözlenmemiştir.



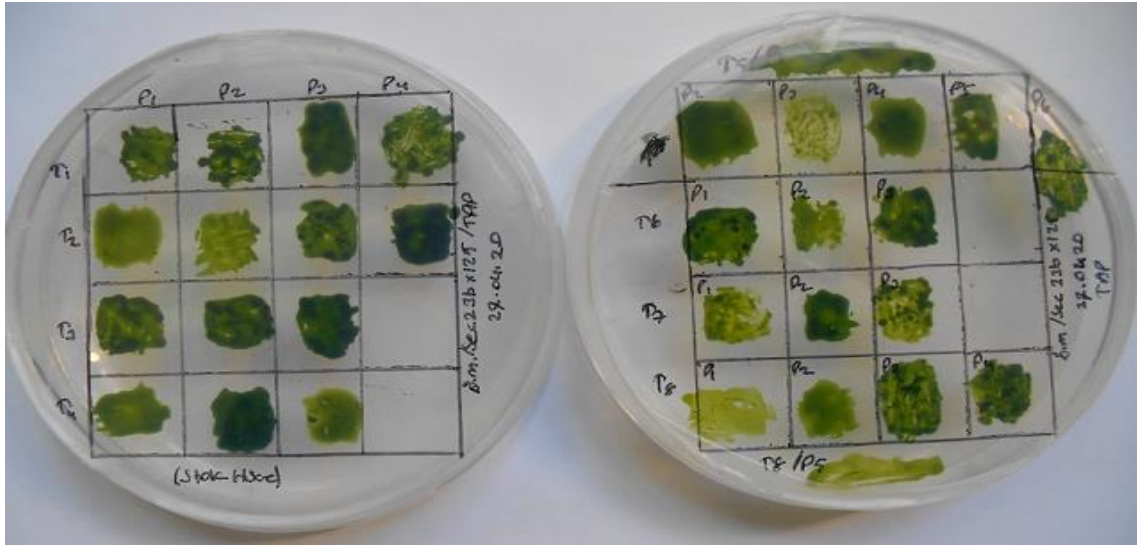
ŞEKİL 4.10.3. Oklar, a ve b) *sec23b* mutantına ait zigotları işaret etmektedir



ŞEKİL 4.10.4. Oklar; a) CC124 yabancı tüpe ait zigotları ve b) CC5325 ebeveynine ait zigotları işaret etmektedir

4.11. Projeni Testi ve İnsersiyon Belirlenmesi

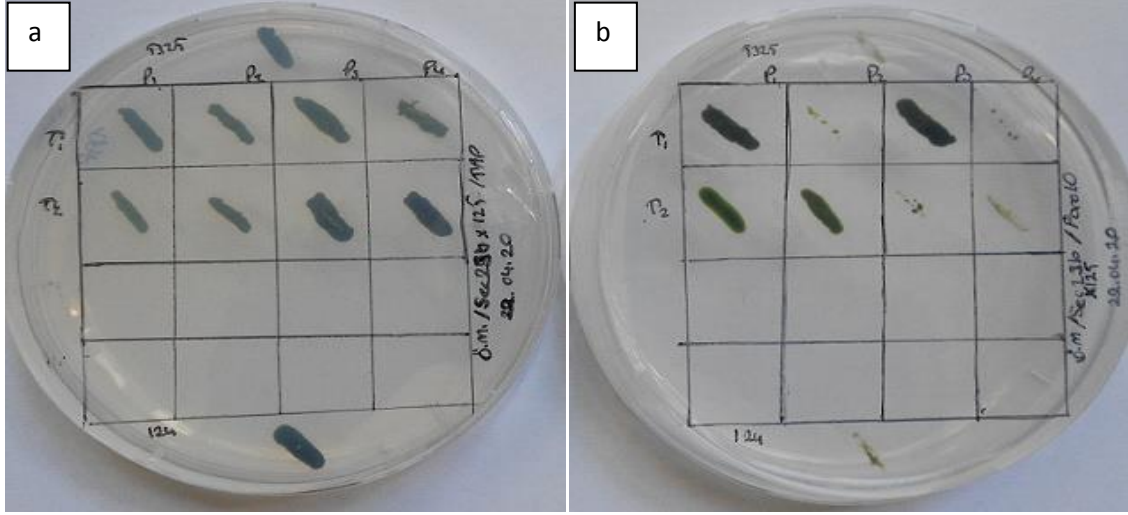
Bir hafta karanlıkta tutulan zigotlardan, birer tane alınmış, yeni tabak dörde bölünerek ekilmiştir. Zigotların mayozla gitmesi için, ışık altında tutulmuştur. Ertesi gün zigotların, mayozla gidip tetrad yapı oluşturduğu gözlemlenmiştir. Tetrads yeni tabaklara alınarak 10 gün büyümeye bırakılmışlardır. Ardından tetrads yeni TAP tabaklarına ekilmiştir.



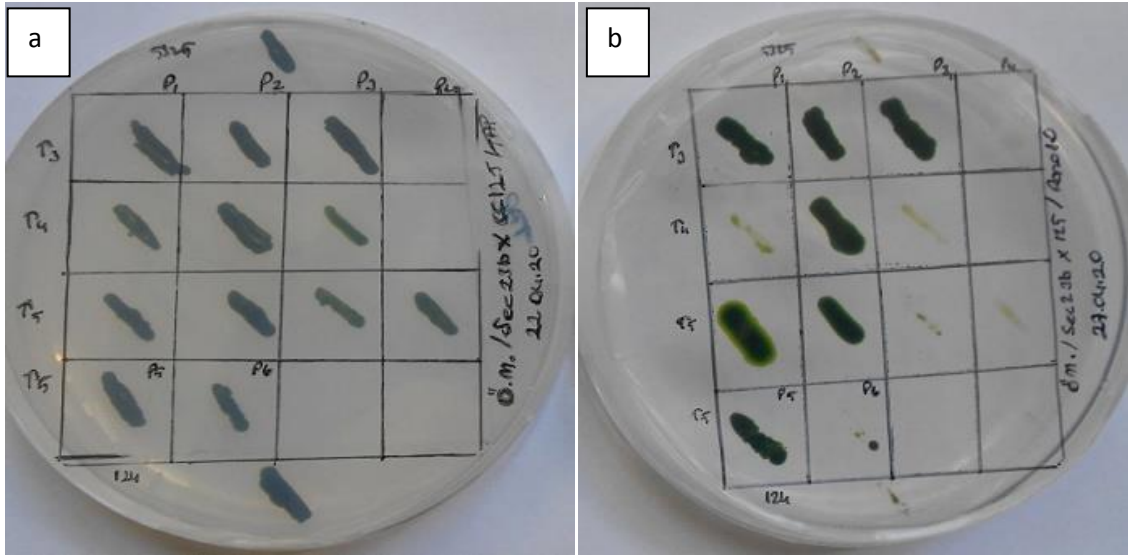
ŞEKİL 4.11.1. TAP besi yerinde büyütülmüş *sec23b*/CC125 zigotlarına ait; Tetrads (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8)

CC5325, CC124 ve *sec23b* mutantına ait tetradsın projenileri, TAP besi yerinde yeterince büyüdüktan sonra karşılaştırma yapılabilmesi için, aynı gün TAP besi yerlerine ve paromomisin antibiyotik içeren besi yerlerine ekilmiştir. Paromomisinli ortama ekilen tetradsın projenilerinde, yaklaşık % 50-50 olacak şekilde bir büyüme gerçekleşmesi istenilmektedir. Sonuçlar **şekil 4.11.2'de** gösterildiği üzere özellikle T1 ve T2'de beklenildiği gibi sonuçlanmıştır. T1'de projeni 1 (P1) ve P3 paromomisine dirençli iken P2 ve P4 ölmüştür. T2'de ise P1 ve P2 dirençli iken, P3 ve P4 ölmüştür. Ayrıca beklenildiği üzere CC5325 ve CC124 tetradsı da ölmüştür.

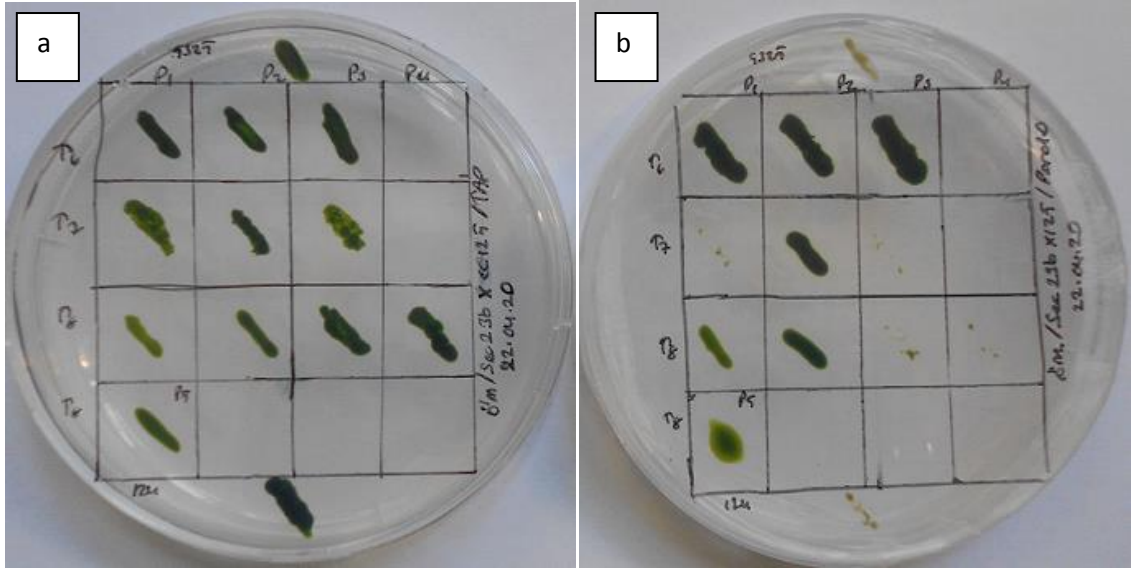
Sırasıyla Şekil 4.11.2, şekil 4.11.3 ve şekil 4.11.4' de T1'den T8'e kadar olan tüm projenilerin, paromomisinli ve TAP tabaklarındaki büyüme ve ölüm sonuçları verilmiştir.



ŞEKİL 4.11.2. a) TAP besi yerinde büyümüş T1 ve T2 projenileri b) Paromomisinli tabaklarda T1 ve T2 projenilerinin son hali



ŞEKİL 4.11.3. a) TAP besi yerinde büyümüş T3, T4 ve T5'in projenileri b) Paromomisinli tabaklarda T3, T4 ve T5 projenilerinin son hali



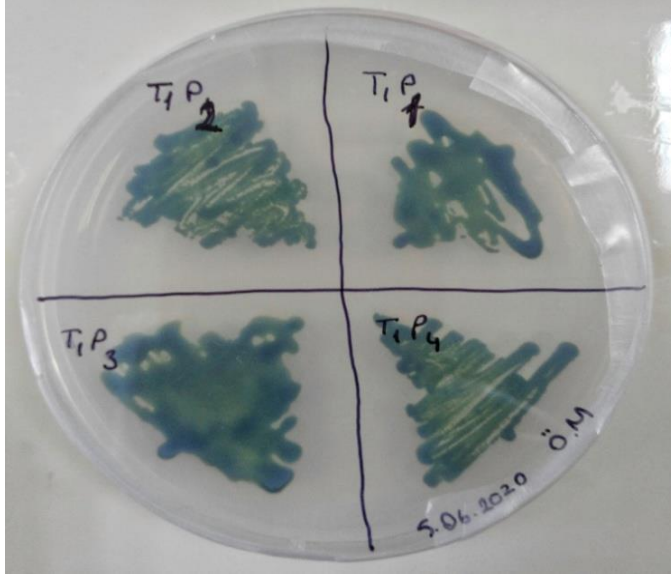
ŞEKİL 4.11.4. a) TAP besi yerinde büyümüş T6, T7 ve T8'in projenileri b) Paromomisinli tabaklarda T6, T7 ve T8 projenilerinin son hali

Seçilen tetradlar ve tüm projenilerin çiftleşme türlerinin (+/-) belirlenmesi için ikinci adım olarak her bir projeni, yabancı tipler CC124 (-) ve CC125 (+) ile çiftleştirildi. T1 ve T2 tetradlarında, tam istenildiği gibi yarı yarıya (+) veya (-) çiftleşme türleri tespit edilmiştir ve böylece birinci backcross (geri çarpazlama) elde edilmiştir. Tetradlara ait tüm bilgiler; projenilerinin çiftleşme türleri, renkleri, morfolojileri, insersiyon tespiti **Tablo 4.11.'de** verilmiştir.

T1 projenilerinde; paromomisine dirençli olan hücreler katı kıvamda ve koyu yeşildir, ayrıca biri (+) ve biri (-) olan farklı çiftleşme türlerine sahip olduğu da görülmüştür. T2 projenilerinde ise paromomisine dirençli olan hücreler T1'in aksine akışkan kıvamda ve açık renklidir, ayrıca çiftleşme türleri yine birbirinden farklıdır. Genellikle dirençli olan tetradlarda, projenilerin katı kıvamda ve koyu yeşil olması beklenmektedir. T1 projenilerinde antibiyotiğe dirençli olanlar koyu yeşil ve katı kıvamdadır ve aynı zamanda bu özellikler T1/P1 ve T1/P3 de ki projenilerde hücre duvarlarının olduğunu da göstermektedir.

T1 ve T2'nin projenilerinde gerçekleşen bu fenotipik farklılık, *sec23b* mutantında insersiyon olduğunu göstermektedir ama birden fazla insersiyon olup olmadığı hakkında henüz tam bir bilgi vermemektedir. Daha sonraki çalışmalarda, T1'in projenilerinden tekrardan geriye çarpazlama yapılarak en az üçüncü jenerasyona kadar gidilip tek bir insersiyon olup olmadığı tespit edilebilmektedir.

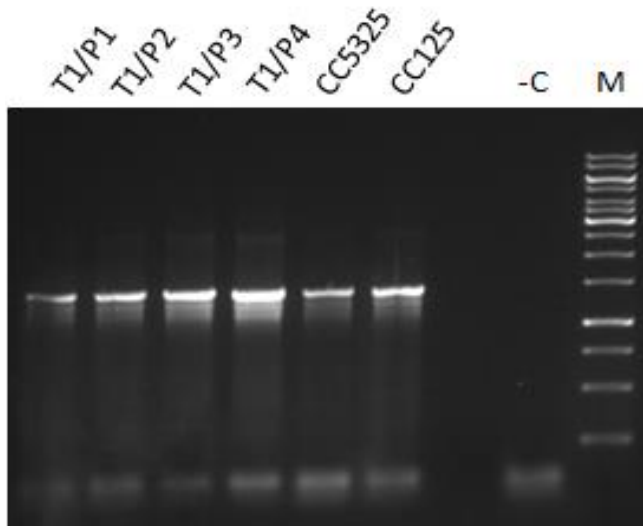
DNA izolasyonu ve PCR deneyleri, Tetrad 1'in (T1/P1, T1/P2, T1/P3, T1/P4) projenilerinden yapılmıştır. T1 projenileri ilk önce TAP besi yerinde büyütülmüşlerdir (Şekil 4.11.5).



ŞEKİL 4.11.5. T1 projenilerinin TAP besi ortamında büyümüş hali

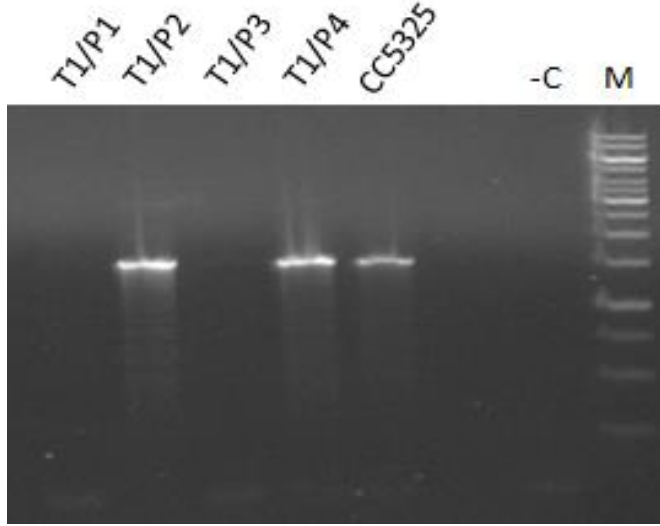
4.12. Tetradların PCR Sonuçları

T1'in tüm projenilerine ve yabancı tiplere (CC5325 ve CC125) DNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4.12.1'de gösterildiği üzere 24A primeri ile yapılan kontrol PCR'ında hem projeniler hem de yabancı tipler bant vermiştir.



ŞEKİL 4.12.1. 24A primeri ile T1 projenilerinin ve yabancı tiplerin kontrol PCR sonucu

T1'in aynı şekilde tüm projenilerine *23B* primeri ile de PCR yapılmıştır, paromomisine dirençli olan T1/P1 ve T1/P3 projenileri beklenildiği üzere bant vermiştir (**Şekil 4.12.2**). Analiz edilen bu PCR deneyleri sonucunda elimizdeki tetradlarda insersiyon olduğu tespit edilmiştir.



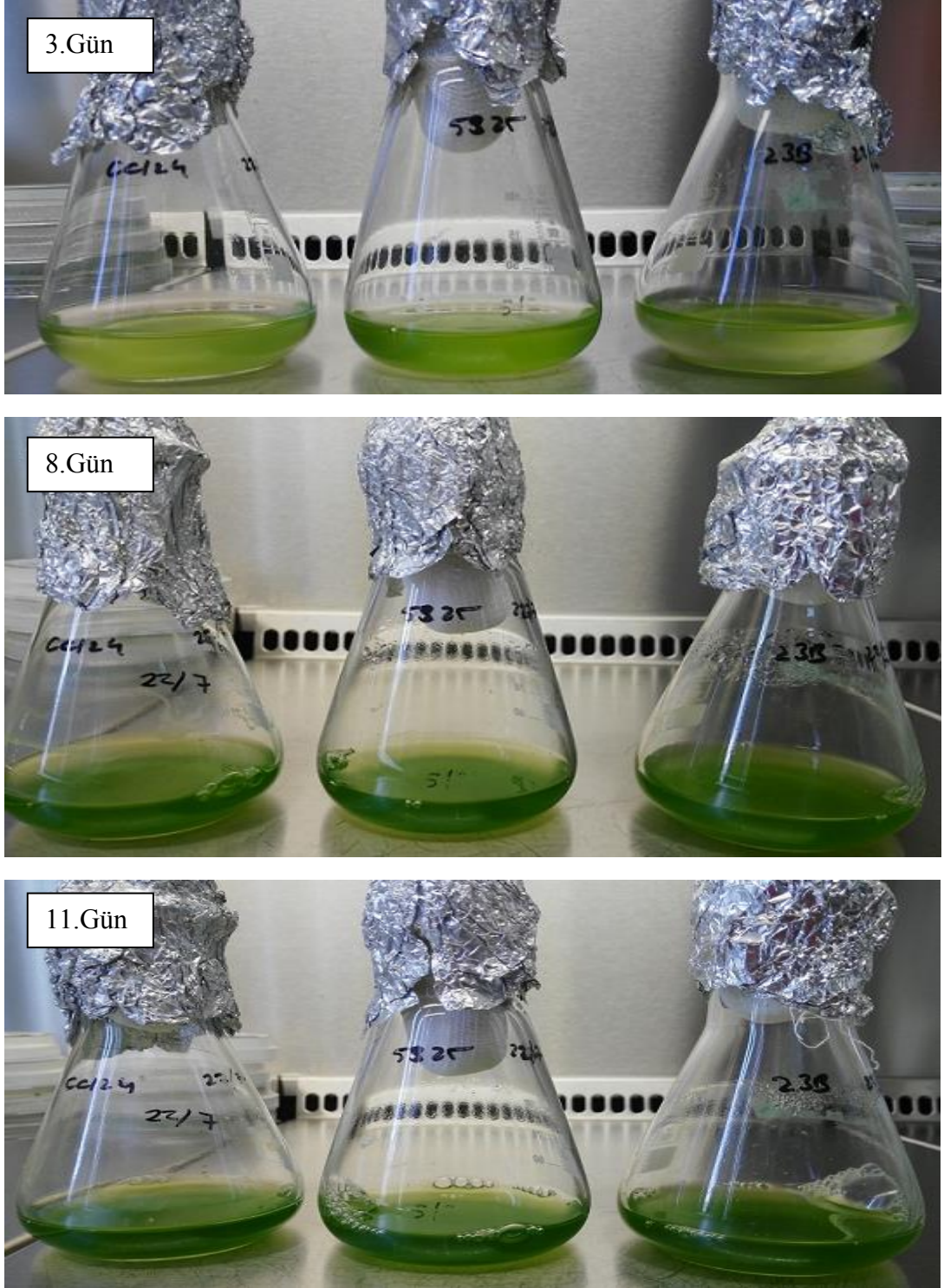
ŞEKİL 4.12.2. *23B* primeri ile T1 projenilerinin ve yabancı tiplerin PCR sonucu

TABLO 4.11. *sec23b/CC125* Tetrad Analizleri Tablosu

	Renk	Koloni Morfolojisi	Paro ^R Antibiyotik	Çiftleşme Türü(+/-)	Inersiyon Var/yok	
Tetrad 1*						
Projeni	#1	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	+	var
	#2	Açık yeşil	Akışkan	Ölü	-	yok
	#3	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	var
	#4	Açık yeşil	Akışkan	Ölü	+	yok
Tetrad 2**						
	#1	Açık yeşil	Akışkan	Dirençli	+	
	#2	Açık yeşil	Akışkan	Dirençli	-	
	#3	Koyu yeşil	Katı	Ölü	-	
	#4	Koyu yeşil	Katı	Ölü	+	
Tetrad 3						
	#1	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
	#3	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
Tetrad 4						
	#1	Koyu yeşil	Katı	Ölü	+	
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
	#3	Açık yeşil	Akışkan	Ölü	+	
Tetrad 5						
	#1	Koyu yeşil	Katı	Dirençli		
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli		
	#3	Açık yeşil	Katı	Ölü		
	#4	Açık yeşil	Akışkan	Ölü		
	#5	Koyu yeşil	Katı	Dirençli		
	#6	Koyu yeşil	Katı	Ölü		
Tetrad 6						
	#1	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
	#3	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	-	
Tetrad 7						
	#1	Açık yeşil	Katı	Ölü	+	
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli	+	
	#3	Açık yeşil	Katı	Ölü	-	
Tetrad 8						
	#1	Açık yeşil	Akışkan	Dirençli		
	#2	Koyu yeşil	Katı	Dirençli		
	#3	Koyu yeşil	Katı	Ölü		
	#4	Koyu yeşil	Katı	Ölü		
	#5	Açık yeşil	Akışkan	Dirençli		

4.13. Hücre Sayımları

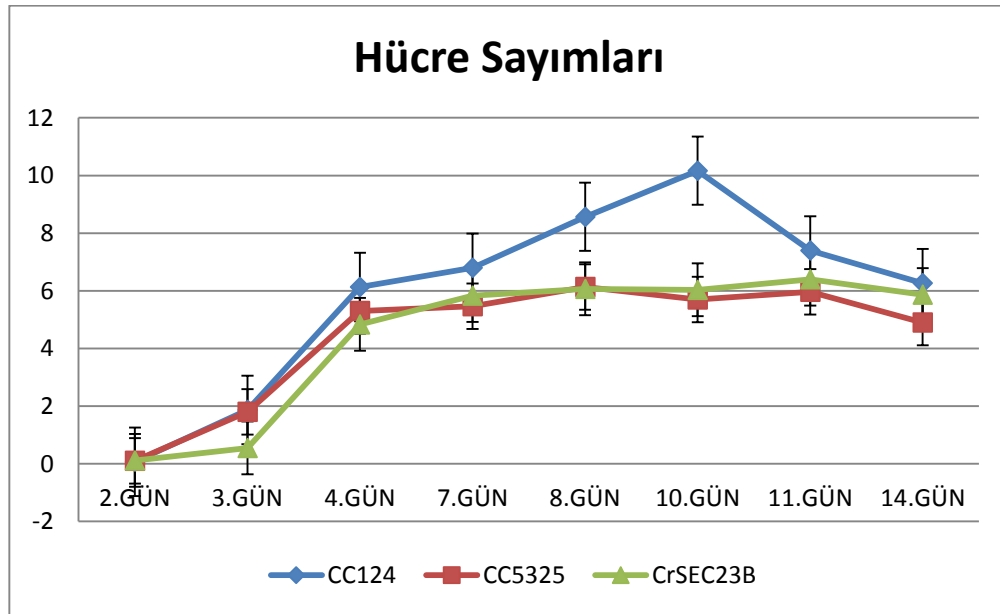
sec23b mutanlığı, CC124 ve CC5325'in hücre sayımları yapılmıştır. TAP besi yerinde üreme döngüsü kontrol edilen mutanlık ve yabancı tiplerde, hücrelerin renkleri, üreme hızları ve sayıları tayin edilmiştir.



ŞEKİL 4.13.1. Yabancı tip, ebeveyn ve *sec23b* mutanlığının sırasıyla günlere ait renkleri

Mililitreye 20.000 hücreyle başlatılan başlangıç kültürleri, standart hücre döngüsüne göre yavaş yavaş ilk önce açık yeşil tonlarında iken gün geçtikçe ve döngünün sonuna doğru hücre ölümlerinin yaşanması ile koyu yeşil bir renge dönmüştür. Her bir örnekte 3. gün daha açık renk gözlemlenirken, 11. güne doğru hücre çoğalması gerilediği ve ölümlerin başlaması sebebiyle koyu yeşil renk gözlemlenmiştir (**Şekil 4.13.1.**). 8. ve 11. gün arası hücre sayılarına göre, artık çoğalmadan ziyade daha çok durağan bir faza geçildiği için yabancı tip, ebeveyn ve *sec23b* mutanlığı arasındaki fark daha rahat gözlemlenmiştir. *sec23b* mutanlığı, yabancı tip ve ebeveynine göre biraz daha açık yeşil renktedir. Böylece *sec23b* mutanlığında bulunan insersiyonun, fenotipik yapıyı da etkileyebileceği yorumu yapılmıştır.

C. reinhardtii'de normal şartlarda yabancı tiplerde 12 milyona kadar çıkan hücreler gözlemlenmektedir, ancak *sec23b* mutanlığında, hücrelerin sadece 6 milyona kadar çıkabildiği ve daha sonra hücrelerde ölümlerin başlamasıyla sayının düştüğü gözlemlenmiştir. *sec23b* mutanlığının, hücre sayısı normal şartlardan daha az olarak gözlemlendiği için mutanlığıdaki insersiyonun hücre döngüsünü de etkilediği görülmüştür (**Şekil 4.13.2.**).



ŞEKİL 4.13.2. Yabancı tip, ebeveyn ve *sec23b* mutanlığının sırasıyla günlere ait sayım grafiği

5) SONUÇLAR

Tamamlanan bu tez çalışmasında, Chlamydomonas Kütüphane Projesi (CLiP) tarafından üretilen *C. reinhardtii*'ye ait *sec23b* insersiyonel mutantının karakterizasyonu yapılmıştır. Hücre içi trafikte görev alan, COPII veziküllerinin oluşumunda rol alması tahmin edilen *SEC23B* geni, genel olarak canlılarda ve çalıştığımız model organizma olan *C. reinhardtii*'de bulunmaktadır. *SEC23B* proteini üzerine biyoinformatik çalışmalar ve *sec23b* mutanı üzerinde deneysel veriler elde edilmiş, insersiyonun sebep olduğu sonuçlar incelenmiştir.

C. reinhardtii'deki *SEC23B* proteini için yapılan biyoinformatik çalışmalarda; gene ait proteinin üç boyutlu ve sekonder yapısı, domain yapısı, başka organizmalar ile benzerlik oranları, protein karşılaştırmaları vb. gibi sonuçlar elde edilmiştir. *SEC23B* proteininin, başka organizmalar ile farklılığının yanında, paraloğu olan *SEC23A* proteiniyle bile benzerlik oranlarının düşük ve domain yapılarının farklı olduğu gözlemlenmiştir. *SEC23A*'da *SEC24* ile bağlanma bölgesi olup *SEC23B*'nin bağlanma bölgesinin henüz tespit edildiğine dair bir çalışmanın olmaması da önemli sonuçlardan bir tanesidir. Bu karşılaştırmalar sonucu çıkan farklılıklar, başka çalışmalar için de fikir vermektedir.

Deneysel olarak; *sec23b* mutantının ilk önce DNA izolasyonu yapılmış, kendine ait 23B ve kontrol primerleri ile PCR'ları kurulmuştur. Yabancı tipler ile yapılan karşılaştırma sonucunda elimizdeki *sec23b* mutantında, ekson 13'de insersiyon olduğu doğrulanmıştır. Ardından mutantın, mRNA üretilip üretilmediği veya ne kadar ürettiğinin belirlenmesi için RNA izolasyonu ve RT-PCR'ları yapılmıştır. Kullanılan ilk primerler ile, *sec23b* mutantında yabancı tiplere oranla daha az mRNA seviyesi tespit edilmiştir, yaptığımız çalışma kantitatif değildir. Yeniden dizayn edilen ikinci primerler ile yapılan PCR'da ürün görülmemiştir. Bu sonuç *sec23b*'de mRNA'nın olmadığını önermektedir, fakat bu deneyin tekrarı gerekmektedir.

Elimizdeki *sec23b* insersiyonel mutantının oluşturulması aşamasında aktarılan gen kasetinde, fenotipik olarak seleksiyon yapılabilmesi için, paromomisin antibiyotikine dayanıklı gen aktarılmıştır. Mutant örneklerinin doğruluğunun tespiti için, antibiyotikli besi yerlerine *sec23b* klonları ekilmiştir ve mutantların hepsi yaşarken yabancı tipler ölmüştür. Bu sonuç elimizdeki mutantların doğruluğunu ve doğru örnekler üzerinde devam ettiğimizi göstermiştir.

sec23b mutantının hücre sayımları yapılmış ve yabancı tip ile karşılaştırılmıştır. Mutanta ait hücreler boyut olarak yabancı tipe göre daha küçüktür. Mutant hücrelerinin üreme hızı ve üreyebildiği son sınır yabancıllara göre daha düşüktür. *sec23b* mutantında sekresyon işlevinin olup olmadığının belirlenmesi için enzim aktivitesi testleri de yapılmış ve arilsülfataz, fosfataz aktivitesine bakılmıştır. Mutantlarda özellikle fosfataz aktivitesinin, ebeveyn suşa (CC5325) göre daha az olduğu tespit edilmiştir. Mutant fosfataz aktivitesi yabancı tip (CC124) aktivitesi ile benzer miktarda görülmüştür.

sec23b mutantının projeni testi için; ilk önce zigot oluşturabilme yetenekleri ve ardından tetrat oluşturmaları incelenmiştir. Tetratlar oluştuktan sonra projenilerin tayini için çiftleşme tipleri, fiziksel özellikleri (koloninin yapısı akışkan ya da katı olması), hücrelerin renkleri (açık ya da koyu yeşil) vb. gibi özellikler incelenmiştir. Mutantın

zigot oluşturma kabiliyetine ait herhangi bir problem gözlemlenmemiş, aglütinasyon ve çiftleşme sorunsuz gerçekleşmiştir. Projenilerde mutasyonun bir sonraki nesile aktarılıp aktarılmadığının tayini için, % 50-50 fenotip veren projenilerden DNA izolasyonu ve PCR'lar yapılmıştır. Tetratlar arasında renk ve morfolojik olarak farklılıklar görülmüştür.

Literatürde *C. reinhardtii* üzerinde hücre içi trafik konusunda yapılan çalışma görülmemektedir. Özellikle *SEC23B* geni üzerine yapılan fonksiyonel çalışma bulunmamaktadır. Tamamlanan tez çalışması, bu gen modeli üzerine yapılmış olan ilk çalışmadır. Bu nedenle, burada sunulan sonuçlar büyük bir dikkatle yorumlanmalıdır. *C. reinhardtii* ideal bir model organizmadır ve hücre içi trafik konusunda da bu organizma ile çalışmanın bir çok avantajları olacaktır. Bu projeden elde ettiğimiz veriler hücre içi trafik konusundaki bilgi birikimini artırmıştır. Bu proje ve laboratuvarımızda planlanan diğer projelerden elde edeceğimiz verilerle COPII vezikülleri hakkında bilgi birikimini arttırmak hedeflenmektedir. Bu veriler, hem temel bilimsel araştırmada bilgi birikimine katkıda bulunacak, hem de biyoteknoloji uygulama alanlarında kullanılacaktır.

6) KAYNAKLAR

- Aboulela, M., Nakagawa, T., Oshima, K., Tanaka, Y. 2018. The Arabidopsis COPII components, AtSEC23A and AtSEC23D, are essential for pollen wall development and exine patterning. *Journal of Experimental Botany*, 69 (7): 1615-1633.
- Aktar, S., Cebe, G. 2010. General specifications, using areas of algae and their importance on pharmacy. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 39 (3), 237-264, Ankara.
- Allan, B.B., Moyer, B.D., Balch, W.E. 2000. Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Journal of Science*, 289 (5478): 444-8.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. 2001. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature Cell Biology*, 3 (6): 531-7.
- Baek, K., Kim, D.H., Jeong, J., Sim, S.J., Melis, A., Kim, J.S., Jin, E.S., Bae, S. 2016. CRISPR - Cas 9 ribonucleoproteins and two DNA-free knockouts in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of nature research*, 1-7.
- Barlowe, C., Schekman, R.W. 1993. SEC12 Encodes a Guanine-Nucleotide-Exchange Factor Essential for Transport Vesicle Budding From the ER. *Journal of Nature research*, 365(6444):347-9.
- Barlowe, C., Schekman, R.W., D'enfert, C. 1993. Purification and Characterization of SAR1p, a Small GTP-binding Protein Required for Transport Vesicle Formation From the Endoplasmic Reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 268(2):873-9.
- Barlowe, C., Orci, L., Yeung, T., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Salama, N.A., Rexach, M.F., Ravazzola, M., Amherdt, M., Schekman, R. 1994. COPII: a membrane coat formed by sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic retikulum. *Cell*, 77 (6): 895-907.
- Barlowe, C. 1997. Coupled ER to Golgi transport reconstituted with purified cytosolic proteins. *Journal of Cell Biology*, 139 (5): 1097-110
- Barlowe, C., Miller, E.A. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2):383-410.
- Benedetti, M., Vecchi, V., Barera, S., Dall'Osto, L. 2018. Biomass From Microalgae: The Potential of Domestication Towards Sustainable Biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17(1):173.

- Bhola, V., Swalaha, F., Kumar, R.R., Singh, M., Bux, F. 2014. Overview of the potential of microalgae for CO₂ sequestration. *International Journal of Environmental Science and Technology* 11: 2103–2118
- Bi, X., Corpina, R.A., Goldber, J. 2002. Structure of the sec23/24 Sar1 prebudding complex of the COPII vesicle coat. *Journal of Nature research*, 419 (6904): 271-7.
- Bi, X., Mancias, J.D., Goldberg, J. 2007. Insights into COPII coat nucleation from the structure of sec23. SAR1 complexed with the active fragment of 31. *Europe PMC*, 13 (5): 635-645
- Bonifacino, J.S., Glick, B.S. 2004. The mechanism of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116 (2): 153-66.
- Cai, H., Yu, S., Menon, S., Cai, Y., Lazarova, D., Fu, C., Reinisch, K., Hay, J.C., Ferro-Novick, S. 2007. TRAPPI tethers COPII vesicles by binding the coat subunit Sec23. *Journal of Nature research*, 445 (7130): 941-4
- Caldwell, S.R., Hill, K.J., Cooper, A.A. 2001. Degradation of Endoplasmic Reticulum (ER) Quality Control Substrates Requires Transport between the ER and Golgi. *The journal of Biological Chemistry*, 276(26):23296-303.
- Cao, X., Ballew, N., Barlowe, C. 1998. Initial docking of ER-derived vesicles requires Usa1p and Ypt1p but is independent of SNARE proteins. *The EMBO Journal*, 17 (8): 2156-2165.
- Cao, X., Barlowe, C.I. 2000. Asymmetric requirements for a Rab GTPase and SNARE proteins in fusion of COPII vesicles with acceptor membranes. *The Journal of Cell Biology*, 149 (1): 55-66.
- DeHoff, P.L., Ferris, P., Olson, B.J., Miyagi, A. 2013. Species and population level molecular profiling reveals cryptic recombination and emergent asymmetry in the dimorphic mating locus of *C. reinhardtii*. *Plos Genetics*. 9(8), 1-3 doi.org/10.1371/journal.pgen.1003724
- d'Enfert, C., Wuestehube, L.J., Lila, T., Schekman. 1991. Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *Journal of Cell Biology*, 114 (4): 663-670.
- Dyo, Y.M., Purton, S. 2018. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Mirobiology Society*, 164(2):113-121. England.
- Fabris, M., Abbriano, R.M., Pernice, M., Sutherland, D.L., Commault, A.S., Hall, C.C., Labeeuw, L., McCauley, J.I., Kuzhiuparambil, U., Ray, P., Kahlke, T., Ralph, P.J. 2020. Emerging Technologies in Algal Biotechnology: Toward the Establishment of a Sustainable, Algae-Based Bioeconomy. *Frontiers in Plant Science*, 11: 279.

- Ferenczi, A., Pyott, D.E., Xipnitou, A., Molnar, A. 2017. Efficient targeted DNA editing and replacement in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cpf1 ribonucleoproteins and single-stranded DNA. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 1-2. University of California, Los Angeles.
- Fukuda, R., McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Engel, T., Nickel, W., Rothman, J.E., Söllner, T.H. 2000. Functional architecture of an intracellular membrane t-SNARE. *Journal of Nature research*, 407 (6801): 198-202.
- Gould, J.L., Keeton, W.T. 1996. *Biological Science*, Kitap, 1: (637). Norton.
- Guiry, M.D. 2012. How Many Species of Algae are There. *Journal of phycology*, 48 (5): 1057-63.
- Harris, E.H., 2001. *Chlamydomonas* as a model organism. *Developmental, Cell and Molecular Biology Group, Biology Department*, 52: 363-406. North Carolina.
- Hauri, H.P., Schweizer, A. 1992. The endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *Current Option Cell Biology*, 4(4): 600-608.
- Jang, S.B., Kim, Y.G., Cho, Y.S., Suh, P.G., Kim, K.H., Oh, B.H. 2002. Crystal structure of SEDL and its implications for a genetic disease spondyloepiphyseal dysplasia tarda. *The journal of Biological Chemistry*, 277 (51): 49863-9.
- Je, B. et al. 1988. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Journal of Science*, 10;240(4858):1534-8
- Jing, J., Wang, B., Peijun, L. 2019. The functional role of SEC23 in vesicle transportation, autophagy and cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 15(11):2419-2426.
- Jones, S., Newman, C., Liu, F., Segev, N. 2000. The TRAPP complex Is a nucleotide exchanger for Ypt1 and Ypt31/32. *Molecular biology of the cell*, 11(12): 4403–4411.
- Joo, S. et al. 2017. Gene regulatory networks for the haploid-to-diploid transition of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 175(1):314-332.
- Khalil, A.S., Collins, J.J. 2010. Synthetic biology: applications come of age. *Journal of Nature research*, 11 (5): 367-79.
- Khoriaty, R., Vasievich, M.P., Jones, M., Everett, L., Chase, J., Tao, J., Siemieniak, D., Zhang, B., Maillard, I., Ginsburg, D. 2014. Absence of a red blood cell phenotype in mice with hematopoietic deficiency of SEC23B. *Molecular and Cellular Biology*, 34 (19): 3721-34.
- Khoriaty, R. vd. 2016. Pancreatic SEC23B deficiency is sufficient to explain the perinatal lethality of germline SEC23B deficiency in mice. *Scientific Reports*, 6: 27802.

- Khoriaty, R. vd. 2018. Functions of the COPII gene paralogs SEC23A and SEC23B are interchangeable in vivo. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 115 (33): 7748-7757.
- Kim, Y.G., Raunser, S., Munger, C.I., Wagner, J., Song, Y.L., Cygler, M., Walz, T., Oh, B.H., Sacher, M. 2006. The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering. *Cell*, 127 (4): 817-30.
- Kirchhausen, T. 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annual review of cell and developmental biology*, 15:705-32. Longwood Ave, Boston, Massachusetts, United States of America.
- Kodera, C., Tomohiro, Y., Sato, K. 2014. Sec23 Homolog Nell1 Is a Novel GTPase-activating Protein for Sar1 but Does Not Function as a Subunit of the Coat Protein Complex II (COPII) Coat. *Journal of Biological Chemistry*, 289 (31): 21423-21432.
- Lee, M.C., Miller, E.A., Goldberg, J., Schekman, R. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual review of cell and developmental biology*, 20: 87-123.
- Lee, M.C., 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): 605-17.
- Litchman, E. 2007. Resource Competition and the Ecological Success of Phytoplankton. *Evolution of Primary Producers in the Sea*, Chapter 16: 351-375.
- Li, Xiaobo., Patena, W., Fauser, F., Jinkerson, R.E., Saroussi S., Meyer, M.T., Ivanova, N., Robertson, J.M., Yue, R., Zhang, R. vd. 2019. A Genome-Wide Algal Mutant Library and Functional Screen Identifies Genes Required for Eukaryotic Photosynthesis. *Nature Genetics*, 51: 627–635.
- Lord, C., Bhandari, D., Menon, S., Ghassemian, M., Nycz, D., Hay, J., Ghosh, P., Ferro-Novick, S. 2011. Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Journal of Nature research*, 473 (7346): 181-6.
- Mancias, J.D., Goldberg, J. 2008. The structural basis of protein membrane separation of cargo membrane with human cop ii coating machines. *The EMBO Journal*, (21): 2918-2928.
- Martinez-Menárguez, J.A., Geuze, H.J., Alan, J.W., Klumperman, J. 1999. Average of vesicular tubular sets between ER and Golgi excluding secretory proteins from COPI coated vesicles. *Cell*, 98 (1): 81-90.
- 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):263-75.

- 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: islands of genes in a sea of repeats. *Plant Cell*, 14(11): 2659–2679.
- Molino, J.V.D., deCarvalho, J.C.M., Mayfield, S.P. 2018. Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: Expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plos Biology*, 13 (2). doi: 10.1371 / journal.pone.0192433
- Nielsen, J., Keasling, J.D. 2016. Engineering Cellular Metabolism. *Cell*, 164(6):1185-1197
- Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Söllner, T.H., Rothman, J.E. 2000. Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Journal of Nature research*, 407 (6801): 194-8.
- Presley, J.F., Cole, N.B., Schroer, T.A., Hirschberg, K., Zaal, K.M.J., Schwartz, J.P. 1997. ER-to-Golgi transport visualized in living cells. *Journal of Nature research*, 389 (6646): 81-5.
- Remacle, C., Cardol, P., Coosemans, N., Gaisne, M., Bonnefoy, N. 2006. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 103 (12): 4771-6
- Rossi, G., Kolstad, K., Stone, S., Palluault, F., Ferro-Novick, S. 1995. BET3 encodes a novel hydrophilic protein that acts in conjunction with yeast SNAREs. *Molecular biology of the cell*, 6 (12): 1769-80.
- Sacher, M., Jiang, Y., Barrowman, J., Scarpa, A., Burston, J., Zhang, L., Schieltz, D., Yates, J.R., Abeliovich, H., Ferro-Novick, S. 1998. TRAPP, a highly conserved novel complex on the cis-Golgi that mediates vesicle docking and fusion. *The EMBO Journal*, 17 (9): 2494-503.
- Sacher, M., Barrowman, J., Wang, W., Horecka, J., Zhang, Y., Pypaert, M., Ferro-Novick, S. 2001. TRAPP I implicated in the specificity of tethering in ER-to-Golgi transport. *Molecular Cell*, 7 (2): 433-42.
- Salama, N.R., Schekman, R.W. 1995. The role of coat proteins in the biosynthesis of secretory proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 7(4):536-43.
- Salome, P.A., Merchant, S.S. 2019. A Series of Fortunate Events: Introducing *Chlamydomonas* as a Reference Organism. *The Plant Cell*, 31 (8): 1682-1707.
- Sasso, S., Stibor, H., Mittag, M., Grossman, A.R. 2018. Natural history of model organisms: from molecular manipulation of domesticated *Chlamydomonas reinhardtii* to survival in nature. *Cell Biology*. DOI: 10.7554/eLife.39233

- Sanderfoot, A.A., Raikhel, N.V. 1999. The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs. *Plant Cell*, 11(4): 629–642.
- Sapperstein, S.K., Lupashin, V.V., Schmitt, H.D., Waters, M.G. 1996. Assembly of the ER to Golgi SNARE complex requires Usa1p. *Journal of Cell Biology*, 132 (5): 755-67.
- Sato, K., Nakano, A. 2005. Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nature Structural & Molecular Biology*. 12 (2): 167-74.
- Sato, K., Nakano, A. 2007. Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *Febs Letters*, 581 (11): 2076-82.
- Schekman, R., Barlowe, C.I. Yoshihisa, T. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Journal of Science*. 259 (5100): 1466-8.
- Schwarz, K. vd. 2009. Mutations affecting the secretory COPII coat component SEC23B cause congenital dyserythropoietic anemia type II. *Nature genetics*, 41(8):936-40.
- Sekimoto, H. 2017. Sexual reproduction and sex determination in green algae. *Journal of plants research*, 130(3):423-431.
- Siddiqui, A., Wei, Z., Boehm, M., Ahmed, N. 2019. Engineering microalgae through chloroplast transformation to produce high value industrial products. *Biotechnology and applied biochemistry* 67(1):30-40.
- Smetacek, V. 1999. Diatoms and the Ocean Carbon Cycle. *Protist*, 150(1):25-32.
- Tao, J., Zhu, M., Wang, H., Afelik, S., Vasievich, M.P., Chen, X.W., Zhu, G., Jensen, J., Ginsburg, D., Zhang, B. 2012. sec23b is required for the maintenance of murine professional secretory tissues. *PNAS (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)*, 109 (29).
- Treier, U., Fuchs, S., Weber, M., Wakarchuk, W.W., Beck, C.F. 1989. Gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii*: light dependence and gene expression patterns Archives of Microbiology volume, 152, 572–577.
- Umen, J.G. 2011. The evolution of sex and mating loci: An expanded look from Volvocine algae. *Curr Opin Microbiol*, 14(6): 634–641.
- Wang, W., Sacher, M., Ferro-Novick, S. 2000. Trapp stimulates guanine nucleotide exchange on Ypt1p. *Journal of Cell Biology*, 151 (2): 289-296.
- Whyte, J.R., Munro, S. 2002. Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *Journal of Cell Science*, 115(Pt 13):2627-37.

- Wurtzel, E.T., Vickers, C.E., Hanson, A.D., Millar, A.H., Cooper, M., Voss-Fels, K.P., Nickel, P.I., Erb, T.J. 2019. Revolutionizing agriculture with synthetic biology. *Nature Plants*, (12): 1207-1210.
- Yang, C., Chen, N., Li, X., Lu, D., Hou, Z., Li, Y., Jin, Y., Gu, J., Yin, Y. 2020. Mutations in the coat complex II component SEC23B promote colorectal cancer metastasis. *Journal of Nature research, Cell death & Disease*, 11 (3): 157.
- Yehia, L., Jindal, S., Komar, A.A., Eng, C. 2018. Non-canonical role of cancer-associated mutant SEC23B in the ribosome biogenesis pathway. *Human molecular genetics*, 27 (18): 3154-3164.
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R. 1993. Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Journal of Science*, 259(5100):1466-8.

ÖZGEÇMİŞ

ÖZGÜN MUSUL

ozgunmusul@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2017-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji ABD, Enzim ve Mikrobiyal biyoteknoloji BD, Antalya
Lisans 2012-2016	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Samsun

PROJELER

1. Araştırmacı, 2019- . Yeşil Alg *Chlamydomonas reinhardtii*'de *SEC23B* İnsersiyonel Mutantlarının Genetik Bağlantı ve Fenotipik Analizleri. Akdeniz Üniversitesi BAPKB, Proje No: FYL-2019-4901. (11.142,69 TL).