



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

Chlamydomonas reinhardtii P.A. Dangeard 1888'de EYE2
Protein Ekspresyonunun Farklı Parametrelere Bağlı Olarak
Değişiminin Belirlenmesi

Esra ÖZTÜRK YİĞİT

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 11.07.2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

***Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard 1888'de EYE2 Protein
Ekspresyonunun Farklı Parametrelere Bağlı Olarak Değişiminin
Belirlenmesi**

Esra ÖZTÜRK YİĞİT

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 11.07.2017

Bornova-İZMİR

2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Esra Öztürk Yiğit tarafından doktora tezi olarak sunulan “*Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard 1888’de EYE2 Protein Ekspresyonunun Farklı Parametrelere Bağlı Olarak Değişiminin Belirlenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 11 Temmuz 2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:**İmza**

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Atakan SUKATAR

Raportör Üye : Prof. Dr. Ergün TAŞKIN

Üye : Prof. Dr. İsmail KARABOZ

Üye : Prof. Dr. Meltem CONK DALAY

Üye : Prof. Dr. Sacide PEHLİVAN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “*Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard 1888’de EYE2 Protein Ekspresyonunun Farklı Parametrelere Bağlı Olarak Değişiminin Belirlenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

11/07/2017

Esra ÖZTÜRK YİĞİT



ÖZET***Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dangeard 1888’de EYE2 Protein Ekspresyonunun Farklı Parametrelere Bağlı Olarak Değişiminin Belirlenmesi**

ÖZTÜRK YİĞİT, Esra

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Atakan SUKATAR
Temmuz 2017, 84 sayfa

Tek hücreli yeşil alglerden olan *Chlamydomonas reinhardtii* dışarıdan gelen ışığı algılayan ve ışığın şiddetine göre yüzme yönünün belirlenmesini sağlayan göz noktası adı verilen özel sistemlere sahiptir. Göz noktasının gerek granülasyonu gerekse foksiyonunun şekillenişinde görevli olan ve göz noktasında lokalize olan beş farklı protein gösterilmiştir. Bu proteinlerden biri olan EYE2, fotoreseptörlerin yokluğunda kloroplast stromasında pigment granüllerinin organizasyonunda görevlidir. İlginçtir ki *eye2-2* mutant suşlarında gözlenen normalden farklı göz noktası fenotipi, bu proteinin redoks sinyal kaskad sisteminde fonksiyonel olduğu hipotezini doğrumuştur. Bu verilerden yola çıkarak hazırladığımız tez çalışmasında amacımız; EYE2’de iki redoks sistein rezidüsünü içerecek biçimde oluşturulan mutantlar ve yabancı tip hücrelerde EYE2 protein ekspresyonunun değişiminin zamana ve besiyerine bağlı olarak incelenmesidir. Bu amaçla, mutant suş oluşturmaya yönelik çalışmalar yapılmış ve TAP, R, M besiyerlerinde kültüre edilen hücrelerde, EYE2 protein ekspresyonu western blot yöntemi ile incelenmiştir. Yabancı tip ve elde edilen mutant hücreler kullanılarak yapılan ekspresyon denemelerinde farklı besiyerlerinde, suşlar arasında ya da zamana bağlı EYE2 protein artışında dikkate değer bir fark görülmemiştir.

Bu çalışma, Prof. Dr. Atakan SUKATAR’ın yürütücüsü olduğu 115Z184 No’lu TÜBİTAK projesi ile desteklenmiştir.

Anahtar sözcükler: *Chlamydomonas* sp., EYE2, Western blot, Göz noktası



ABSTRACT**Investigation of The Change In EYE2 Protein Expression At
Chlamydomonas reinhardtii P.A. Dangeard 1888, With Regard To
Varying Parameters**

Ozturk Yigit, Esra

Ph.D. Dissertation, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Atakan SUKATAR

July 2017, 84 pages

EYE2 one of these proteins is regulated the organization of pigment granulation in the chloroplast stroma in the lack of photoreceptors. Interestingly, eye2-2 mutant strain's eyespot different from wild type strain, these reports led us to the hypothesize that these proteins are functional in the system of redox signal cascade. Based on this data, our aim was investigation of the change in EYE2 protein expression level with regard to time and medium in wild type and EYE2 mutant cells, which are formed through inclusion of two redox sistein residues. For this purpose, mutant strains were constructed and the expression level of EYE2 was explained by western blot in cells which were grown in TAP, R, M medium. Expression experiments of EYE2, using wild type and mutant cells did not reveal any significant difference in medium-dependent, strain-dependent or time-dependent.

This study was supported by grant TUBITAK 115Z184, under the principal investigatorship of Prof. Dr. Atakan SUKATAR.

Keywords: *Chlamydomonas* sp., EYE2, Western blot, Eyespot

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın yürütülmesi ve hazırlanması esnasındaki emeği ve bana olan güveni ile desteklerini hiç bir zaman esirgemeyen, çok değerli danışman hocam, sayın Prof. Dr. Atakan SUKATAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, TUBİTAK tarafından 115Z184 no'lu proje ile maddi olarak desteklenmiştir. Bu nedenle adı geçen kuruma, ayrıca çalışmalarım süresince olanaklarından yararlandığım E.Ü. Fen Fakültesi Dekanlığı'na ve Biyoloji Bölümü Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Laboratuvarının olanaklarından yararlanmamı sağlayan, benden yardımlarını ve sabrını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, çok kıymetli hocam, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Zeki TOPÇU'ya teşekkürlerimi sunarım.

Kıtalar ötesinden, laboratuvarını bana açan, her türlü imkanı sağlayan ve tez çalışmam boyunca bilgi ve birikimlerini benden sakınmayan, çok sevgili hocam, Arizona Üniversitesi'nden Prof. Dr. Carol DIECKMANN'a ve her türlü sorularıma sıklıkla yanıt veren Dr. Telsa MITTELMEIER ve Dr. Mark THOMPSON'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezime olan katkıları nedeniyle Tez İzleme Komitesi ve Tez İzleme Jüri Üyesi olan değerli hocalarım Prof. Dr. İsmail KARABOZ, Prof. Dr. Meltem CONK DALAY, Prof. Dr. Sacide PEHLİVAN ve Prof. Dr. Ergün TAŞKIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince deneyimlerini benimle paylaştığı, uzun ve boğucu yollarda beni yalnız bırakmadığı, güler yüzünü ve sabrını hiç esirgemediği, tecrübesi ile yolumu aydınlattığı için Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Hidrobiyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi sayın Yard. Doç. Dr. İnci TÜNEY KIZILKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Tezime olan katkıları ve hazırlık sürecindeki yardımları, doğru tespitleri, neşesi ve sabrıyla en zor günlerimi bile neşelendiren, Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Laboratuvarı'ndan çok kıymetli çalışma arkadaşım, Araştırma Görevlisi Gizem ÇALIŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm zorluklarda yanımda olduklarını bildiğim, manevi desteklerini esirgemeyen, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Hidrobiyoloji

Laboratuvarı'ndan çalışma arkadaşlarım, Sait AYTAR, Gökhan YASAVUR, Ayşegül KOZAK ve Alperen ERTAŞ'a tüm laboratuvar destekleri nedeniyle teşekkürü borç bilirim.

Tezimin tüm aşamalarında, manevi desteklerini ve yardımlarını her zaman yanımda hissettiğim, beni gönülden desteklediklerine inandığım çok özel ve kıymetli dostlarım, Aslı SEREN, Aslı TAŞÇI, Aylin İLGÜN, Melek ÜÇÜNCÜ, Yeşim F. KÖPRÜLÜ, İsmet SEREN, Çağatay TAŞÇI, Muhammed ÜÇÜNCÜ, Emre KÖPRÜLÜ'ye ve en kıymetlilerimiz olan geleceğimizi emanet edeceğimiz Aras TAŞÇI ve Devın SEREN'e yanımda oldukları için en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Çalışma sürecimin son yarısında, yolculuğuma katılmalarına karşın, desteklerini, iyi dileklerini ve ilgilerini hep yanımda hissettiğim, sevgili Sabri YİĞİT, Nurten YİĞİT, Mine KALIP ve Emin KALIP ile birlikte tek ve sevgili yeğenimiz biricik Gizem KALIP'a tüm destekleri için çok teşekkür ederim.

Sevgi ve destekleriyle hayatımın her aşamasında, aldığım her kararda maddi ve manevi olarak yanımda olan başta çok sevgili annem, Zinnet ÖZTÜRK, babam, Metin ÖZTÜRK ve babanem Ümmühan ÖZTÜRK olmak üzere biricik kardeşlerim Aykut ÖZTÜRK ve Ertuğrul ÖZTÜRK'e binlerce kez teşekkür ederim, desteklerini anlatmaya kelimeler yetmez.

Sevgilim eşim Murat YİĞİT'e, bu yolculuk boyunca büyük bir özveri ve sabırla beni desteklediği ve yüreklendirdiği için tüm sevgim ve kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
İÇİNDEKİLER	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. <i>CHLAMYDOMONAS</i> 'DA FOTORESEPTÖR SİSTEMLER	3
2.1 Göz Noktasının Asimetrik Yerleşiminin Fotoreseptörler Sistemlere Etkisi	4
2.2. Göz Noktası Pigment Granüllerinin Düzenlenmesi	6
2.2.1. Pigment granül tabakalarının fonksiyonu; gölgelendirme ve yansıtma	7
2.2.2. Göz noktasının yapısı	9
2.2.3. Fotosistem bileşenlerinde pigment granüllerinin fonksiyonu.....	10
2.2.4. <i>Chlamydomonas</i> hareket yeteneğinin genel modeli	12
2.3. Fotoreseptörler	14
2.4. Sinyal İletim Yolları	15
2.4.1. Kalsiyum kanallarının rolü	15

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.2. Sinyal İletimindeki Diğer Etkenler	16
2. 5. Işığa Bağlı Davranışta Kamçı Yanıtı	17
3. GÖZ NOKTASI OLUŞUMUNDA MUTASYONLARIN ETKİSİ.....	19
4. MATERYAL VE YÖNTEMLER	23
4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
4.2 Kullanılan Cihaz ve Aletler.....	25
4.3 Kullanılan Çözeltiler	26
4.4 Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Özellikleri	29
4.4.1 Çalışmada kullanılan <i>C. reinhardtii</i> suşları.....	29
4.4.2 <i>C. reinhardtii</i> kültürünün hazırlanması.....	29
4.5. Deneysel Çalışmalar	33
4.5.1 <i>EYE2</i> geni bulunmayan <i>eye2-2</i> (<i>Arg 7</i>) suşuna, mutant <i>EYE2</i> geni içeren konstraktın hazırlanması ve transformasyonu.....	33
4.5.1.1 pEYE2 rekombinant plazmidinin eldesi	33
4.5.1.2. pEYE2 plazmid DNA'sının izolasyonu	36
4.5.1.3. <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin kompotent hale getirilmesi	38
4.5.1.4. <i>Chlamydomonas</i> hücrelerinin pEYE2 plazmidi ile transformasyonu	38
4.5.2. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.5.3. Transformasyon sonrası seçici besi ortamında büyüeyebilen hücrelerdeki rekombinant plazmidlerin PCR ile doğrulanması.....	43
4.5.3.1. <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinden hızlı DNA izolasyonu.....	43
4.5.4. Mutant hücrelerde EYE2 protein ekspresyonunun belirlenmesi	45
4.5.4.1 Hücrelerden protein eldesi.....	45
4.5.4.2 SDS-PAGE	45
4.5.4.3. Western Blot	46
4.5.5. <i>eye2/pht</i> ikili mutant suşların oluşturulması ve oluşturulan hücrelerin taranması.....	50
4.5.5.1. <i>eye2-2</i> ve <i>pht</i> suşlarını eşleştirme ve PCR çalışması.....	50
5. BULGULAR.....	52
5.1. Mutant <i>eye2</i> Geninin Hazırlanması ve <i>EYE2</i> Geni Bulunmayan <i>eye2-2</i> (<i>Arg 7</i>) Suşuna Transformasyonu	52
5.2. pEYE2 Rekombinant Plazmidinin Doğrulanması	52
5.3. Transformantların PCR ile Doğrulanması	53
5.4. Mutant Hücrelerde EYE2 Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi.....	55
5.5. <i>eye2/pht</i> İkili Mutasyon Taşıyan Suşların PCR ile Taranması	57
5.6. Zamana Bağlı Değişimin Western Blot ile Belirlenmesi	58
6. TARTIŞMA VE SONUÇ	64

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
7. ÖNERİLER.....	72
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	74
ÖZGEÇMİŞ.....	84



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1. <i>Chlamydomonas</i> fotoreseptör bileşenleri	4
2. 2. <i>Chlamydomonas</i> hücresinde kamçı ve kamçı kökçüklerinin şematik çizimi. .	5
2. 3. <i>C. eugametos</i> göz noktası morfolojine ait görüntü.....	7
2. 4. Göz noktasının, ışığın geliş yönü ile bağlantısı.	8
2. 5. <i>Chlamydomonas</i> göz noktasının yapısı ve organizasyonunun şematik çizimi.	10
2. 6. Işığın gelişinin açığa bağlı değişiminin yansıtma etkisi	12
2. 7. <i>Chlamydomonas</i> hücrelerinde ışığa bağlı hareketlerin şematik çizimi.	18
4. 1. <i>C.reinhardtii</i> sıvı kültürü.....	32
4. 2. <i>C. reinhardtii</i> 'nin katı besi ortamında büyüyen kolonilerine ait örnek plate görüntüsü.	33
4. 3. pARG 7.8 plazmidinin haritası.	34
4. 4. pARG plazmidi içerisine klonlanan <i>EYE2</i> geni dizisi.....	35
4. 5. <i>pEYE2</i> plazmidinin <i>E. coli</i> DH5α kompetent hücresine transferi sonrası katı besi ortamında büyüyen kolonilerin yer aldığı örnek plate görüntüsü	36
4. 6. <i>C. reinhardtii</i> hücrelerinin inkübasyonu.....	39
4. 7. <i>C. reinhardtii</i> hücreleri transformasyon öncesi elektroporasyon kuvvetlerinin görüntüsü....	39

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4. 8. <i>C. reinhardtii</i> hücreleri transformasyon sonrası besiyeri içerisinde ki görüntüsü.....	40
4. 9. Transformasyon sonrası ekimi takiben alınan plate görüntüsü.....	40
4. 10. Lineer <i>pEYE2</i> 'nin <i>eye2-2</i> suşuna transformasyonu sonrası büyüyen Cys mutant kolonilerin görüntüsü.	41
4. 11. Transformasyon sonrası büyüyen koloniler.....	41
Şekil 4. 12. Thoma lamı örnek görüntüsü.....	42
5. 1. <i>pEYE2</i> plazmidinin saflaştırılma sonrası enzim ile kesim öncesi ve sonrasına ait agaroz jel görüntüsü.....	53
5. 2. Transformantlara ait PCR ürünü jel görüntüsü.	54
5. 3. Western blot görüntüsü.	55
5. 4. Hücrelerin ışık mikroskobu ile çekilmiş örnek görüntüleri.	57
5. 5. <i>eye2/pht</i> ikili mutant suş adaylarına ait PCR ürününe ait örnek agaroz jel görüntüsü.....	58
5. 6. SDS-PAGE sonrası Coomassie boyası ile muamele edilmiş jel görüntüsü...59	59
5. 7. Yabancı tip, <i>C. reinhardtii</i> suşlarının farklı besiyerlerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü.....	59
5. 8. <i>eye2-2</i> ve <i>cys</i> mutant <i>C. reinhardtii</i> suşlarının TAP besiyerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

5. 9. *cys* mutant *C. reinhardtii* suşlarının R ve M besiyerlerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine ait western blot görüntüsü 61
5. 10. *Cys* mutant *C. reinhardtii* suşunun ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine ait western blot görüntüsü..... 62
5. 11. Yabancıl tip, *C. reinhardtii* türünün ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü. 63



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4. 1. TAP tuz çözeltisinin bileşenleri.....	30
4. 2. Fosfat çözeltisinin bileşenleri.....	30
4. 3. İz element çözeltisinin (Hunter's Trace Elements) bileşenleri.....	31
4. 4. TAP ve TAP+Arg besiyerlerinin bileşenleri.....	31
4. 5. Minimal (M) ve Zengin (R) besiyerlerinin bileşenleri.....	32
4. 6. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu bileşenleri.....	37
4. 7. Kullanılan primerlerin dizisi.....	44
4. 8. PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.....	44
4. 9. PCR reaksiyon koşulları.....	44
4. 10. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu bileşenleri.....	44
4. 11. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılan yükleme ve ayırma jeli kompozisyonları.....	46
4. 12. Bradford yöntemi ile elde edilen standart grafik üzerinde BSA'nın konsantrasyonuna bağlı olarak O.D. değişimi.....	49
4. 13. Kullanılan primerlerin dizileri.....	51
4. 14. PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.....	51



1. GİRİŞ

Yeşil algler birbirinden farklı tüm sucul ortamlarda ve karasal habitatlarda yayılış gösteren ve milyonlarca yıldır global ekosistem için önemli ve kritik roller üstlenen bir alg bölümüdür (Falkowski et al., 2004; O'Kelly, 2007; Leliaert et al., 2011). Yeşil alglerin endosimbiyozis teorisine göre 1.5 milyar yıl kadar öncesinde heterotrofik ökaryotik bir hücrenin bir siyanobakteri hücrelerini yakalaması ve birlikte yaşamaya başlamaları ile oluştuğu öne sürülmektedir (Wallin, 1927; Archibald, 2009; Keeling, 2010).

Bir çok yeşil alg model sistemler olarak ya da ekonomik önemleri nedeniyle kullanılmıştır. Calvin döngüsü olarak bilinen ışığa bağlı fotosentez reaksiyonlarının gösteriminde Melvin Calvin, *Chlorella* cinsini kullanmış (Calvin and Benson, 1948), transplant demeleri için Joachim Hammerling ise büyük hücreli *Acetabularia* cinsini kullanmıştır (Leliaert et al., 2012). Tek hücreli flagellar yapı gösteren *Chlamydomonas reinhardtii* ise uzun süredir model organizma olarak fotosentez, kloroplast oluşumu kamçı hareketliliği ve oluşumu, hücreler arası iletişim, sirkadiyen ritim ve hücre döngüsünün kontrolü gibi çalışmalarda yabanıl tipi dahil bir çok gen spesifik mutant suşu ile birlikte kullanılmaktadır (Rochaix, 1995; Harris, 2001; Grossman et al., 2003; Breton and Kay, 2006).

Dışardan gelen ışığı algılama ve bu ışığa göre yanıt oluşturma yeteneğine sahip olan yeşil algler, fotoreseptör bakterilerin aksine sadece ışığı tarama özelliğinin yanı sıra ışığa yönelim yeteneğine de sahip olduğu bilinmektedir. Yeşil alglerde ışığa yanıtın farklı şekilde olabildiği gösterilmiştir. Bunların arasında en sık duyulanlar pozitif fototaksis (ışığa yönelim) ve negatif fototaksis (ışıktan kaçış) dışında, fotoşok ya da diğer adıyla fotofobik yanıt (yüksek ışık yoğunluğuna yanıt olarak yüzmenin aniden durması ve geriye doğru hareketin başlaması), fotokinesis (ışık yoğunluğuna göre yüzme hızının düzenlenmesi) gibi hareket yetenekleridir. Bu hareket yetenekleri, fotosentez için doğru ışığın bulmasını sağlaması nedeniyle yaşamsal öneme sahiptir (Hegemann, 1997; Sineshchekov et al., 2002; Govorunova and Sineshchekov, 2005; Roberts, 2006).

Chlamydomonas reinhardtii yukarıdaki tüm bu ışığa bağlı hareketleri ile bilinmektedir. Diğer yeşil algelere benzer olarak, *Chlamydomonas* da söz konusu bu hareket yetisinin gerektirdiği özel hücresel özelliklere sahiptir. İlk olarak göz noktası (stigma, eyespot) olarak bilinen özel bir fotoreseptöre sahip olduğu gösterilmiştir ki -bu yapının başarılı fototaktik hareket ve yetenekler için oldukça önemli olduğu bilinir- (Witman, 1993).

Chlamydomonas, moleküler genetik ve klasik çalışmalara kolayca yanıt verebilmesi nedeniyle gösterilen bu fotoreseptör sistem içerisinde göz noktası oluşumun ve fonksiyonunun açıklanabilmesi amaçlı yapılan çalışmalarda da oldukça sık kullanılmıştır.

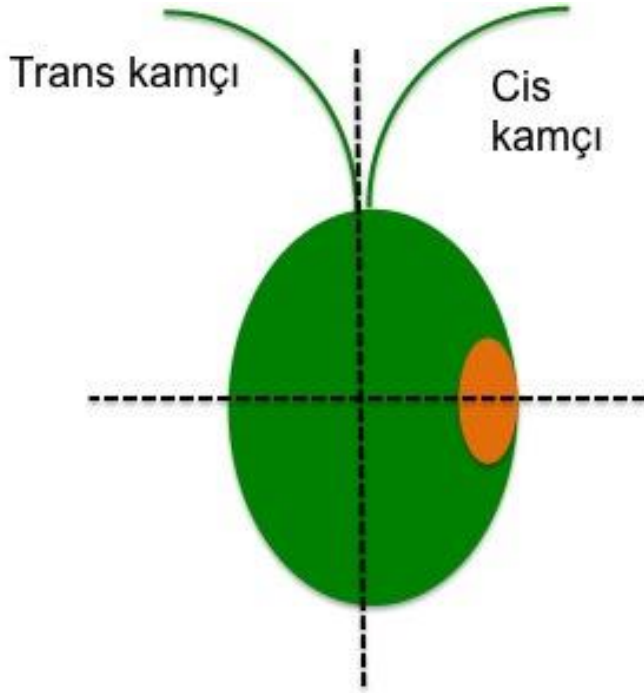


2. CHLAMYDOMONAS'DA FOTOSEPTÖR SİSTEMLER

Chlamydomonas'ın ışığa yanıtında dört önemli bileşen gösterilmiştir; sinyal alıcı (fotoreseptörler), sinyal arttırıcı (Pigment granül tabakaları), yanıt üretici (sinyal aktarım yolağı), yanıt etkisi (iki kamçı). Şekil 2.1'de *Chlamydomonas*'ın içerdiği tüm fotoreseptör bileşenleri görülmektedir.

Pigment granül tabakaları ışık mikroskobunda parlak kırmızı-turuncu benekler halinde hücrenin ekvator düzleminde görülür. Yabani tip hücrelerde göz noktası sadece bir tane ve hücrenin yüzeyine yakın görünür. Göz noktasının oluşumu hücrede asimetri oluşmasına da sebep olmaktadır (Holmes and Dutcher, 1989). Hücre boydan boya ikiye bölündüğünde oluşan iki parçadan birisi göz noktasını içerirken diğeri içermez ve bir kamçı ile bir göz noktasını içeren kısma cis-kamçı, göz noktasının içermeyip sadece tek bir kamçı içeren diğeri kısma ise trans-kamçı adı verilmektedir (Roberts et al., 2001; Yoshimura et al., 2005). Hücreler diğeri düzlemde de ikiye ayrılması durumunda da her iki kamçı Şekil 2.1'de ki gibi aynı düzlemde yer alacaktır.

Chlamydomonas'da göz noktası ile kamçı vuruş düzlemi arasında 45°'lik açı bulunmaktadır, fotoreseptörün bu özelliği ışık yönünün tek düzlem üzerinde izlenmesi için önemlidir bu amaçla hücreler kendi çevrelerinde dönerek yüzüp sarmal bir yol izlemektedirler.

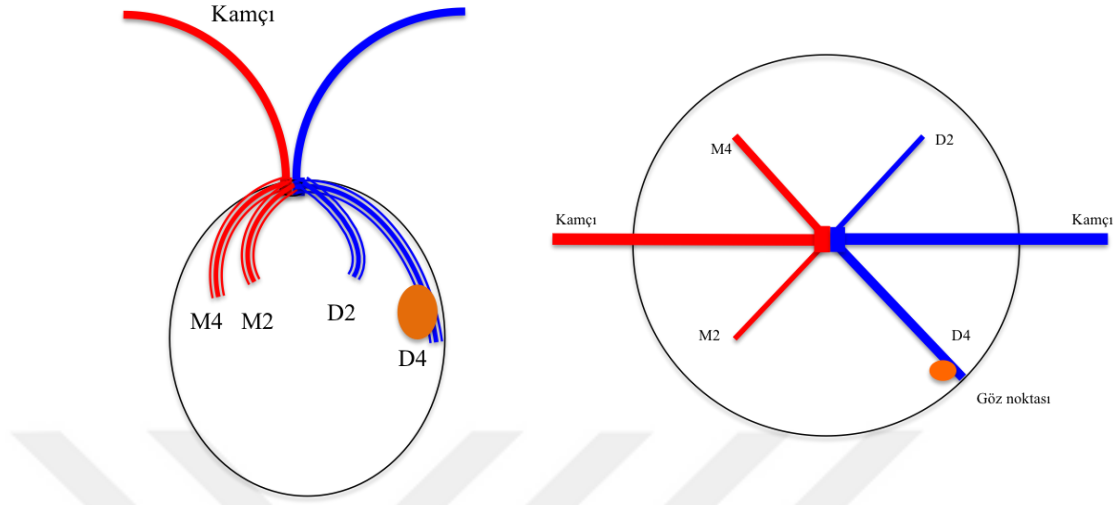


Şekil 2. 1. *Chlamydomonas* fotoreseptör bileşenleri, Roberts et al., (2001), Thompson (2016), Mittelmeier et al., (2015)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.

2.1 Göz Noktasının Asimetrik Yerleşiminin Fotoreseptörler Sistemlere Etkisi

Hücre içerisinde göz noktasının asimetrik yerleşiminin fotoreseptör sisteminin yüzme yönüne olan duyarlılığını arttırdığı bilinmektedir (Foster and Smyth, 1980). Şöyle ki göz noktası granülleri, fotoreseptör, ve sinyal mekanizması için uygun yerleşimin belirlenmesinin, hücre içerisinde ki spesifik hücre içi elementlerinin ve bileşenlerin ortaklığı ile sağlandığı düşünülür. *Chlamydomonas*'da her bir kamçı bir bazal cisimcik ile ilişkilidir ve bazal cisimcik ile kamçı hücrenin ön (baş) kısmında bulunmaktadır. Her bir bazal cisimcik, iki mikrotübül kökçüğü (rootlet) ile ilişkilidir. Bunlar iki numaralı kökçük ve dört numaralı kökçük olarak isimlendirilir ve hücrenin ön kısmından boylu boyunca uzanarak ve hücrenin sonuna gelmeden sonlanırlar. Tüm *Chlamydomonas* hücreleri, hücrenin bölünmesinden önce oluşmuş bir tane bazal cisimcik (Daughter (M) basal body) ve en az bir önceki bölünmeden kalmış bir tane daha bazal cisimcik (mother (M) basal body) olmak üzere iki bazal cisimcik

İçerir. Göz noktası ise yabancı tip hücrelerde hücre bölünmesi dışında 4 numaralı oğul mikrotübül kökçüğünün yanında bulunmaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2. *Chlamydomonas* hücresinde kamçı ve kamçı kökçüklerinin şematik çizimi. Bazal cisimcikler küçük kutucuklar şeklinde gösterilmiştir ve her bir bazal cisimcik kamçı kökçükleri ile ilişkilidir. Oğul bazal cisimcik (Daughter basal body, D) ile ilişkili kamçı kökçük ve yapıları mavi renklidir, Anaç bazal cisimcik (Mother basal body, M) ile ilişkili kamçı kökçük ve yapıları kırmızı renkli verilmiştir. 2 ve 4 numaralı kamçı kökçükleri bazal cisimcikler ile ilişkilidir. Göz noktası turuncu görünmektedir ve D4 ile ilişkilidir. D4 kamçı kökü diğerlerinden uzundur. A. Hücrenin önden görünüşünün şematik çizimi, B. Hücrenin üstten görünüşünün şematik çizimi. Çizimler Thompson (2016)'dan alınarak yeniden düzenlenmiştir Roberts et al., (2001), Thompson (2016), Mittelmeier et al., (2015)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.

Hücre bölünmesi düzlemi, göz noktasının üzerinden doğrudan doğruya uzanır, bu süreçte göz noktası tüm hücre yüzeyinden kaybolur ve hücre bölünmesinin başlarında hiç bir göz noktası aktivitesi görülmez (Morel-Laurens and Bird, 1984; Holmes and Dutcher, 1989, Mittelmeier et al., 2015). Bu kaybolmanın sebepleriyle ilgili öne sürülen farklı fikirler bulunmaktadır, bunlardan bazıları; granül tabakalarının düzensiz olması (Holmes and Dutcher, 1989; Gaffal et al., 1993; Yang and Tsuboi, 1999). Kloroplastın derinlerinde kaldığı için görünmemesi şeklindedir (Morel-Laurens and Bird, 1984). Hücre bölünmesinin ardından yeni göz noktası oğul bazal cisimcik ile ilişkili olan D4 mikrotübül kökçüğünün yanında görünür (Holmes and Dutcher, 1989; Gaffal et al., 1993; Yang and Tsuboi, 1999; Mittelmeier et al., 2015). Yakın geçmişte Mittelmeier et al., (2015) tarafından yapılan immünfloresans mikroskopi çalışmalarında hücre bölünmesi sırasında göz noktasının ve hücredeki değişimlerin görüntüleri var olmakla birlikte yine de granüllerin bu süreçte

işleyişleri ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Ancak geçmiş yıllarda öne sürülen iki olasılık söz konusudur, ilki granüller tamamen kaybolup, bölünme sonrası yeniden sentezlenmesi şeklinde iken (Holmes and Dutcher, 1989; Yang and Tsuboi, 1999), diğeri granüllerin düzensizleşerek dağıldığı ve bölünme ardından oğul nesilde hücresel bileşenlerin etkisiyle yeniden organize olarak çok tabakalı granüler yapıyı yeniden oluşturduğu şeklindedir (Morel-Laurens and Bird, 1984; Yang and Tsuboi, 1999).

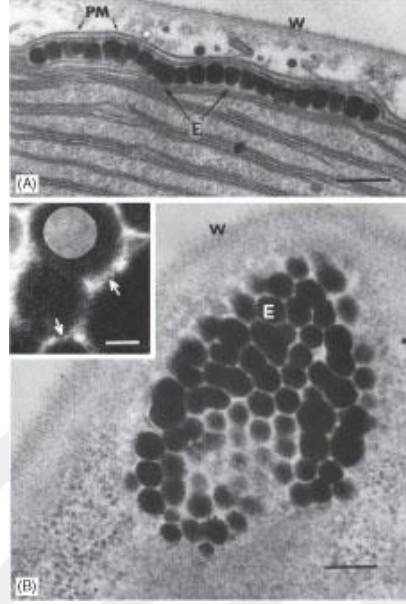
Göz noktası oluşumu ile ilgili hala bilinmeyenler olsa da mikrotübül kökçüklerinin göz noktası pigmentlerinin oluşumundan hemen önce oluştuğu bilinmektedir (Holmes and Dutcher, 1989; Mittelmeier et al., 2013).

Oğul bazal cisimcikten çıkan D4 mikrotübül kökçüğü ile göz noktasının eş-lokalizasyonunun sebebi olarak, D4'ün kloroplast içinde pigment granülasyonunun ve plazma membranında ki fotoreseptörlerin oluşumunda hücre çekirdeği ile birlikte rol oynaması, dolayısıyla hücre içindeki önemli fonksiyonu gösterilir. Bu varsayımın dışında bir diğere düşünce ise, D4'ün fotoreseptörler gibi görsel bileşenlerden birisi olduğu ve fotoreseptörlerin bu sayede pigment granüllerinin uygun pozisyonu için sinyal alabiliyor olduğudur. Her iki olasılıkta da oğul bazal cisimcikten çıkan D4 mikrotübül kökçüğü yapısal ve polipeptid ya da protein içeriği olarak belirgin şekilde diğere kökçüklerden oldukça farklıdır. Ancak yine de hücre bölünmesinden sonraki sinyal mekanizması ayrıntılı olarak bilinmemektedir.

2.2. Göz Noktası Pigment Granüllerinin Düzenlenmesi

Yeşil alglerde pigment granülleri karetonoid dolu yağ granülleri olarak dizilmiştirler. *Chlamydomonas* cinsinde de diğere yeşil algelere benzer olarak pigment granülleri kloroplast içinde kloroplast zarının hemen altında bulunurlar. *Chlamydomonas*'da karetonoid granüllerinin alanı yaklaşık $1.3 \mu\text{m}^2$, hücre yüzeyinde kapladığı alan ise %1 kadardır. *C. reinhardtii*'de pigment granülleri çoklu tabakalar halinde bulunur (genellikle 2 olmasına karşın 3, 4'de olabilir). İlk granül tabakası, kloroplast zarı ve tilakoid membran arasına sıkıca paketlenmiştir. Sonra ki tabaka, tilakoid membranlar arasındadır. Granül ve membranların bu

şekilde farklı düzenlenmesi göz noktasının fonksiyonu için oldukça önemlidir (Foster and Smyth, 1980) ayrıca göz noktasında ki bu tabakalar arası boşluklar göz noktasının yansıtma özelliğini destekledikleri için de önemlidirler (Şekil 2.3).



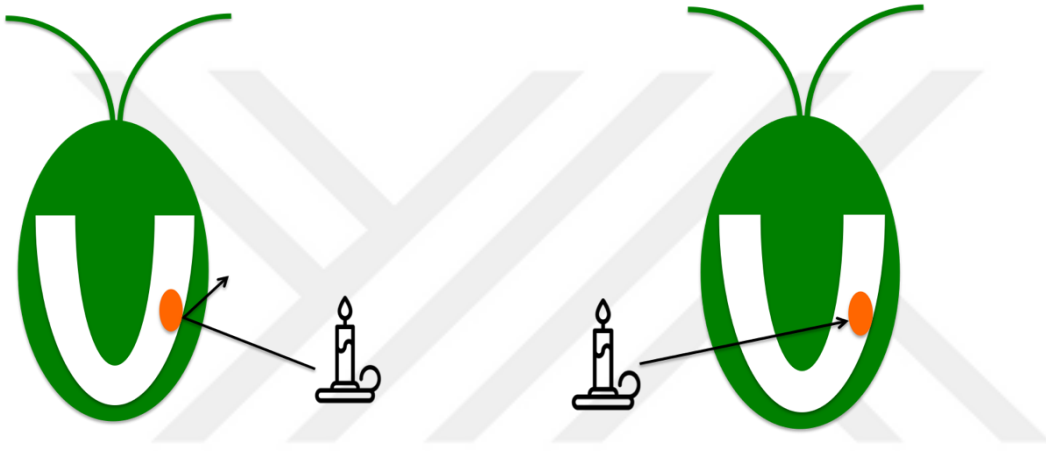
Şekil 2. 3. *C. eugametos* göz noktası morfolojine ait görüntü. A. Göz noktası (E) yaklaşık 23 granülden tek tabaka olarak oluşur ve plazma membranı (PM)'nin altında yerleşim gösterir (belirteçler:0,2µm). (B) Hücrenin yüzeysel görünümü ve göz noktası olarak yaklaşık 100 granülden oluşan kristalimsi alana ait görüntü, küçük resim; hücre genel görünümü (Küçük resim belirteç:0,5 µm). Walne and Arnott (1967).

2.2.1. Pigment granül tabakalarının fonksiyonu; gölgelendirme ve yansıtma

Chlamydomonas görme yapısı dışarıdan gelen ışık yoğunluğuna olduğu kadar ışığın geliş yönüne karşı da hassastır. Pigment granülleri ışığın yönünün algılanmasını sağlayan kritik bileşenlerdir. Şekil 2.4'de pigment granül tabakalarının fonksiyonunu fototaksis'e karşı nasıl kullandığı görülmektedir. Şekil 2.4A'da ışık kaynağı göz noktası ile aynı yöndedir. Işık fotoreseptörlerini aktifleştirecek potansiyele sahip şekilde direkt olarak gelir. Eğer aktivasyon olmazsa, ışık göz noktasına vurur ve fotoreseptörlere doğru tekrar potansiyel aktivasyon enerjisi ile yansır (Kreimer and Melkonian, 1990; Schaller and Uhl, 1997). Şekil 2.4B'de ki gibi ışık kaynağı ile göz noktası farklı yönde olduğunda ise ışık fotoreseptörleri aktive etmek için tüm hücre boyunca ilerlemek zorundadır. Bu durumda ışığın kloroplast boyunca ilerlemesi gerekmektedir ki bu da hücre içerisinde ışığın fotosentez mekanizmaları tarafından absorblanmalarına

dolayısıyla şiddetinin azalmasına sebep olmaktadır (Crescitelli et al., 1992; Kreimer et al., 1992).

Fotoreseptörün gölgelendirilmesinde hücrenin ve kloroplastın etkisi, göz noktasının farklı pozisyonlarda olduğu ve bu nedenle ışık şiddetinin azaldığı, mutant suşlarda yapılan çalışmalar ile incelenmiştir. Yabancı hücrelerde yapılan çalışmalarda hücre önden arkaya doğru kontrast değişimlerine bakılarak taranmış ve ışığın fotoreseptörlere ulaşımında 8 kat farklılık olduğu öne sürülmüştür (Harz et al., 1992).



Şekil 2. 4. Göz noktasının, ışığın geliş yönü ile bağlantısı. A. Göz noktası ile ışık kaynağı aynı yönde olduğunda ışık yansıtılır. B. Göz noktası ile ışık kaynağının yönü ters iken ışık absorblanır Roberts et al., (2001), Thompson (2016), Mittelmeier et al., (2015)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.

Benzer ölçümler pigment granülleri bulunmadığı için göz noktası bulunmayan (*eye1-3*) mutant hücrede de yapılmıştır. *eye1-3* hücresi pigment granülleri içermemesine karşın hücrenin ön yüzünden arka yüzüne doğru yine de 2 kat kadar ışık değişimi gözlenmiştir ki bu da hücrenin göz noktası olmasa da ışık absorpsiyonunun kısmen gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır (Morel-Laurens and Feinleib, 1983; Sineshchekov et al., 1989). *eye1-3* mutant suş ile yapılan diğer çalışmalar göz noktası olmayan bu suşun dışarıdan gelen ışığa yanıt oluşturduğunu ancak fototaktik bir yanıtın bulunmadığını göstermiştir (Morel-Laurens and Feinleib, 1983). Sonuç olarak göz noktasının olmaması yön duyarlılığını azaltmakta, pigment granüllerinin olmaması ise fototaktik yönlendirmenin gerçekleşmemesine sebep olmaktadır (Roberts et al., 2001).

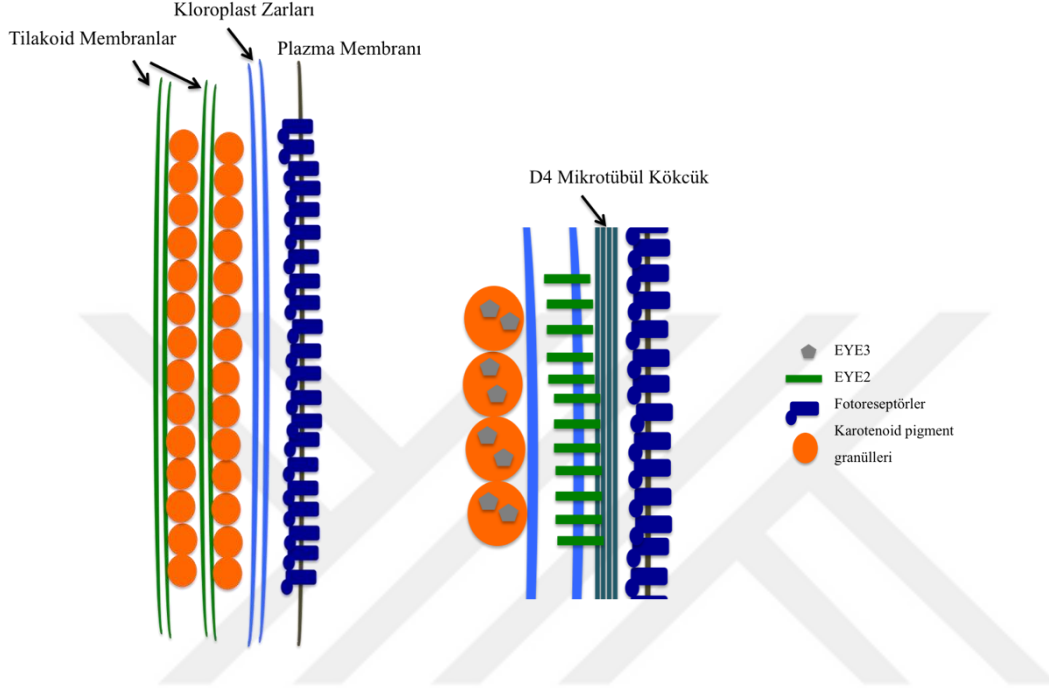
Göz noktasının granülünün kompozisyonu incelendiğinde, karetonoid pigmentlerinden oluştuğu bu pigmentlerin ise öncelikli olarak; β,β -karoten, β , Ψ -Karoten, likopen olduğu görülmüştür (Grung et al., 1994). Göz noktası granüllerinde bu özel karotenoid kompozisyonu ilk olarak göz noktasının absorpsiyon özelliklerini belirler. Göz noktası maksimum 530-550 nm dalga boyunda ışığı yansıtırken, saflaştırılan granüller maksimum 550 nm'dir. Bu aslında ışık tayfı ile fototaktik hareketlerinin arasında dengeli bir ilişki göstergesidir şöyle ki; en yüksek hassaslığın görüldüğü 503 nm iken, 550 nm üstü dalga boyunda ise hiçbir fototaktik yanıt görülmemektedir. Yine de göz noktası granüllerinin kompozisyonu ile ilgili bilinenler göz noktası aygıtının yön duyarlılığını açıklamak için yeterli değildir.

2.2.2. Göz noktasının yapısı

Chlamydomonas hücresi ile yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında göz noktası bölgesinde iyi şekilde organize olan yapılar görmüştür (Walne and Arnott, 1967; Melkonian and Robenek, 1980). Hücrenin incelenen çeşitli kesitlerinde de göz noktasının bulunduğu bölgede, sıkıca paketlenmiş görme sistemi bileşenleri bulunduğu gösterilmiştir. Şekil 2.5 elektron mikroskobu görüntüsünü temsilen çizilmiş bir diyagramdır. Bu incelemelerde göz noktasının öne çıkan özelliği, kloroplastın içinde bulunan karotenoid içeren lipid granüllerinden oluşmasıdır (Nakamura et al., 1973). Bu granüller altıgen şekilde sıkıca paketlenmiştir (göz noktası granülleri ifade edilirken halkasal gösterilmiştir). *Chlamydomonas*'da göz noktası birden fazla granül tabakası içerir. İlk tabaka kloroplast zarının hemen altında yer alır (OCM ve ICM), ilk granülün hemen altında ise tilakoid membran bulunur (T).

Kloroplast dış membranının oldukça yakınında plazma zarı bulunur, plazma zarı aynı zamanda fotoreseptörlerin lokalize olduğu bölgedir. Göz noktasının bulunduğu bölgede membranlar oldukça özelleşmiştir (Melkonian and Robenek, 1980; Melkonian et al., 1981). Elektron mikroskobu çalışmalarında, göz noktası bölgesinde plazma membranı ve kloroplast dış zarı zarlar arası partiküller ile oldukça yoğun kaplanmış olup aynı zamanda tilakoid tabakaları ise atipik olarak düşük yoğunlukta membranlar arası partikül içermektedir. Plazma mebranında yer

alan partiküllerin çeşitliliği 8 nm ile 12 nm çapında değişim gösterir. Kloroplast zarında bulunan partiküller ise daha küçük olup çapları 2-6 nm arasında değişir. Bu partiküllerin ışığı algılayan proteinler içerdiği ve ilk ışık girişini taradığı düşünülmektedir (Melkonian and Robenek, 1980; Harris, 2001).



Şekil 2. 5. *Chlamydomonas* göz noktasının yapısı ve organizasyonunun şematik çizimi, Roberts et al., (2001), Thompson (2016), Mittelmeier et al., (2015)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir..

Ardaşık gelen her granül tabakası başka bir tilakoid membran tabakası ile ilişkilidir. Tilakoid membranın tüm tabakaları granül tabakaları ile yakın olarak göz noktasında bulunmaktadır ayrıca granül tabakaları ve tilakoid membran tabakaları arasında da belirli bir boşluk bulunmaktadır. Aralarında ki bu boşluk göz noktasının fonksiyonu için kritik öneme sahiptir.

2.2.3. Fotosistem bileşenlerinde pigment granüllerinin fonksiyonu

Pigment granüllerinin hücrenin ışığı algılaması ve fotoresptörlerin duyarlılığını desteklediğinin bilinmesine karşın bu düzende göz noktasının fonksiyon ve yapısının ne şekilde çalıştığı ile ilgili yeterli veri pek bulunmamaktadır. Bu konuda yapılan çalışmalar da göz noktasının yansıtma özellikleri ile ilgili dikkate değer teoriler öne sürülmüştür. Göz noktasının çeyrek dalga boyu enterferans yansıtması gibi iş görüyor olabileceği fikri de bunlardan

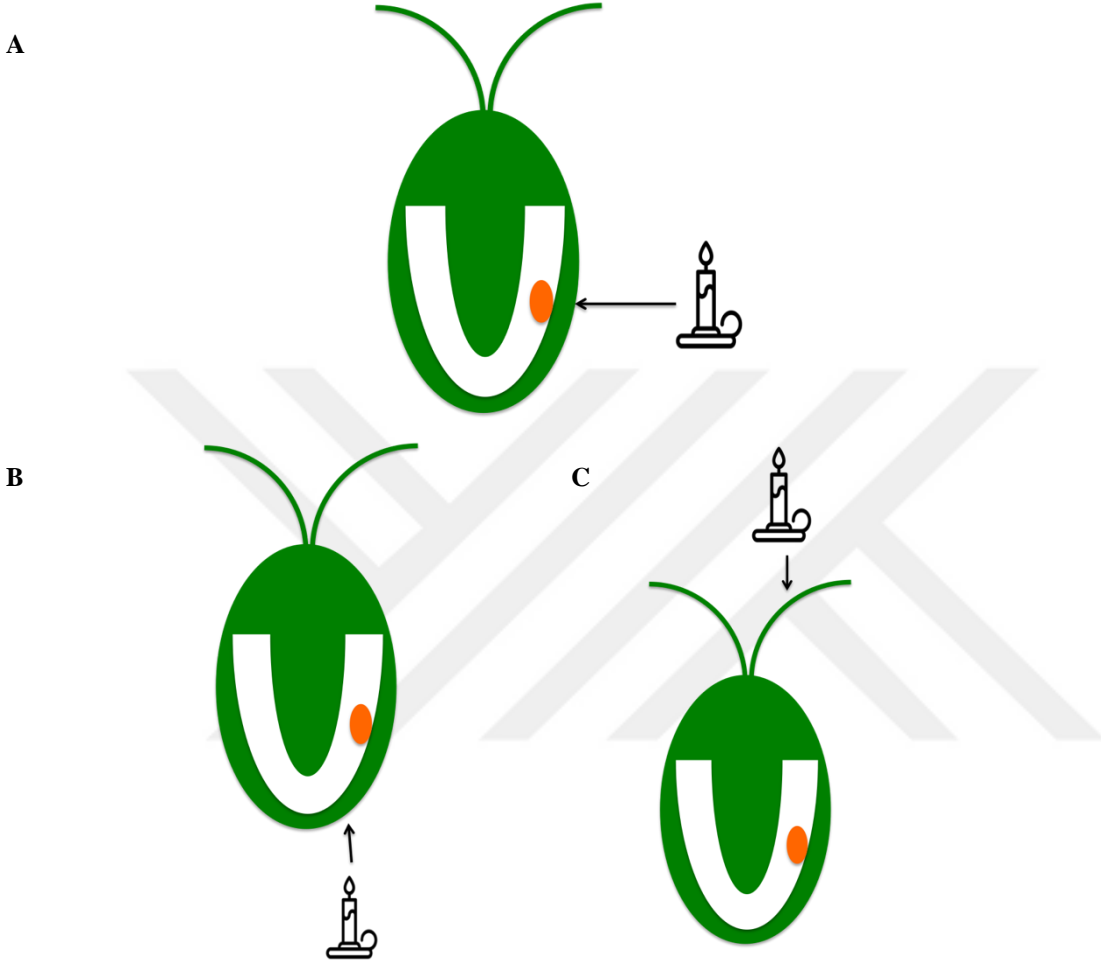
biridir (Foster and Smyth, 1980). Genel olarak enterferans yansıtıcı, iki farklı reaktif dizine ait materyallerin devamlı alternatif şekillerde düzenlemeleridir. Şekil 2.6'de ki düzenleme bunun için örnek gösterilebilir.

Ayrıca, göz noktasının yansıtma özellikleri, ışığın dalga boyuna uyum gösterir, bu maksimum yansıtma, göz noktasının dışardan gelen ışığın açısına bağlı olarak göz noktasında ki değişim tarafından yapılır. Foster and Smyth (1980) göz noktasının bu maksimum yansıtmayı sağlayabilmesinin belki de dik gelen ışık ile (örneğin 90 derece) olabileceği teorisini öne sürmüştür (Şekil 2.6A). Bu durumda ışığın açısı artar ya da azalır (2.6B, 2.6C) ışığın yansıtılması da azalacaktır. Bu teoriye göre fotoreseptörlerin ışığı yakalama miktarları ışığın paralel açı ile gelmesi durumunda en azdır. Özetle açığa bağlı olarak ışığın yansıtılması değişecek, 90 derece açı ile gelen ışıkta en yüksek oranda yansıtma olurken açı değiştikçe artıkça ya da azaldıkça verim düşecektir. Foster and Smyth (1980) bu teorisi, Uhl et al., (1987), Kreimer and Melkonian (1990), Kreimer et al., (1992) Schaller et al., (1997) ve Bennett and Golestonian (2015) tarafından çeşitli açılarda ışıklar ile denemeler yapılarak denenmiş ve söz konusu teori açıklanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalara göre yansıtma yoğunluğu paralel açıyla gelen ışıkta hiç görülmemiştir diğer bir ifade ile paralel gelen ışıkta herhangi bir yansıtma söz konusu değildir.

Göz noktasının ışığı yansıtma yoğunluğunu ile ışığın geliş açısı arasında ki ilişki aynı zamanda fototaktik yönelim için de oldukça önemlidir. Işığın göz noktasında dik açıyla geldiğinde, yansıtma yoğunluğunun artışı, fototaktik yanıtı da en iyi şekilde oluşmasını sağlar. Işık göz noktasına paralel geldiğinde yansıtma yoğunluğu minimumdur ve bu durumda ışığa doğru ya da ışıktan kaçış gibi fototaktik yanıt görülmemiştir.

Maksimum yönlendirme hücreler ışığa doğru ya da ışıktan uzağa hareket ederlerken meydana gelir. Şöyle ki; hücre dönerken fotoreseptörler tarafından algılanan $dI/d\theta$ oranını en aza getirir (ışık yoğunluğu dönüşün açısının fonksiyonuna bağlı olarak değişecektir). Teoride ışığa doğru ya da ışıktan uzaklaşarak hareket eden bir hücre, bu ikisi arasında ki farkı genel olarak ayırt etmez ve fotoreseptörün $dI/d\theta$ oranının sifıra yakın olarak taradığı her durumda

ışığa bağlı yönelim gerçekleşecektir. *Chlamydomonas* hücrelerinin uygun doğrultuda olup olmadıklarını nasıl anladıklarını açıklamaya çalışmıştır. Hücrenin sarmal bir çizginin içinde ya da dışında ilerlerken uygun yönelimi tarayabildiği düşünülmüştür (Schaller et al., 1997; Kantsler et al., 2013).



Şekil 2. 6. Işığın gelişinin açığına bağlı değişiminin yansıtma etkisi A. Dik açıyla gelen ışık, B-C. Artan ve azalan açıyla gelen ışık. Roberts et al., (2001), Thompson (2016), Mittelmeier et al., (2015)'den alınarak yeniden düzenlenmiştir.

Göz noktası hangi kamçının daha kuvvetli olduğuna göre (cis ve trans) şekillenen sarmal yol ile ilişkili olarak oluşur. Göz noktasının ışık yönünün belirlenmesindeki başarılı kapasitesi düşünüldüğünde, bu oluşum genel olarak inandırıcı görünür.

2.2.4. *Chlamydomonas* hareket yeteneğinin genel modeli

Işığa bağlı yönelim şematik olarak Şekil 2.6'da gösterilmiştir. Yönelim ilk

olarak göz noktasının üzerinde plazma zarında yer alan fotoreseptörün aktivasyonu ile başlar. Aktivasyonun ardından, göz noktasında lokalize olan kalsiyumun (Ca^{++}) dan dolayı bir sinyal üretilmiş olur. Bu kalsiyum transferinin hızı, göz noktası bölgesinde ki plazma zarındaki kalsiyum kanalları ve fotoreseptörler arasında sıkı bir eşleşmenin yansması sonucu belirlenir. Bu süreçte iki farklı olasılık söz konusudur. Fotoreseptörler kendileri ışığa bağlı olarak kalsiyum pompası gibi iş görüyor olabilirler ya da fotoreseptörler kalsiyum kanalları ile bir kompleks oluşturuyor olabilirler (Deininger et al., 1995). Göz noktasından kalsiyum akışı (PRC ile belirtilmiştir), plazma zarının üzerinden kamçı zarına doğru elektriksel iletim ile yayılır. Bu yayılım kamçı zarında kalsiyum voltaj kanallarının akımına neden olur bu ise kamçı akımı (**Flagellar Current FC**) olarak isimlendirilir. Düşük ışık yoğunluğunda kamçı-kalsiyum transferi tanımlanamamakla birlikte yine de bu transferin olduğu düşünülmektedir.

İn vitro verilere göre, kalsiyum konsantrasyon miktarındaki küçük değişiklikler bile fototaktik yanıtın değişiminde oldukça önemlidir. Kalsiyum konsantrasyonundaki küçük değişimler bile hücrenin kamçı yanıtını değiştirir (Kamiya and Whitman, 1984). Kamçıya doğru olan kalsiyum transferi bazı kamçı proteinlerinin fosforilasyon düzeylerinde değişikliğe sebep olur bu da değişim de kamçı vuruşunda değişikliğe neden olur. In vivo araştırmalarda, he iki kamçının da farklı yanıtlar vererek fototaktik dönüşlere sebep olduğu gösterilmiştir. Şöyle ki; düşük ışık yoğunluğunda transkamçı vuruş sıklığını artırırken, ciskamçı vuruş sıklığını azaltmaktadır. Bu da ışık kaynağına doğru dönüşü sağlar. Yüksek ışık yoğunluğunda ise yanıt tam tersi şeklinde gerçekleşerek hücre ışık kaynağının tersine dönüş yaparak uzaklaşır. Daha yüksek ışık şiddetinde ise kamçı kalsiyum transferinin olduğu bununla birlikte kamçı kalsiyum konsantrasyonunda da oldukça fazla artış olduğu görülmüştür. Kamçıya doğru olan bu yüksek kalsiyum geçişi yine bazı kamçı proteinlerinin fosforilasyon seviyelerinde değişikliklere sebep olmuş ve bu kamçı vuruşlarındaki aşırı değişim normal kamçı hareketlerinde dalgalanmalar biçiminde dönüşüme sebep olduğu görülmüştür. Bu da hücrenin normal ileri doğru yüzüşünü dalgalı geri doğru yüzüş şekline getirir ki bu değişim fotoşok olarak isimlendirilir.

2.3. Fotoresseptörler

Chlamydomonas'da fotofobik ya da fototaktik yanıtın eyleme dökülmesinde, retinal pigmentlerin, Fotoşok ya da fototaktik yanıtın her ikisi için fotoresseptör proteinlerin prostetik grupları gibi iş gördüğü düşünülmektedir (Foster et al., 1984; Kroger and Hegemann, 1994).

Yabanıl tip *Chlamydomonas* türünde yapılan araştırmalarda 503 nm dalga boyunda ki ışığa örneğin yüksek duyarlılık gösterdiği görülmüş ve *Chlamydomonas*'da fototaktik yanıtın oluşması için gerekli ışık şiddetinin omurgalı göz sisteminde fotoresseptör olan rhodopsin proteininin yanıt verdiği ışık şiddetine benzediği görülmüştür (Beckmann and Hegemann, 1991; Suzuki et al., 2003). Deneysel yapılan çalışmalarda bu hipotezi doğrular niteliktedir şöyle ki; harici retinal yapılar ve onun analogları 2 farklı karetenoid bulunmayan mutant suşda, fototaktik davranışları yenileyebilmiştir, bu suşlar *FN68 (car1)* (Foster et al., 1984; Foster and Saranak, 1988; Hegemann et al., 1988) ve *CC2359 (jtsl-30)* (Hegemann et al., 1991; Lawson et al., 1991; Takahashi et al., 1991).

Bu konuda daha sonra yapılan çalışmada ise işaretli ^3H -retinal bileşenler, göz noktası fraksiyonundan saflaştırılmış ve chlamyopsin olarak isimlendirilen ve fotoresseptör olduğu tahmin edilen molekül için cDNA analizi yapılmıştır (Deininger et al., 1995). 7-transmembran heliks ailesine dahil olan diğer tüm opsinlerden farklı olarak, Chlamyopsin sadece 4-transmembran heliks içerdiği düşünülmektedir. Chlamyopsin'in bu farklı yapısal tahmin tam olarak açıklanamamasına karşın önceki tahminler ile birleştirildiğinde opsin proteininin oldukça özelleşmiş yapıda olduğu düşünülmektedir. Chlamyopsin'in plazma zarında kalsiyum kanalının bir kısmını oluşturduğu ve ışığa bağlı hareket için bir komponent içerdiği ya da kendisinin bakteriyel klorid iyon pompası olan Halorhodopsin gibi ışıkla indüklenen iyon kanalları olduğu düşünülmektedir. Günümüzde hala tam olarak aydınlatılamamış olan bu ilişki hakkında bildiklerimiz chlamyopsin'i *Chlamydomonas* için kesin in vivo fotoresseptör denmesine yeterli olmaz. Foster and Smyth, (1980) fotoresseptörlerin hücre içerisinde asimetrik olarak plazma membranı üzerinde, chloroplast zarının dışında yer aldığını öne sürmüştür. Elektron mikroskobu fotoğrafları ile de bu

açıklanmaya çalışılmıştır.

2.4. Sinyal İletim Yolları

2.4.1. Kalsiyum kanallarının rolü

Yapılan çalışmalarda, kamçı hareketliliğinin, ışığa yanıt olarak oluşması için, hücrenin görsel fonksiyonları olan bir iletim yolağına sahip olması gerekliliği öne sürülmüş, fototaktik ve fotofobik yanıtların her ikisinin de hücre dışı kalsiyum varlığına işaret ettiği düşünülmüştür. Bu fikirlerden yola çıkılarak yapılan çalışmalarda, *Chlamydomonas* hücrelerinde (tek hücrede) yapılan iyon akımının ve hücre yoğunluğunun ölçümleri; yüksek yoğunluklu ışık ile hücre içerisinde iki iyon akımının oluştuğunu göstermiştir (Hegemann et al., 1990; Harz and Hegemann, 1991; Pazour et al., 1995; Holland et al., 1996; Nonnenga Ber et al., 1996; Holland et al., 1997). İlk akım oldukça hızlıdır ve ışığın verilmesinin ardından 0.5 m/s sonra pik yaparken; ikinci akım daha yavaş olup ışığın verilmesinden yaklaşımla 10-30 m/s kadar sonra gerçekleşir. İkinci akımın oluşup oluşmaması daha çok ışığın şiddeti ile ilişkilidir. İkinci akımın oluşum zamanı da aynı şekilde ışık şiddeti ile ilişkilendirilebilir ve ışık yoğunluğunun şiddeti ikincil iletimin aydınlanmadan sonra hızlıca oluşumunu sağlar. Işığa yanıtının oluşum izi ve iyon aktarım izi birleştirildiğinde, söz konusu her iki akım iletiminin, ışığın emilimi yolağında sinyal iletimi ile ilişkili olduğu görülmüştür.

İlişkilerin gösterilmesi ile birlikte yapılan çalışmalar iki akım iletiminin de lokalizasyonlarının farklı olduğunu göstermiştir. Yüksek ışık şiddeti durumunda ilk akım göz noktası bölgesinde oluşur ve bu nedenle fotoreseptör akımı (Photoreceptor Current, PRC) adı verilmiş iken oluşan ikinci akım kamçılarda lokalize olmuştur ve kamçı akımı (Flagellar Current, FC) olarak isimlendirilmiştir (Harz and Hegemann, 1991).

Fotoşok yanıtına sebep olacak ışık şiddetinde görülen kamçı akımının genişliği ile ışığa oluşacak yanıtı tetikleyen ışık şiddeti birbirinden bağımsız olup bu da kamçı akımının, fotoreseptör akımının genişliğinin onu aktive etmeye yetebildiği durumlarda oluşan akım geçiş yolu olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır (Harz et al., 1992). Düşük ışık yoğunluklarında fototaktik yanıtın

görüldüğü durumlarda FC taranamamış olup bu da bir önce ki fikri kanıtlar. Düşük ışık şiddetinde PRC FC'yi yine tetikler ancak bu tetikleme genişliği eşit değer altında kaldığı için tanımlanamaz.

Konuyla ilgili yapılan biyokimyasal denemelerde kamçılarda, fototaksis için kamçı vuruşlarını değiştirmeye yetecek şekilde, kalsiyum miktarında düşük mikromolar düzeyinde değişiklikler gözlenmiş eş zamanlı yapılan çalışmalarda FC düşük ışık şiddetinde saptanamamıştır (Roberts et al., 2001).

Işığın gelişi ile birlikte göz noktası bölgesinde görülen kalsiyum artışı, hücrede membran depolarizasyonuna sebep olur ve bu plazma membranı boyunca devam eder. Voltaj-geçiş kalsiyum kanalları kamçı membranı boyunca açılır ve kamçı kanallarının bu açılığı FC gibi görünür. Kamçı boyunca olan bu kalsiyum akımı, iki kamçının da kalsiyum konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak kamçı vuruşunu değiştirmesine sebep olur.

2.4.2. Sinyal İletimindeki Diğer Etkenler

90'lı yılların başında araştırmacılar ışığın etkisi ve iyon akımının gibi konularda elde ettikleri kısıtlı veriler nedeniyle çalışmalarını bir kısım araştırmacı, G-protein üzerine kaydırmıştır. G-protein omurgalılarda rhodopsin sinyal iletiminde fonksiyonel olduğu bilenen bir proteindir ve sinyal iletiminde hızlı yanıtı imkan sağladığı düşünüldüğü için önemlidir. *Chlamydomonas* hücrelerinde keşfi ise 1989 yılında Korolkov and Melkonian, tarafından yapılmıştır, göz noktası oluşumu sırasında varlığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda göz noktası oluşum sürecinde bazı proteinlerin fosforilasyon merkezlerinde kalsiyum ile birlikte değişikliğe sebep olduğu gösterilmiştir (Linden and Kreimer, 1995). Göz noktası bölgesindeki kalsiyum akımının görme işleyişinin bir parçası olması nedeniyle fosforilasyon/defosforilasyonun görüş olayı için önemli olabileceği düşünülmüştür.

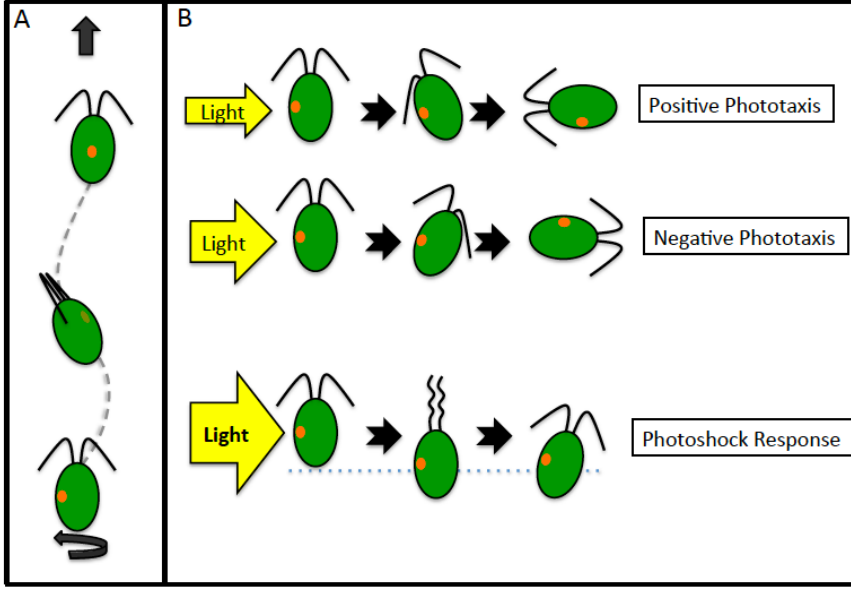
Aynı zamanlarda yapılan çalışmalarda G-proteinin algal görüş ile ilişkisini kanıtlamak adına ilerleme kaydedilmiştir. Spermatozopsis'den yapılan göz noktası

izolasyonunda, ekstrakta ışığın GTPaz aktivitesini azalttığı, maksimum inhibisyonun ise 502 nm dalga boyundaki ışık altında olduğu görülmüştür. Aynı dalga boyunda, ışık yoğunluğunun artırılması, GTPaz aktivitesinin inhibisyonunu daha da arttırmakla birlikte farklı dalga boylarında yapılan benzer çalışmalar da ise aynı sonuca varılmamıştır. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, ilk olarak fototaktik yanıtı sebep olan ışığın dalga boyu ile göz noktası G-proteininin aktivitesi arasındaki bağlantı görülmektedir.

2. 5. Işığa Bağlı Davranışta Kamçı Yanıtı

Kamçıların yanıtı, fototaktik yönlendirilmenin kontrolünü, iki kamçının biyokimyasal kompozisyonundaki farklılıklara bağlı olarak gerçekleşen kalsiyum konsantrasyonuna karşı farklı duyarlılıklar farklı yanıtlara sebep olur (Kamiya and Witman, 1984). Kamçılarda normal kalsiyum konsantrasyonu 10^{-8} M kadardır.

Şekil 2.7A'da hücrenin doğal ışık şiddetinde 360° kendi çevresinde dönerek ilerleyişi ve Şekil 2. 7B'de çeşitli kamçı yanıtları gösterilmiştir. Hücreler düşük ışık şiddetinde pozitif fototaksis yaptıklarında cis-kamçı vuruşları zayıflamakta ve trans-kamçı vuruşları aynı kalmaktadır. Böylece hücre ışığa doğru dönüş ve yönelim hareketi göstermektedir. Işık şiddeti arttığında ve hücreler negatif fototaksis yapacakları zaman ise trans-kamçı vuruşu zayıflarken cis-kamçı vuruşu aynı şekilde kalmakta ve hücre bu sayede ışıktan uzaklaşmaktadır. Aniden gelen yoğun ışık şiddetinde ise hücreler fotoşok'a maruz kalmaktadır. Fotoşok mekanizmasında kamçı hareketliliği diğerlerinden tamamen farklı olup ani ve yoğun ışık, her iki kamçının da hareketini durdurur ve bu da hücrenin olduğu yerde kalması anlamına gelir. Ardından normal kamçı vuruşlarından farklı olarak kamçı hareketleri dalgalanma şeklinde olmakta ve bu dalgalanma hücrenin kısa süreliğine geri gitmesini sağlamaktadır. Daha sonra, kamçı hareketleri normal şekline dönmekte ve hücre rastgele olarak ışıktan uzaklaşmaya çalışmaktadır. Benzer çalışmalar negatif fototaktik popülasyonlarda da denenmiş ve aynı sonuçlar alınmıştır.



Şekil 2. 7. *Chlamydomonas* hücrelerinde ışığa bağlı hareketlerin şematik çizimi. A. Hücrelerin normal ışık altında hareketi. B. Hücrelerin farklı ışık şiddetlerine verdiği yanıtlar (Thompson, 2016).

3. GÖZ NOKTASI OLUŞUMUNDA MUTASYONLARIN ETKİSİ

Chlamydomonas türleri mutasyon oluşturulmasının kolaylığı ve haploid yapısından ötürü moleküler çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. *Chlamydomonas* türleri kolayca eşleştirilebilir ve diploid vejetatif hücreler gerekli durumlarda saflaştırılabilir. Yine de tüm bu kolay çalışılabilir özelliklerine karşın *Chlamydomonas reinhardtii*'den göz noktasının ilk eldesi 1995 yılında Deininger et al., tarafından yapılmıştır. Göz noktasının saflaştırılmasında yaşanan hücre duvarı ve büyük kloroplast'ın örneği kontamine etme sorundarı nedeniyle günümüzde göz noktası çalışmaları daha çok genetik yöntemler ile yapılmaktadır. Bu nedenle göz noktası ile ilişkili mutasyonların gerçekleştirildiği suşlar büyük önem taşımaktadır.

Göz noktasının formunda defektlere sebep olduğu bilinen dört bölge tanımlanmıştır, bunlar; EYE1, LTS1, CAR1 ve PTX4'dür. Bu bölgelerde tanımlanan mutasyonların oluşturduğu mutant suşlarda fototaksis defektleri ve göz noktası anomalileri bulunmasına karşın *car1* ve *lts1* mutantları aslında tam olarak göz noktası oluşumu ile değil de karotenoid pigmentlerinin biyosentezi ile ilişkilidir. Ancak pigment granülleri içerisine paketlenmesi gereken karotenoidler olmadığında göz noktası tamamlanmış olmadığı için bu suşlarda göz noktası anomalileri arasında yer almıştır.

Göz noktası ile ilişkili ilk mutant suşun 1952 yılında Hartshorne tarafından UV ile oluşturulmuş *eye1-1* mutant suş olduğu ve suşda karotenoid granüllerinin bulunmadığı bildirilmiştir (Roberts et al., 2001). Söz konusu bu suş yıllarda fototaksis defektli olarak düşünülmüş olmasına karşın yapılan çalışmalarda suşun fototaktik özelliklerinin bulunduğu ancak fototaktik yöneliminin yetersiz olduğu gösterilmiştir (Morel-Laurens and Feinleib, 1983; Lamb et al., 1999; Roberts et al., 2001). Bu suşla yapılan elektron ve ışık mikroskobu denemelerinde göz noktası yapısının zaman zaman oldukça düzgün olduğu ancak hızlı bölünen kültürlerde yabancı suşlara göre daha düşük reflekslere sahip olduğu ve bozuk göz noktası yapısının gözlendiği rapor edilmiştir (Morel-Laurens and Bird, 1984; Kreimer et al., 1992). Bu bozuk yapı da hızlı bölünen kültürlerde ışık oryantasyonunun düşüklüğüne neden olmaktadır. Aynı suşun daha yavaş bölünen

kültürlerinde ise göz noktasının oluşumu ve göz noktasının ışığa verdiği yanıtta yabancı suşlar ile karşılaştırıldığında hiç bir fark ayırt edilememiştir. Bu nedenle bu suşda bulunan mutasyon ile ilgili olarak ne tamamen granül oluşumunda bir defekt vardır ne de hiç defekt yoktur demek mümkün olmamaktadır. Bozukluk ise granüllerin oluşumunun yavaşlığı olarak açıklanmış fenotipik olarak sadece hızlı bölünen kültürde ortaya çıktığı belirtilmiştir (Roberts et al., 2001).

Pazour et al., (1995), göz noktasında fenotipik farklılığa sebep olan insersiyonel bir mutant suş tanımlamıştır. *ptx4-1* olarak bilinen suş fototaktik değildir ve her bir hücre birden fazla göz noktasına sahiptir. Suş fotoşok yanıtını gerçekleştirmekte ve hatta ışığa yanıt için gerekli bileşenleri de içermektedir. Ancak hücre ışığa bağlı kalsiyum iletiminde defektlidir ve fotoreseptör akımını gerçekleştirememektedir.

Lamb et al., (1999) UV-bağlı bir çok göz noktası defekti bulunan mutant suşlar tanımlanmış, tanımlanan mutantlar dört gruba ayrılmış ve dört farklı bölgeler ile ilişkilendirilmişlerdir. Bu süreçte, yüzebilen ve fotosentez yapan ancak fototaksis yapamayan hücreleri tercih etmiştir ki bu özellikleri taşıyan yaklaşık 170 mutant arasından, göz noktası morfolojisine göre yaptığı ikinci elemelerde, göz noktası bozuk olan 28 adet suş elde etmiştir. Son olarak 2 adet göz noktası bulunmayan suş, bir adet birden fazla göz noktası bulunduran ve bir adet normalden küçük tek bir göz noktası bulunduran toplam dört suş tanımlamıştır (*eye2*, *eye3*, *mlt1*, *min1*). Bu suşlar fotoototrofik olarak gelişebilmekte ve karotenoid biyosentezinde hiç bir defekt göstermemektedirler. *eye2* ve *eye3* mutantlarında göz noktası olmayan ve pigment granüllerinde görülmediği suşlardır. Yine de *eye3* mutant *eye1* suşuna benzer olarak yabancı suşlar gibi durağan fazda iken fototaktik yanıt oluşturabilmektedir. *eye2-1* mutant suşda ise hiç bir koşulda yabancı tip fototaktik yanıt gözlenememiştir. *eye2* ve *eye3* suşları log fazda iken yapılan elektron mikroskobu çalışmalarında zaman zaman lipid içeren granüller görülmüştür ancak bunların göz noktası pigment granülleri mi yoksa kloroplastta bulunan lipofilik granüller mi olduğu belli değildir. Bu konuda henüz gelişmeye rastlanamamıştır.

mlt1 mutantları da *ptx4-1*'e benzer olarak aynı hücre içerisinde birden fazla

göz noktası içermektedir. Çoklu göz noktası içeren *mlt1* suşlarında göz noktalarının yerleşiminde değişiklikler gözlenmiş, göz noktalarından biri yabancı tip hücrelerde bulunan ile benzer yerleşimde, diğerinin ise genellikle kamçıların alt kısmına yakın olarak bulunduğu dikkat çekmiştir. Bazı hücrelerde ise ikiden fazla göz noktası görülebildiği de belirtilmiştir. Ayrıca hücrelerde kamçı kökçükleri yabancı hücrelere göre daha kısa olduğu da görülmüştür. *mlt1-3* suşunda göz noktasının yapısı da incelenmiş ve ikinci göz noktasının farklı oluşumu hariç diğer göz noktasının yabancı tip ile benzer olduğu görülmüştür (Roberts et al., 2001; Mittelmeier et al., 2015).

Yabancı tipte görülen göz noktasından daha küçük olmasına karşın yabancı tip ile aynı lokalizasyona sahip tek göz noktası barındıran *min1* mutant hücresi Lamb et al., (1999) tarafından tanımlanmıştır. Suş ile yapılan elektron mikroskopu çalışmalarında göz noktasının oluşumunda farklılıklar olduğu gözlenmiştir şöyle ki, hücreler asetat içeren besiyerinde kültüre edildiklerinde morfolojik olarak boyutu dışında yabancı tip ile benzerlik gösterirken, asetat bulunmayan besiyerinde kültüre edilen hücrelerde morfolojik yapı bozulmaktadır. *Chlamydomonas* hücreleri fototrofik olarak kültüre edildiklerinde CO₂ yi kullanırken, heterotrofik olarak kültüre edildiklerinde ise asetatı kullanırlar bu bilgiler doğrultusunda , göz noktasındaki bu bozuk morfoloji MIN1 geninin görme ile ilişkili rol oynadığı görüşünü öne çıkarmaktadır.

Yabancı tip hücre genomunu belirlenmesi de son zamanlarda göz noktası mutant suşların seçilimini ve gen spesifik mutasyonları da arttırmıştır. Son yıllarda artış olsa da, bu gibi çalışmalar ilk olarak Kindle (1992) tarafından başlatılmış ve *Chlamydomonas* genomuna rastgele DNA transformasyonu yapılmıştır. Rastgele yapılan bu genoma entegrasyonda bilinen mutant hücreler kullanılmıştır. Transformantların seçiliminde ise ARG7 ya da CRY1 genleri kullanılmıştır olup günümüzde de bu genler sıkça kullanılmaktadır (Mittelmeier et al., 2015). Elde edilen mutantlar arasından ise göz noktası anormalliklerine bakılacak olur ise genellikle fototaktik olmayan suşlar seçildiği görülür. Bu şekilde üç işaretli suş elde edilmiştir. *min1-5*, küçük göz noktası ile karakterize edilirdir. MIN1 lokusuna oldukça yakındır. *eye2-2* göz noktası bulunmayan suşdur ve *eye2-1* mutasyonuna benzer. *eye2-2* ve *min1-5* mutantları ARG7 maker

geni ile seçilmişlerdir ve göz noktası defekt fenotip göstermektedirler.

EYE2 gen bölgesi (Cre12.g509250) ilk olarak mutant suşlar arasında ilk izole edilen ve karakterize edilen gen bölgesidir (Roberts et al., 2001). Kloroplast zarında bulunan, thioeredoksin ailesi proteinlerinden olan ve LysM domaini içeren *EYE2*'nin kloroplastta ki göz noktası proteinleri ile arasında önemli yapısal bağlantı olduğunu düşündürmüştür.

MIN1 gen bölgesi ise (Cre12.g490700) bir sonra ki karakterize edilen gen bölgesidir ve MIN1 proteininin de LysM domainlerini içerdiği gösterilmiştir (Mittelmeier et al., 2008). Lysm domainlerinin hücre duvarında bulunan peptidoglikan'a bağlandığı bilinir (Buist et al., 2008). Göz noktasında buna benzer şekilde bir çok LysM domaini içeren protein de gösterilmiştir (Schmidt et al., 2006). Bu veriler ışığında araştırmacılar LysM domaininin göz noktasının bir arada kalabilmesi gibi önemli bir fonksiyonu olduğu tahmin etmektedir.

Bir sonra ki karakterize edilen gen bölgesi *EYE3*'dir (Cre02.g105600). *EYE3* protein pigment granülasyonunda önemli olduğu bilenen bir Ser/Thr kinaz'dır (Boyd et al., 2011a). *MLT1* geni ise diğerlerine göre daha az komplekstir (Cre12.g509850) ve son yıllarda yapılan çalışmalarda *mlt1-1* mutasyonu sekanslanmıştır (Mittemeier et al., 2015).

Proteinlerin her birinin lokalizasyonunun anlaşılması ile ilgili çalışmalar, proteinlerin göz noktası oluşum sürecindeki fonksiyonlarının aydınlatılması alanına doğru yönelmiştir. Bu nedenle veri toplamak adına çeşitli çalışmalar yapılmış ve göz noktasında, *EYE3* göz noktasında lokalize olabilmesi için *EYE2*'ya gereksinimi olduğu ve yine *EYE2* bulunmadığında ChR1 ile eş-yerleşim gösteremediği belirtilmiştir (Boyd et al., 2011b; Boyd et al., 2011c; Mittelmeier et al., 2011). *EYE3*'nin *EYE2*Ya olan gereksiniminin yanında *EYE2* göz noktasında ki lokalizasyonu ya da ChR1 ile bağlantısı için *EYE3*'ye ihtiyaç duymamaktadır (Boyd et al., 2011a). Elde edilen bu veriler *EYE3*'nin değil de *EYE2* ve ChR1 proteinlerinin regülatör görevi görüyor olabileceği ve D4 kamçı kökçüğü ile ilişkili olabileceği fikrini edinmemizi sağlamıştır ki bu çalışma da bu fikir ışığında şekillenmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

4.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

%30 Akrilamid bis-akrilamid (Sigma, Germany)

Agar (Applichem, Gatersleben, Germany)

Agaroz (Basica LE, Prona, EU)

Amonyum Asetat (Riedel, Hanovel, Germany)

Amonyum molibdat tetrahidrat (Sigma, Germany)

Amonyum nitrat (Fisher, Massachusetts, USA)

Amonyum persülfat (APS) (Sigma, Germany)

Ampisilin (Sigma, Germany)

Arjinin (Santacruz, USA)

Aprotinin (Sigma, Germany)

Bakır (II) sülfat (Sigma, Germany)

Beta merkaptaetanol (Sigma, Steinheim, Germany)

Biotin (Sigma, Steinheim, Germany)

Borik asit (Sigma, Steinheim, Germany)

Bromfenol mavisi (Sigma, Germany)

Coomassie mavisi (Sigma, Germany)

Çinko klorür (Sigma, Steinheim, Germany)

Çinko sülfat (Sigma, Germany)

Disodyum gliserofosfat 5H₂O (Sigma, Steinheim, Germany)

Disodyum hidrojen fosfat (Sigma, Germany)

Dipotasyum fosfat (Sigma, Germany)

Demir üç klorür (Sigma, Steinheim, Germany)

Demir (II) sülfat (Sigma, Germany)

EDTA.H₂O (Sigma, Steinheim, Germany)

Etanol (Merk, Darmstadt, Germany)

Etidyum bromür (Sigma, Steinheim, Germany)

Gliserol (Sigma, Germany)

Glisin (Sigma, Steinheim, Germany)

Gluteraldehit (Sigma, Germany)

HEPES Tampon (Sigma, Steinheim, Germany)

Hidroklorik asit (Merk, Darmstadt, Germany)

Isopropil alkol (Merk, Darmstadt, Germany)

Kalsiyum klorür (Merk, Darmstadt, Germany)

Kloroform (Merk, Darmstadt, Germany)

Kobalt klorür (Merk, Darmstadt, Germany)

Leupeptin (Sigma, Germany)

Manganez klorür (Sigma, Steinheim, Germany)

Magnezyum sülfat (Sigma, Steinheim, Germany)

Maya ekstraktı (Sigma, Steinheim, Germany)

Metanol (Sigma, Steinheim, Germany)

N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED)

Pepstain (Sigma, Germany)

PMSF (Sigma, Germany)

Ponceau S boyası (Sigma, Germany)

Potasyum hidroksit pellet (Atabay, Turkey)

Potasyum dihidrojen fosfat (Sigma, Germany)

Potasyum fosfat (Sigma, Germany)

Potasyum klorür (Fisher, Massachusetts, USA)

SDS (Applchem, Gatersleben, Germany)

Sodyum asetat (Sigma, Steinheim, Germany)

Sodyum klorür (Sigma, Steinheim, Germany)

Sodyum molibdat (Applchem, Gatersleben, Germany)

Sukroz (Merck, Germany)

Thiamin (Sigma, Steinheim, Germany)

Tris baz (Sigma, Steinheim, Germany)

Tris-Cl (Sigma, Steinheim, Germany)

Tryptone (Sigma, Steinheim, Germany)

Tween 20 (Merck, Germany)

Yağsız süt tozu (Pınar, Türkiye)

4.2 Kullanılan Cihaz ve Aletler

Bitki Büyütme Kabini (Grotech, TR)

Çalkalamalı inkübatör (Thermo, Massachusetts, USA)

Çalkalayıcı (Roller) (Thermo, Massachusetts, USA)

Çalkalayıcı (2-D) (Thermo, Massachusetts, USA)

Derin dondurucu – 86 °C (Nuair, Minneapolis, USA)

Derin dondurucu – 20 °C (Sanyo, Wood Dale IL, USA)

Derin dondurucu +4 °C (Arçelik, İstanbul, Türkiye)

Dikey elektroforez düzeneği (Biorad, USA)

Elektroforez güç kaynağı (Thermo, Massachusetts, USA)

Elektroporatör (Biorad, USA)

Hassas terazi (Sartorius, Goettingen, Germany)

Işık Mikroskobu (Olympus, Japan)

Thoma lamı (Marienfeld, Germany)

Manyetik Karıştırıcı (IKA, Staufen, Germany)

Mikropipet (Thermo, Halbrook NY, USA)

Otoklav (Hirayama, Saitama, Japan)

Su banyosu (VWR, Goshen Parkway PA, USA)

Thermal cycler ısı bloğu (Techne, Minnesota, USA)

Santrifüj (Sigma, Germany)

Soğutmalı Santrifüj (Hettich, Kirchlengern, Germany)

UV Görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Paris, France)

Vortex (Velp, Usmate, Italy)

Yatay elektroforez düzeneği (Thermo, Massachusetts, USA)

4.3 Kullanılan Çözeltiler

10X Transfer Tamponu

25 mM Tris base (pH 8.3)

2 M Glisin

1X Transfer tamponu 1lt (10X Transfer tampon kullanılarak taze olarak hazırlanmıştır.)

100 ml 10X Transfer tamponu

200 ml MeOH

1 gr SDS

1000 ml'ye dH₂O ile tamamlanmıştır.

1X TBS-T (Tris-Buffered Saline-Tween 20)

50 mM Tris-Cl (7.4)

150 mM NaCl

0.1 % Tween 20

4X Laemmlı Cözeltisi

0,25M Tris pH:6,8

%40 Gliserol

%20 β -merkaptoetanol

%8 SDS

%0,024 Bromfenol mavisi

Proteaz inhibitörleri;

5 μ g/ml aprotinin,

5 μ g/ml leupeptin,

1 μ g/ml pepstatin A,

1.0 mM PMSF

%1 Gluteraldehit Cözeltisi

2 ml %50'lik Gluteraldehit (Ticari konsantrasyon)

98 ml 1X PBS içinde hazırlanmıştır.

Bloklama Tamponu (NFDM Cözeltisi)

%5 Yağsız Süt Tozu (Non-Fat Dried Milk-NFDM)

1X TBS-T içinde hazırlanmıştır.

Coomassie Boyama Cözeltisi

0,4 gr Coomassie mavisi
400 ml Methanol
200 ml Glasiyal asetik asit
400 ml dH₂O

Coomassie Yıkama Cözeltisi

300 ml Methanol
100 ml Glasiyal Asetik Asit
dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

Fosfar Tamponlu Tuz Cözeltisi (Phosphate Buffer Saline – PBS) Cözeltisi**(10X)**

80 gr Sodyum klorür
2 gr Potasyum klorür
14,4 gr Disodyum hidrojen fosfat
2,4 gr Potasyum dihidrojen fosfat

dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve HCl ile pH:7,4 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Ponceau S Boyama Cözeltisi

2 gr Ponceau S boyası
3 ml Triklosetik asit
dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

4.4 Kullanılan Biyolojik Materyaller ve Özellikleri

4.4.1 Çalışmada kullanılan *C. reinhardtii* suşları

Yabancıl tip *C. reinhardtii* suşu (wild type *mt*⁺-137C): Çalışmamızda temel aldığımız suştur. Tez boyunca tüm aşamalarda yer almıştır. Tris-Asetat-Fosfat (Tris-Acetate-Phosphate, TAP) besiyeri içerisinde kültüre edilmiştir (Harris, 1989).

***eye2-2* (Arg 7):** EYE2 proteininin bulunmadığı suştur. Suş, arginini eksprese edemediği için sadece TAP+Arginin besiyerinde yaşamaktadır. Gerekli durumlarda transformasyonlar için kompetent hale getirilerek kullanılmıştır (Lamb et al., 1999; Roberts et al., 2001).

***pht*:** Phototropin geninde mutasyon olan suştur (Trippens et al., 2012).

Tezde kullanılan suşların tamamı, Prof. Dr. Carol Dieckmann'ın laboratuvarından temin edilmiştir.

4.4.2 *C. reinhardtii* kültürünün hazırlanması

Bu çalışmanın çeşitli aşamalarında farklı besiyerleri kullanılmıştır. İlk kullanılan besiyeri TAP besiyeridir. TAP besiyerinin hazırlanmasında kullanılan TAP tuzları çözeltisinin bileşenleri Çizelge 4.1'de, fosfat çözeltisinin bileşenleri Çizelge 4.2'de ve iz elementler çözeltisinin bileşenleri Çizelge 4.3'de verilmiştir (Gorman and Levine, 1965). TAP besiyerinin kompozisyonu ise Çizelge 4.4'de verilmiştir. Suşlar fototaksis denemelerinde kullanılmak üzere asetat bulunmayan Minimal (M) besiyerinde fototrofik olarak ya da protein ekspresyonu denemelerinde asetat bulunan Zengin (Rich-R) besiyerinde heterotrofik olarak kültüre edilmiştir, besiyerlerinin içeriği Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. *eye2-2* okzotrofik bir suştur ve kültürü için ayrıca besiyerine 0,2 mg/ml arjinin ilavesi yapılmıştır. Katı besiyeri hazırlamak için 15 mg/ml agar ilave edilmiştir.

Bu çalışmada farklı ışık periyodlarında EYE2 ekspresyonu inceleneceği için sıklıkla hücreler katı besiyerinde hayat döngüsü 12:12 (aydınlık:karanlık) şeklinde

inkübe edilmiştir. Kültürlerin istediği bu özel hayat döngüsü koşulları aynı zamanda bitki büyütme dolapları olarak da bilinen özel inkübatörlerde yapılmıştır. Söz konusu sistemler dışardan ışık almayacak şekilde oluşturulmuş içerisinde farklı dalga boylarında ışıma yapabilen lamba ve hayat döngüsünü sağlayabilecek zamanlayıcılar içermektedir. Bu çalışmada ışık şiddeti aksi belirtilmediği sürece 60-80 $\mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ 'dir (Boyd et al., 2011c).

EYE2 proteini yapılan çalışmalarda ve *eye2-2* suş incelendiğinde göz noktasının granülasyonunun oluşumunda etkili olduğu düşünülmektedir, şöyle ki *eye2-2* suş ile yapılan çalışmalar söz konusu suşun göz noktasının pigmentasyonu ve granülasyonunu gerçekleştirmediğini göstermektedir. Göz noktasının hayat döngüsü boyunca aydınlık döngü sürecinde olduğu, karanlık döngü sürecinde ise bölünmeyle birlikte kaybolduğu düşünülürse, EYE2 protein ekspresyonunun karanlık döngü süresince, özellikle karanlıktan aydınlığa geçiş yaklaştıkça artması beklenmektedir. Bu bulgular ve hipotezler doğrultusunda hücreler protein ekspresyonunun karanlık döngü süresince değişimini belirlemek üzere, karanlık döngü boyunca farklı zaman aralıklarında belirlenecek şekilde kültüre edilmiştir.

Çizelge 4. 1. TAP tuz çözeltisinin bileşenleri.

TAP Tuz Çözeltisi	
NH ₄ Cl	15 gr
MgSO ₄	4 gr
CaCl ₂	2 gr
Distile su ile çözelti 1 litreye tamamlandı.	

Çizelge 4. 2. Fosfat çözeltisinin bileşenleri.

Fosfat Çözeltisi	
K ₂ HPO ₄	28,8 gr
KH ₂ PO ₄	14,4 gr
Distile su ile çözelti 100 ml'ye tamamlandı.	

Çizelge 4. 3. İz element çözeltisinin (Hunter's Trace Elements) bileşenleri.

İz Metal Çözeltisi		
Bileşikler	Miktar	Distile su miktarı
EDTA disodium tuzu	50 g	250 ml
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	22 g	100 ml
H ₃ BO ₃	11,4 g	200 ml
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	5,06 g	50 ml
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	1,61 g	50 ml
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	1,57 g	50 ml
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4 H ₂ O	1,10 g	50 ml
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	4,99 g	50 ml
%20 KOH	17 gr	85 ml
Tüm bileşikler ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilerek hacim 1 lt'ye distile su ile tamamlandı.		

Çizelge 4. 4. TAP ve TAP+Arg besiyerlerinin bileşenleri.

TAP Besiyeri (1 lt için)		TAP+ARG (1 lt için)	
Besiyeri Bileşeni	Miktar	Besiyeri Bileşeni	Miktar
Tris	2,42 gr	Tris	2,42 gr
TAP Tuz Çözeltisi	25 ml	TAP Tuz Çözeltisi	25 ml
Fosfat Çözeltisi	0,375 ml	Fosfat Çözeltisi	0,375 ml
İz metal Çözeltisi	1 ml	İz metal Çözeltisi	1 ml
Glasiyal asetik asit	1 ml	Glasiyal asetik asit	1 ml
Distile su	973 ml	10 mg/ml L-Arjinin	20 ml
Agar (Katı besiyeri için)	15 gr	Distile su	953 ml
		Agar (Katı besiyeri için)	15 gr

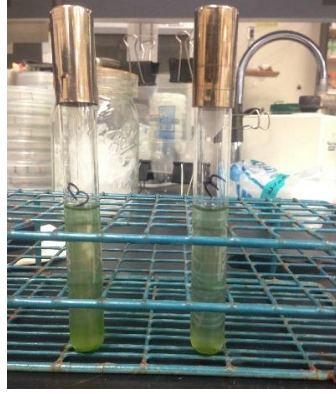
Çizelge 4. 5. Minimal (M) ve Zengin (R) besiyerlerinin bileşenleri.

Çözelti Bileşenleri	M Besiyeri	R Besiyeri
	Miktar	Miktar
%10 Sodyum sitrat	5 ml	5 ml
%1 FeCl ₃ 6H ₂ O	1 ml	1 ml
%4 CaCl ₂ 2H ₂ O	1 ml	1 ml
%10 MgSO ₄ 7H ₂ O	3 ml	3 ml
%10 K ₂ HPO ₄	1,7 ml	1,7 ml
%10 KH ₂ PO ₄	1 ml	1 ml
%10 NH ₄ NO ₃	3 ml	3 ml
2,2M NaAc	-	10 ml
İz Metal Çözeltisi	1 ml	1 ml
Agar (Katı besiyeri için)	15 gr	15 gr
Distile su	983 ml	973 ml

A



B

Şekil 4. 1. *C.reinhardtii* sıvı kültürü. A. 250 ml hacimde hazırlanan kültürler B. 2-10 ml hacimde hazırlanan kültürler.



Şekil 4. 2. *C. reinhardtii*'nin katı besi ortamında büyüyen kolonilerine ait örnek plate görüntüsü.

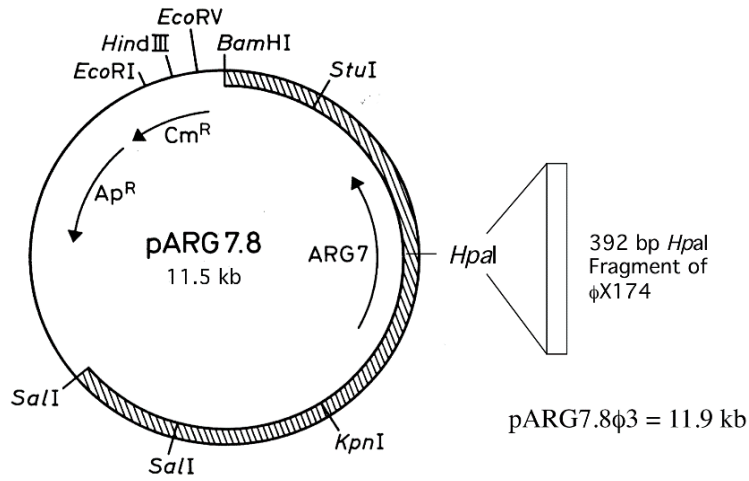
4.5. Deneysel Çalışmalar

4.5.1 *EYE2* geni bulunmayan *eye2-2* (*Arg 7*) suşuna, mutant *EYE2* geni içeren konstraktın hazırlanması ve transformasyonu

4.5.1.1 *pEYE2* rekombinant plazmidinin eldesi

pARG plazmidini; şekil 4.3'de gösterildiği gibi 11.5 kb büyüklükte ampisilin direnç geni (Ap^R) ve kloramfenikol direnç genini (Cm^R) içermektedir. Plazmid kopya sayısı düşük olan pBR329'dan elde edilmiştir (Purton and Rochaix, 1995). *EYE2* geninin mutasyon yapmak istediğimiz thierodoksin aktif bölgesindeki 190. ve 193. pozisyonlarda ki Sistein (Cysteine; Cys) aminoasitlerinin TGC olan üçlü kodonlarında Guanin-Sitozin ile değiştirilmiş ve TCC (Serin üçlü kodonu) elde edilmiştir (1658. pozisyon G-C ve 1667. Pozisyon G-C).

pARG plazmidine dizisi Şekil 4.4'de verilmiş olan *EYE2* geni *EcoRV* ve *HindIII* enzimleri ile klonlanmış ve elde edilen yeni plazmide *pEYE2* adı verilmiştir.



Şekil 4. 3. pARG 7.8 plazmidinin haritası (Roberts et al. 2001).

```

1   GCCGTTTCAN CGGATCCGNC CATGGATTAA GGATCGCGGG TGCAGCAGCA GGTGAAGCT GGCCTGCGTG TGGGCGAGTC
81  GGTACTGTTG CCGGCGCAGG CAGCGTGCAG GCCCCCGTGC CCCAAGCCCC GTGCAGGACA CACAACGTCA GAGCTGCACT
161 CCTGATGAAG CAAGCTCACC TCTCATCGCT GCTTCCGGTG TCCGAGTCCG AGTCCGCGGC GTGCCGGGCG GGAGGCCCGC
241 CTCGCCGCTG AGCCCAGCG GCGGTCCCGG CTTTATTAGT GGGGGCCTGA ACCTGCTCCT GCTCGTCGTC ACTGCTTGAA
321 TACGCGGC;^ AAATATCCAT GGAAGGGCG GCTAGAGCAG GCGGCAGCGC TCCACAGCA AACTATTTC AACTCGCGGT
401 ACGTTTCTGC ACAAATCTCG GGTTCAGGGG ACCACAGAGC AATCCTGGCG TACACGTGAC TATAGTGCAG CTTTGGCGT
481 TTGACAAAAC CCGAATGCAG TTCAATGCGT CGACTGGTC CCGATTCCGT AAAACTTGTC ATCAGCCAC CTGAGACAG
561 CTGGCTGAGT ATATGTACAT GTATTATACA CCCTGTATAT CTGGGTCAAC GCGTTCGCAA CACTTCGTTA AGTCTTCTAG
641 CGCTGTATAG CGCTGCATGC AAGCTCTATC ATTGATTCCA TTCTCTTGA ACTGCTGCTG TATCGTGAGG TATATAGACA
      M Q   A L S   L I P   F S L N   C C C   I V R   Y I D K
721 AGGGACATTC ACAGGCTCAC AATCAGCGCA TTCACGACC CCTTCGCACA GCATAGCCGC GCCAGCCGCT TCAGCTTTGA
      G H S   Q A H   N Q R I   P R P   L R T   A Stop
801 CAGCCTGTAC AACATCGTTC GTGTATCTC TTGCGTGAGG CATAACCCTC CAGGTCGTCG GTCAGCGACA CATGCGTGCG
      EYE2 Start   M R A
881 TTGAGCCCGC CGCTTCCGTC GCGGCTCCGG GCCAGCGTAA GCTCTGCCGT TGGAGCACAC CAGCCACGCC ATGAGCTCTG
4   L S P P   L P S   R L R   A S V S   S A V   G A H   Q P R H   E L C
961 TCGAATGGC ATGCGTCCGG CGCCAGCGTG TGTGGGCGCA GCGGCGGCC CCGAACGGCA GTCCGGCGGG CGCAGTGCAG
31   A N G   M R A A   P A C   V G A   A A A P   E E Q   S G G R S A G
1041 GCCGAGCCTT GACCCTGCTC CGCGCGACAG CCAAGGCGGA CCCACGCCC GCCATCGTGA ACTACACGGT ACAGAAGGGC
58   R S L   T A A   R A T A   K A D   P T P   A I V N   Y T V   Q K G
1121 GAGACATAT GGGACGTAGC TGTGACGAC GCGGTGTCCA TGGCACCAT CAAGGAGCTC AACAGCTGA GCGGCAAGGA
84   E T L W   D V A   V Q H   G V S M   R T I   K E L   N K L S   G K E
1201 ACCCTTGCTC AAGGAAGGGC AGCAGTGTCT GGTACCGGGC TCCGGGATAT CGCAGCTGGC GGTGATGGAG GCGCCGGCCA
111  P L L K E G Q   Q L L   V P A S G I S   Q L A V M E A P A T
1281 CGACAACCCC GGTGTTGGGC TCCGTCCCGG CGCGGGCAT GTGGGGTGG TTTCTGGCAT CACCGCTGCG CCGGTGCCG
138  T T P   V L G   S V P A   R G M   W V /
1361 TACCACCGGT ATGCCGTATC GCCCGCAACG GTGCGCACTT GCTGCTCGTG CTGACAGGCA AGCCGCATGT AACCACTAGG
1441 ACGTCCAATC TTCCGCTTGC CCTCCATACG GCCATACGCG CCTGCGGCCT CTCACCCGCC TCTGCCCCCG CCCATTGCA
1521 TCCCGCTGCG CTCTTCCGTC CAGTGGGCTC GGAGTATGTG CGTCTGGCCA CCATCTCGGA CGCGCGGCGAG CTGTACTGT
153                                     / G S   E Y V   R L A T   I S D   A R Q   L Y L S
1601 CCCAGTGCGA TCGCGCCAAC AGCCAGAACA CACTGCTGTT GCTGTACGCG CCCTGGTGCC CGCACTGCAG GGAGATGGAG
172   Q C D   R A N S Q N T   L L V   L Y A   P W C P   H C R   E M E
1681 GACGAGGTGG GGAGCGCAA GTGGGAGCGG GGGGAGAGGA GGGAGGGACA GGGGAGGGCA GGGCGGGTGG TCATGTGGGG
198  D E /
1761 GTGGTAGCTT GGTGCCTGTA AGGGATGGCG TGCGGAGTGC GTCGCGTTGC GACGTTGTGT TGGCGGACAG GACCTACCGG
1841 ACGTCTCTG ACGGCGCTCA GGTCTAGTTC TTATTCAGCA TGTGTGCACT ACTTGGCCAA TCATCTTGT TATTGTCCCA
1921 TCATCTGTG CTTGCTCTAG CTGGAGCGGC TGGCGGAGGG GCTGTGCGAC GAGCAGAACG TGGTGTGGT GGGCGTGAAC
200                                     /L E R L   A E G   L S H   E Q N V   R V V   A V N

```

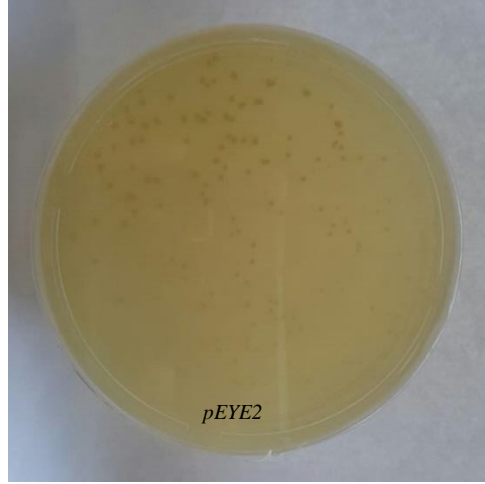
```

2001 GGTGACTCAC CCGAGGGCCG CATCTTCTCA CGCGAGGTGA GCAGGGGCAT GTGGGAGTCT GATGCGGCTG AGGGTTGCAA
220 G D S P E G R I F S R E /
2081 AGACAGGAGT TACCGTGCTT GGATTCAAAAG TTGAACACAA TCTGCCAGCG CCCCCTAAAC CACTGTGTTT TCCTCACCCC
2161 CCACTCACAT GCCCAGGTGC TGGGCGTTGC GTACTACCCC TCCATAATTT CCTTCCCGGA GCCTCCCGC ACCTTCTACA
232 / V L G V A Y Y P S I I S P F E H S R T F Y K
2241 AGTACAAGGG CCGCCAGCGC GACGCGGAGT CGCTCCTGCG CTTTCTCAAT ATGACCTGCT GCAGCCGGGC GCGGGAGGAC
254 Y K G R Q R D A E S L L R F L N M T C C S R A R E D
2321 CAGATGTGGA CGCTGCGGCC GCGGGCACA CGCTCGACTG TGGCGGCATT GCCAGGCGCG AGCACGGTGG GTGGTATTAA
280 Q M W T L R P A G T R S T V A A L P G A S T /
2401 TCAAGGAAGT GGTAGACGGT AGACCATCTT GGGTGGTGGG GCCGGGGCAC ACGAGCGAGT GGGCGGCTGC CCGGCATGGC
2481 AGACACACCT CTGAGCACCT CTTGGACTGT CTGGAGTTTG AGCATGACCG GTACCTTCCT CCGCGCAGTT CCTGCCAATC
302 / F L P I
2561 GGCATGTGCG CCAGCGCTCT GCGGCTGGC GTTGGCTCCG CCGCGCTGGC ACTGGTGGGC ATTGCGGCTT CCTGCGCAGC
306 G M S P S A L A A G V G S A A L A L V G I A A S C A R
2641 CCGCGCCCCA TGCAGTCAGA TGTGGTGGCT GAGCTGGACA GCAGTGTGGG CCGCATGCTG GGGGCTCTGC TCGCGCGCT
333 G A P C S Q M W W L S W T A V W A A C W G C C C A R W
2721 GGCACACGC GTGGCGCTGG TGCTGGGCT GGGCCGCAAC GAGGAGCAC AGGCCGAGC CGCAGTGGTC GCAGCCGTGC
360 A H A W R W C W G W A A T R R H R P Q P Q W S Q P C
2801 CTGCCGCCCC AGCGCGGAT GCTACCGCCG CTTCGGTGCC GCGCGCGCCC GCAGAGGCTG ACGCTGCGCC GGTGCCGGTC
386 L P P Q R R M L P P L R C R R R P Q R L T L R R C R S
2881 GATGCCGAG AGGTGCGCA GGTGTCAGCC GCGCCACAG CACTGGCACC CCGCGCAGCT GCTGAGCGC CTATCCCGGT
413 M P Q R L R R C Q P R P Q H W H P R Q L L R R L S R W
2961 GGTGGTGCAG GAGGTGCTTG CTCTGCGGC GCCCGCGCCT GTGGACGCCG CTGCGCCCGC CGCCGCGCGC CCCGTTCAA
440 W S P R C L L L R R P R L W T P L R P P P R R P L Q
3041 CAGCGAATGG CAACGGCGTG GGGACGACAG CAGCGACCGC ACCTGCTGCT GCTGGGACGG CTGCTGCTGC GCGCGCGCGC
466 Q R M A T A W G R Q Q R P H L L L L G R L L L R R R R
3121 GCAGTGTGAG CAGCCACTGC GGTGCGCGC GAGCTGACAG CTGAAGAGCG CATGCGGCTG ACGCGGCTGA CCGATGACGA
493 Q C Q Q P L R L R A S Stop
3201 GTTAATCGCG CTGGTGAACA GTGATCCAGA TCTGGACAAG GTGCTGTGCG GGCTGCTGGG AGACAAGTGA TGGAGGGGGC
3281 GGATGATGAT GGGCCCTGGG TAGGATGGGC TGAAGCGAT CGTgGGATCG GCGCGAGAGC GCTGCGCGGT ATGTGATGTA
3361 GATGCTGGGC GAACAACGTC CCGCCAAGG TGGTTATGGT GTGTGCGCTG CCGGACCATA AACACAGAGG CCGCATCAA
3441 GCTTTCAAAT GGCAGGGGGA TGTAAGTGT ATGGGAGGGG AGGGAGCTAC AGTACGCTAC TGCACCGCAC AGAATCGGGT
3521 GCTGCAATGA TTCTTGTCGG GACGCCGAGG TTGATGTGTG GCACAACAGG AGGCTTTGCA ATACAATAA ACCTCACGTC
3681 GTTTGTGTGT TCCGATGCCG TAATTTTCGC GGTGTGAGCT TCGATGCGTG TTCATAACCG TGTAATCAT CCTGCGAACA
3761 AAGTTGCTCA AACTGTGCTA GACCGCGCGC TCTGGACTAG CTAACAACAA GCTTCTAACA AGACAACAT GAGATGTCAC
3841 TCTCAAGCGC TCTCTTGCTG TTGGCCCTAT CCGCGCTACC TGCAGCTCTG ACAGAAAGCT GTAGAGCCAT ACTCAATGCA
3921 ACTGTGCCAG GAAACAACAG CCTTTGGGTC GATGATAAGC TGTCAAACAT CAGGAGCTCC GGAAGCTAAA ATGGA

```

Şekil 4. 4. pARG plazmidi içerisinde klonlanan *EYE2* geni dizisi.

Rekombinant plazmid, kimyasal olarak kompetent hale getirilen *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α hücrelerine geleneksel sıcaklık şoku yöntemi ile transfer edilmiş ve seçici olarak ampisilin (Amp) direnç geni kullanılmıştır. Transformantlar 100 μ g/ml Amp içeren katı LB (Luria Broth) besiyerinde 37°C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. *pEYE2* plazmidinin *E. coli* DH5 α kompetent hücresine transferi sonrası katı besi ortamında büyüyen kolonilerin yer aldığı örnek plate görüntüsü.

Bakteri hücrelerinden plazmid DNA izolasyonu aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirilmiş ve elde edilen plazmid DNA'ları ilk olarak %1'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra restriksiyonel enzim kesimi ile lineer hale getirilerek analiz edilmiştir (Çizelge 4.6).

4.5.1.2. *pEYE2* plazmid DNA'sının izolasyonu

1. Bakteri pelleti üzerine 250 μ l buzda soğutulmuş solüsyon (Soln. I) (100 mM Tris pH:8.0, 10mM EDTA, RNase) eklenmiş ve alt-üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
2. Örnekler 250 μ l taze hazırlanmış olan Soln. II (200 mM NaOH, %1 SDS) eklenerek, tüpler birkaç kez alt-üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
3. Örnekler 400 μ l buz üzerinde soğutulmuş Soln. III (3M KoAc pH:5,6) eklenerek, tüpler birkaç kez alt-üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
4. Örnekler 13000 rpm'de 20 dak. santrifüj edilmiş ve üst faz yeni ependorf tüplerine transfer edilmiştir.
5. Örnekler 600 μ l isopropanol eklenmiş ve tüpler alt üst edilerek örneğin iyice karışması sağlanmıştır.

6. Örnekler 13000 rpm'de 30 dak. santrifüj edilmiş ve üst faz dikkatlice uzaklaştırılmıştır (DNA pelletedir).
7. Tüplere 500 µl %70'lik etanol eklenerek örnekler 13000 rpm'de 1 dak. santrifüjlenmiştir.
8. Süpernatant tamamen uzaklaştırıldıktan sonra tüpler kapakları açık olarak oda sıcaklığında tamamen kurumaları için 10-15 dak. bekletilmiştir.
9. Nükleik asit pelleti üzerine 75 µl TE tamponu (pH: 8.0) eklenmiş, ve örnekler vortekslenerek DNA çözülmüştür. Elde edilen plazmid DNA'ları restriksiyonel enzim kesiminde kullanılmış ya da -20 °C de saklanmıştır.
10. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu da yoğun lineer DNA gereksiniminden ötürü 1000µl içinde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktar (µl)
Plazmid DNA (60 ng/µl)	884
<i>Eco</i> RI restriksiyon enzimi (10u/µl)	6
10X restriksiyon enzim tamponu	100
Distile su	10
Son hacim	1000

Enzim reaksiyonu önerildiği şekilde 37°C'de 60 dak. inkübe edilmiştir. Kesim sonrası yine %1'lik agaroz jelde kontrol ettiğimiz ürünler, Thermo marka "GeneJet PCR Purification Kit" PCR Temizleme kiti ile temizlenerek kullanılmıştır. Söz konusu bu kit 20 kb'ye kadar olan DNA ürünleri için uygun olduğunda seçilmiştir. Bu işlem sonrası elde edilen yaklaşık 5000 ng lineer DNA'nın 1000 ng'ı *C. reinhardtii*'nin transformasyonunda kullanılmıştır.

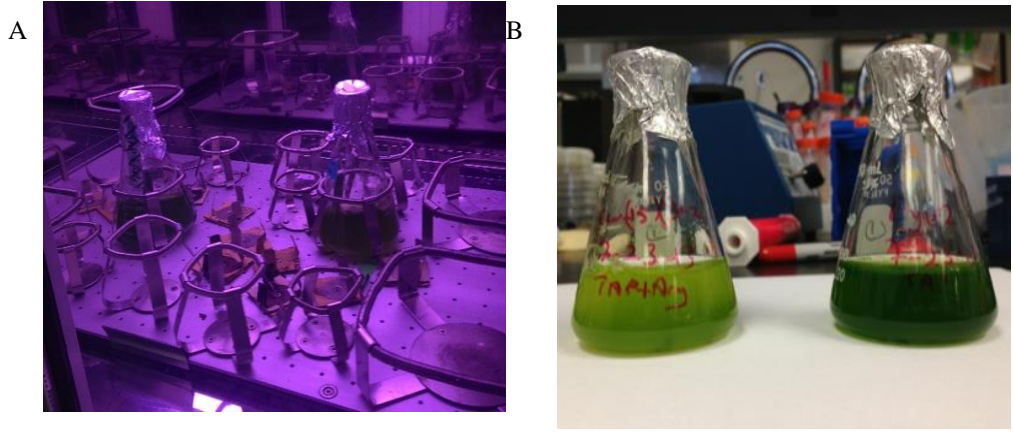
C. reinhardtii'nin plazmid DNA'sı ile transformasyonu, hücrelerin kompetent hale getirilmesi ve elektroporasyon olarak iki basamakta gerçekleştirilmiş takip edilen deneysel prosedür aşağıda verilmiştir.

4.5.1.3. *C. reinhardtii* hücrelerinin kompotent hale getirilmesi

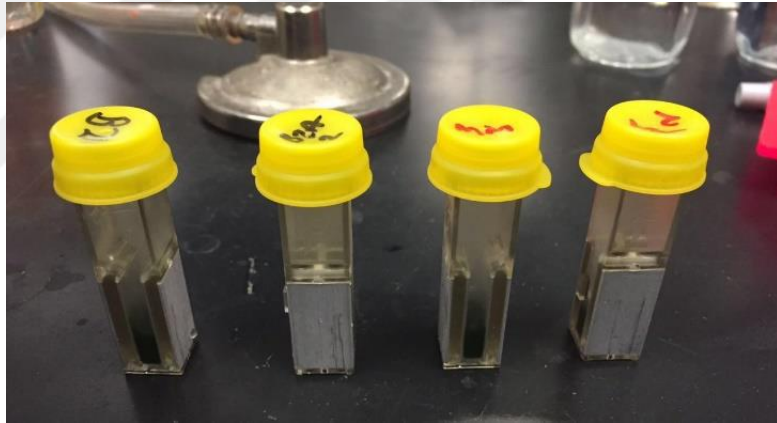
1. 250 ml TAP ya da TAP+Arg besiyeri içerisinde çalkalamalı inkübatörde, sürekli ışık altında ve 25°C kültüre edilen *C. reinhardtii* hücreleri, hücre yoğunluğu $1-5 \times 10^6$ olduğunda kültür 250 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarılmış, 4000 rpm'de 5 dakika (dak.) santrifüjlenmiş ve üst faz atılmıştır (Şekil 4.6).
2. Dipte kalan yeşil renkli hücreler (pellet), TAP+Arg+ 50mM Sukroz (TAS) içinde hücre yoğunluğu $3,5 \times 10^8$ olacak şekilde çözdürüldükten sonra sürekli ışık altında ve 25°C çalkalama olmadan 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüjlenerek üst faz atılmıştır. Dipte kalan -pellet-kompotent hale gelmiş hücreler transformasyon için kullanılmıştır.

4.5.1.4. *Chlamydomonas* hücrelerinin pEYE2 plazmidi ile transformasyonu

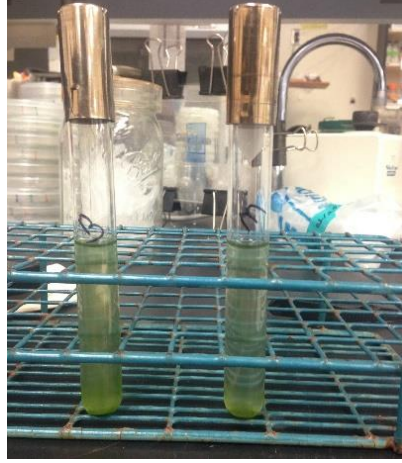
- 1- 300µl elektrokompotent *Chlamydomonas* hücresi üzerine 4.5.1.2'de açıklandığı şekilde lineer hale getirilen ve temizlenen plazmid DNA 20µl - 25µl (≈ 100 ng) eklenerek, kompetent hücre ve lineer DNA'nın karışması sağlanmıştır. Transformasyon öncesi hazırlanan bu örnek buz üzerinde 4mm'lik elektroporasyon kuvvetinin içerisinde 10 dak. inkübe edilmiştir. Ardından elektroporasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.7).
- 2- Elektroporasyon koşulları; kapasitans 25µF, voltaj 0,8 kV, direnç 1000Ω olarak ayarlanmıştır.
- 3- Elektroporasyon sonrası hücreler oda sıcaklığında elektroporator kuvveti içerisinde 10 dak. inkübe edilmiştir. İnkübasyonu takiben hücreler 10 ml TAP içerisine aktarılmış ve 25°C'de çalkalama olmadan ve sürekli ışık altında 12-18 saat inkübe edilmiştir (Şekil 4.8).
- 4- Santrifüj ile üst faz (300µl kadar tüp dibinde kalacak şekilde) uzaklaştırılmıştır.
- 5- Tüp içerisinde kalan transformantlar TAP ya da hücre ve transforme edilen DNA'da kullanılan seçici gene bağlı olarak TAP+Arginin katı besiyerine yayma ekim yapılmıştır (Şekil 4.9).



Şekil 4. 6. *C. reinhardtii* hücrelerinin inkübasyonu. A-Hücreler, kompetent hale gelmesi için çalkalamalı inkübatör içerisinde sürekli ışık altında istenilen yoğunluğa ulaşana kadar inkübe edilmiştir. B- İnkübasyonun çeşitli aşamalarından iki kültür örneğinden açık renkli olan kültür 2 günlük inkübasyon sonrası istenilen yoğunluğa ulaşamamış iken koyu renkli kültür 3 günlük inkübasyondan sonra istenilen yoğunluğu aştığı için kullanılamamıştır. Bu gibi durumları engellemek için hücrelerimiz 2 gün inkübasyon sonrası sık sık thoma lamı ile sayılmıştır. Thoma lamı ile hücre sayımı 4.5.2'de açıklandığı şekilde yapılmıştır.



Şekil 4. 7. *C. reinhardtii* hücreleri transformasyon öncesi elektroporasyon kuvvetlerinin görüntüsü. *C. reinhardtii* hücreleri transformasyon öncesi elektroporasyon kuvvetleri içerisinde oda sıcaklığında 10 dak. inkübe edilmiştir.

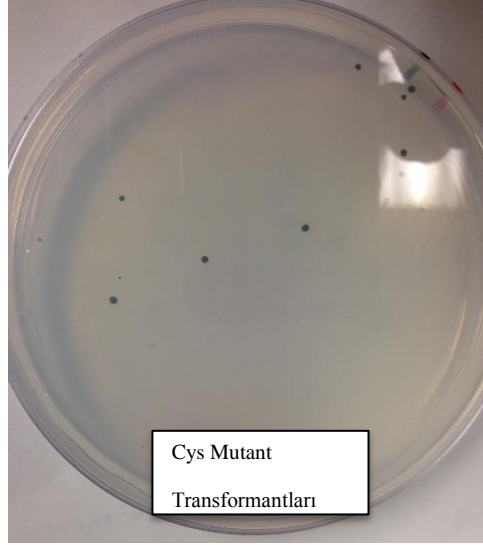


Şekil 4. 8. *C. reinhardtii* hücreleri transformasyon sonrası besiyeri içerisinde ki görüntüsü. *C. reinhardtii* hücreleri transformasyon sonrası sıvı besiyeri içinde sürekli ışık altında 12-18 saat inkübe edilmiştir.

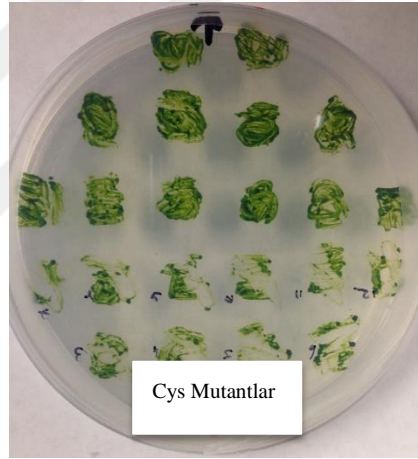


Şekil 4. 9. Transformasyon sonrası ekimi takiben alınan plate görüntüsü *C. reinhardtii* hücreleri transformasyon sonrası inkübe edildikten sonra santrifüjlenmiş ve katı TAP+Arjinin besiyerine ekimi yapılmıştır.

Elektroporasyon sonrası elde edilen koloniler (Şekil 4.10), hücre sayısını arttırmak amaçlı Şekil 4.11'de görüldüğü gibi tek bir agar besiyerine 24 farklı koloni ekimi yapılmış ve besiyerinde 3-6 gün büyümesi beklenmiştir. Şekil 4.11'de ki gibi büyüyen kolonilerde doğru gen bölgesinin olup olmadığı western blot ile mutant EYE2 proteininin ekspresyonunun incelenmesinden önce, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction; PCR) ile de kontrol edilmiştir. Doğruluğu gösterilen suşlarda, mutant EYE2 proteininin ekspresyonunun olup olmadığının belirlenmesi için western blot yapılmıştır.



Şekil 4. 10. Lineer *pEYE2*'nin *eye2-2* suşuna transformasyonu sonrası büyüyen Cys mutant kolonilerin görüntüsü.



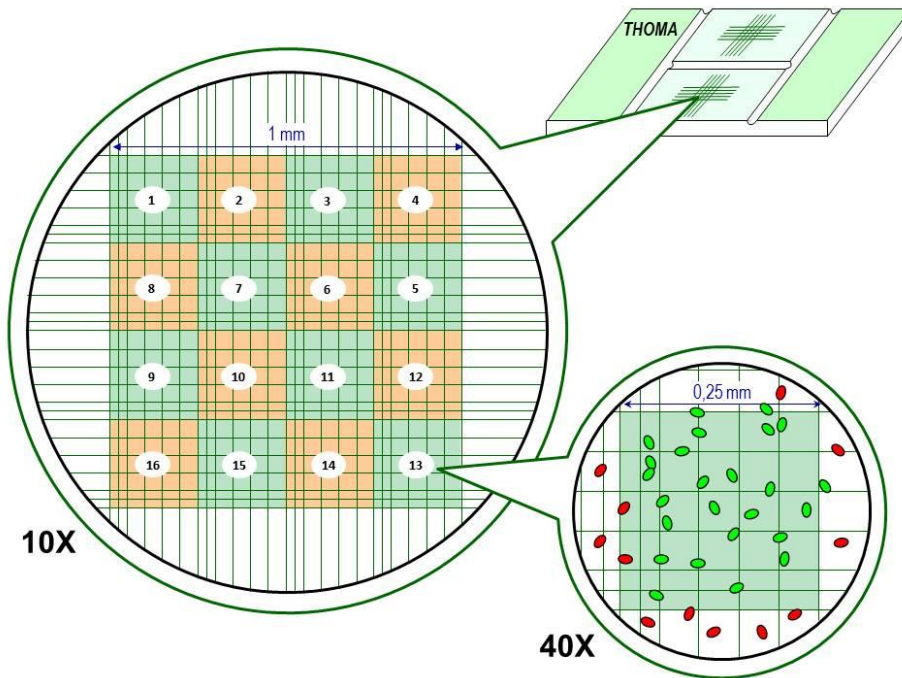
Şekil 4. 11. Transformasyon sonrası büyüyen koloniler, bu koloniler yeni besiyerine düzenli olarak aktarılmıştır.

4.5.2. Thoma lamı ile hücrelerin sayımı

Thoma lamı, *C. reinhardtii* çalışmalarında hücre sayımı için laboratuvarlarda sıkça kullanılan bir metoddur. Thoma lamı ile sayımda amaç mikroskop altında 1mm^3 alanda ki hücrelerin sayımını yaparak 1ml'de hücre sayısında ve dolayısıyla hücre yoğunluğunun sayısal ifadesine ulaşmaktır.

Thoma lamı ile sayım bu çalışmada, denemelerin tamamının başlangıç aşamasında iken aşağıda ki şekilde yapılmıştır.

- 1- Hücreler uygun besiyeri içerisinde kültüre edilmiştir.
- 2- 90 µl hücrenin üzerine 10 µl %1'lik hazırlanmış gluteraldehit çözeltisi eklenmiş ve hücrelerin fikse edilmeleri için 2 dakika beklenmiştir. Bu aşama hücreleri fikse ederek kamçı hareketliliğini azaltmak için yapılmıştır.
- 3- Hücreler hazır olduğunda thoma lamı üzerine 10 µl örnek bırakılmış ve lamel kapatılmıştır. 10X ve 40 X objektifler kullanılarak hücreler sayılmıştır.
- 4- Thoma lamı içerisinde tam ortaya gelecek şekilde 16 adet orta boy birbiriyile eşit kare bulunmaktadır hücre sayımında bu kareler Şekil 4.12'de görüldüğü gibi 0,25mm genişliğindedir. 16 karenin içerisinde bulunan hücrelerin tamamı, karenin dış çizgilerin üzerinde bulunan hücreler dahil edilmeden 40X objektif kullanılarak dikkatlice sayılmıştır.
- 5- Elde edilen hücre sayısı (N) 10^4 ile çarpılarak ml'de ki toplam hücre sayısına ulaşılmıştır ($N \times 10^4$ hücre/ml).



Şekil 4. 12. Thoma lamı örnek görüntüsü (University of the Basque Country, 2017).

4.5.3. Transformasyon sonrası seçici besi ortamında büyüeyebilen hücrelerdeki rekombinant plazmidlerin PCR ile doğrulanması

Transformasyon sonrası büyüeyen koloniler sıvı TAP besiyerinde kültüre edilmiş ve büyüeyen transformantlardan geriye dönük plazmid DNA izolasyonu ve transforme edilen gen ürününün PCR ile çoğaltılması aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

4.5.3.1. C. reinhardtii hücrelerinden hızlı DNA izolasyonu

- 1- Sıvı besiyerinde kültüre edilen hücreler 13000 rpm'de 1 dk. santrifüjlenmiş üst faz uzaklaştırılmıştır.
- 2- Pellet 50 µl, 10 mM EDTA içerisinde çözülmüş 10 sn. vortekslenildikten sonra 98-100 °C'de 10 dk. inkübe edilmiştir.
- 3- İnkübasyon sonrası örnek hızlıca buz üzerine alınmış ve 1 dk. buz üzerinde soğuması sağlanmıştır.
- 4- Buz üzerinde inkübasyondan sonra örnek 10 sn. vortekslenmiş ve 13000 rpm'de 1 dk. santrifüjün ardından üst faz PCR için kalıp DNA olarak kullanılmıştır.

PCR reaksiyonunda kullanılan primerlerin listesi, reaksiyon bileşenleri ve reaksiyon koşulları sırası ile Çizelge 4.7, Çizelge 4.8 ve Çizelge 4.9'da verilmiştir.

PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiş ve beklenen büyüklükte (700bp) bandların eldesinin ardından transformantın doğruluğu restriksiyonel enzim kesimi ile de doğrulanmıştır. Restriksiyonel kesim için *Eco72I* restriksiyon enzimi kullanılmış ve reaksiyon koşulları Çizelge 4.10'da verilmiştir. Reaksiyon önerildiği şekilde 37°C'de 60 dak. inkübe edilmiştir. Kesim sonrası ürünler %1'lik agaroz jelde kontrol edilmiştir.

Çizelge 4. 7. Kullanılan primerlerin dizisi.

Primerin adı	Primerin dizisi (5' – 3')
F1	AGATCTCTCACCGCCGTCGCTTGC
R1	GCAGCAGTTCAAAGAGAATGG

Çizelge 4. 8. PCR reaksiyonu bileşenleri ve konsantrasyonları.

Reaksiyon Bileşenleri	Konsantrasyon	Final Konsantrasyon	Miktar (µl)
Taq Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2,0 mM	1,5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Forward primeri	10 µM	0,4 µM	1
Reverse primeri	10 µM	0,4 µM	1
Betaine	5 M	1 M	5
Taq Polimeraz	5 U/ µl	2,0 U/ µl	0,4
dH ₂ O	-	-	12,1
DNA	-	50-100 ng	1,0
Toplam Hacim			25,0

Çizelge 4. 9. PCR reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Koşulları	Sıcaklık - Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98 °C – 2 dk.	-
Denatürasyon	98 °C - 30 sn.	30
Bağlanma	55 °C - 30 sn.	
Polimerizasyon	72 °C - 1 dk.	
Son Uzama	72 °C - 3 dk.	-

Çizelge 4. 10. Restriksiyon enzim kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktarları (µl)
PCR ürünü DNA	10
<i>Eco</i> 72I restriksiyon enzimi (10 µl)	0,5
10X restriksiyon enzim tamponu	1,5
Distile su	3
Son hacim	15

4.5.4. Mutant hücrelerde EYE2 protein ekspresyonunun belirlenmesi

4.5.4.1 Hücrelerden protein eldesi

Total protein eldesinin gerçekleştirilmesi için;

Katı TAP besiyerinde;

- 1- 25°C'de inkübe edilen *C. reinhardtii* hücreleri öze ile toplanmış ve 500 µl sıvı TAP besiyeri içeren ependorf tüpüne alınmıştır.
- 2- 7000 rpm'de 5 dak. santrifüjlenerek toplanan hücrelere 200 µl 4X Laemmli yükleme tamponu içinde çözündürülmüştür (Laemmli, 1970).
- 3- Örnekler, 95°C'de 5 dk. inkübe edilmiş, hemen kullanılmış ya da -20 °C'de saklanmıştır.

Sıvı TAP besiyerinden yapılan kültürlerde;

- 1- Hücreler, 2 ml TAP içinde 1-2 gün süreyle 25°C'de inkübe edilmiştir.
- 2- Belirlenen zaman aralığında tamamı tüpe transfer edilen hücreler santrifüjlenmiş elde edilen pellet 4X Laemmli buffer içinde çözündürülmüştür.
- 3- Örnekler, 95 °C'de 5 dk. inkübe edilmiş, hemen kullanılmış ya da -20 °C'de saklanmıştır.

4.5.4.2 SDS-PAGE

Total protein eldesinin ardından EYE2 protein ekspresyonunun incelenmesi için western blot yöntemi kullanılmıştır. Denatüre edici Page jeli olarak da bilinen SDS-PAGE sistemine adını veren, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) anyonik bir deterjandır ve proteinleri alt birimlerine ayırır, aynı zamanda negatif (-) yük taşıdığı için peptidlere bağlanarak karışık elektriksel yüke sahip olan peptidlerin tamamının negatif yükle yüklenmesini dolayısıyla jel içerisinde sadece moleküler ağırlıklarına göre ayrışımını sağlamaktadır. Yöntem aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

1. Ayırma jeli %10'luk hazırlanmış ve jel düzeneğin 2/3'ünü dolduracak şekilde düzenek içerisine dökülmüştür üzerine hızlıca izopropanol eklemiş ve 1 saat inkübe edilmiştir (Çizelge 4.11).

2. İzopropanol dökülmüş ve alkol iyice uzaklaştırılmıştır. Yükleme jeli %4,5'lük hazırlanarak düzeneğin kalan kısmı doldurulmuş ve 1 saat donana kadar inkübe edilmiştir (Çizelge 4.11).
3. Eğer gün içerisinde kullanılmayacaksa jellerin, kurumasını engelleyecek şekilde jel düzeneği nemli kağıt ile sarılıp üzerine streç film kaplanmış ve 4°C'de saklanmıştır.
4. Jel dökme düzeneğinden çıkartılan jel, örnek yüklenmesi için yine özel düzeneği kullanılarak tankın içerisine yerleştirilmiş ve protein moleküler ağırlık standardı ve örnekler sırası ile yüklenmiştir.

Çizelge 4. 11. SDS-PAGE jeli hazırlamak için kullanılan yükleme ve ayırma jeli kompozisyonları.

SDS-PAGE jeli Bileşenleri	Yükleme Jeli (%4,5)	Ayırma Jeli (%10)
%30 Akrilamid bis-akrilamid	2,65 ml	450 µl
1 M Tris (pH;8,8)	3 ml	-
0,5 M Tris (pH;6,8)	-	1,56 ml
%20 SDS	40 µl	15 µl
%10 Amonyum persülfat (APS)	40 µl	30 µl
N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin (TEMED)	4,0 µl	5,0 µl
H ₂ O	2,16 ml	640 µl
Toplam Hacim	7,884 ml	2,700 ml

4.5.4.3. Western Blot

SDS-PAGE jelinde molekül ağırlıklarına göre jel üzerinde ayrışmaları sağlanan proteinler standart western blot teknikleri kullanılarak PVDF (Polyvinylidene difluoride) membran üzerine transfer edilmiştir.

Uygulanan Western blot yöntemi aşağıdaki basamakları içermektedir;

- 1- Örneklerin jel üzerinde yürümesi tamamlanmasına yakın blotlama için kullanılacak membran uygun boyutlarda kesilerek hazırlanmıştır.
- 2- Membran, PVDF kullanıldığında 1 dak. MeOH'dan geçirilmiş ve 3 kere distile su ile yıkanıp transfer tamponu içinde inkübasyona bırakılmıştır.

- 3- Jelin yürümesi bitince, jelin üst kısmı (stacking) kesilerek uzaklaştırılmış ve jel transfer tamponu içerisine alınarak 10 dak. inkübe edilmiştir.
- 4- Tanka transfer buffer eklenerek transfer düzeneği hazırlanmıştır.
- 5- Filtre kağıtları ve süngerler transfer tamponu ile ıslatılmış, tabakalar arasında hava boşluğu kalmamasına dikkat edilmiştir.
- 6- 500 mA'de 1,5 saat transfer gerçekleştirilmiştir.
- 7- Transfer sonrası membran dikkatlice kalem ile işaretlenmiş ve daha sonra bloklama tamponu içersine alınarak, 1 saat inkübe edilmiştir.
- 8- İnkübasyon sonrası bloklama tamponu uzaklaştırılmış ve primer antikor (1°AB) çözeltisi eklenerek (%5 NFDm + 1:500 1°AB*) gece boyu 4°C'de inkübe edilmiştir.
- 9- İnkübasyon sonrası 1°AB çözeltisi uzaklaştırılarak membran 3X10 dak 1XTBS-T tamponu ile yıkanmıştır.
- 10- Sekonder antikor (2°AB) çözeltisi hazırlanmıştır (ışık duyarlı olduğu için son anda hazırlanmıştır).
- 11- Membran 2°AB çözeltisine transfer edilerek 2 saat oda sıcaklığında (Room temperature; RT) inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrası membran 1XTBS-T ile yıkanmış ve boyanarak görüntülenmiştir. Kemilüminesans boyamada substrat olarak Thermo marka Femto ve Pico kitler 7:3 oranında karıştırılarak kullanılmıştır (Thermo Femto kit:34095, Thermo Pico kit: 34080).
- 12- Transfer sonrası membran gerekli görüldüğünde Ponceau S boyası ile boyanarak transfer kontrol edilmiştir. Boyanması gereken koşullarda, membran bloklama tamponu öncesi Ponceau S boyama çözeltisinde 5 dak. inkübe edilmiş sonrasında saf su ile yıkanmıştır.
- 13- Boyama sonrası membran dikkatlice yıkanarak wester blot basamakları bloklama aşamasından itibaren aynen devam etmiştir.

Prob çözeltileri ilgilenilen proteine bağlı olarak aşağıda ki konsantrasyonlarda bloklama tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

1° Antikor Çözeltisi

EYE2 için rabbit polyclonal anti-EYE2 (1:1000),

Tubulin proteini için mouse monoclonal anti-tubulin (clone B-5-1-2, 1:10000)
(Pozitif kontrol olarak kullanıldı)

ChR1 için rabbit polyclonal anti-ChR1 (1:5000)

2° AB Antikor Çözeltisi

EYE2 ve ChRI için antiRabbit (1:5000)

Tubulin için antiMouse (1:5000)

Western blot sonrası elde edilen protein badlarından yola çıkılarak hedef proteinin ekspresyon seviyesi hakkında fikir sahibi olmak SDS-PAGE jeline eşit miktarda toplam protein yüklenmesini gerektirir. Jele eşit miktarda protein yüklenmesi amacıyla SDS-PAGE öncesinde örneklerdeki toplam protein miktarları Bradford yöntemi ile belirlenmiştir (Bradford, 1976). Bradford yöntemi toplan protein miktarını belirlenmesi için sıkça tercih edilen bir yöntemdir. Temeli Coomasiie mavisinin protein ile bağlanarak 465-595nm dalga boyunda oluşturduğu absorbansın ölçümüne dayanır. Bu yöntemde **B**ovine **S**erum **A**lbumin (BSA) kullanılarak oluşturulan standart grafiğe gerek duyulmaktadır. Oluşturulan standart grafikten sonra saflaştırılan proteininin ölçümleri yapılarak elde edilen absorbans grafik üzerinde kontrol edilmiş ve protein miktarı belirlenmiştir.

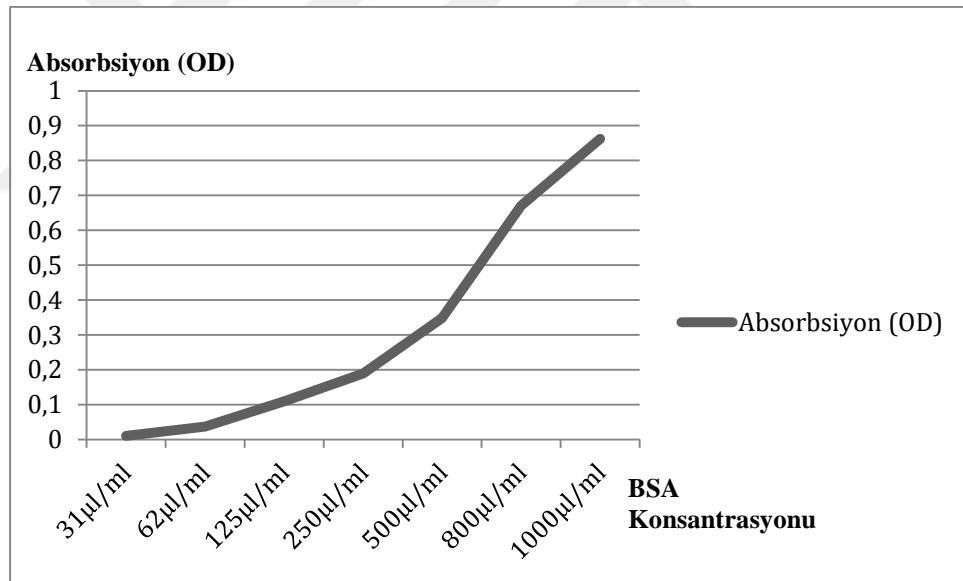
Bradford yöntemi ile protein miktarının belirlenmesi aşağıda ki şekilde yapılmıştır.

- 1- Standart grafik oluşturmak için BSA seyreltilerek çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.
- 2- Spektroskopik ölçük almak için Cytoskeleton marka “Advanced Protein Assay Reagent” Protein Ölçüm Belirteci kullanılmıştır.
- 3- Belirteç firmanın önerdiği doğrultuda 1X konsantrasyonda seyreltilmiş ve 10µl örnek 1ml 1X belirtecin içerisine eklenmiştir.
- 4- Spektrometrede ilk olarak belirteç tek olarak okutulmuş ardından standart grafik oluşturmak için çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan BSA’ları içeren

örnekler spektro küvetine alınmış ve herbiri ayrı ayrı 590nm’de okutulmuş ve absorpsiyon değişimleri (O.D.) kaydedilmiştir.

- 5- Standart grafik, Şekil 4.13’de verilmiştir.
- 6- Protein örnekleri de 10µl örnek 1ml belirteç olacak şekilde hazırlanmış ve spektro küvetlerine alınarak 590nm’de ölçümleri yapılmıştır.
- 7- Elde edilen O.D. değerleri grafik üzerinde yerleştirilerek toplam protein miktarı hesaplanmıştır.
- 8- Grafiki le aynı anda yapılan örnek ölçümlerinde O.D değeri 0,146 olan örnek için protein miktarının 175µl/ml olarak grafik üzerinde hesaplanmıştır. Toplam protein miktarının belirlenmesini gerektiren tüm denemelerde standart grafik oluşturmak için yapılan ölçümler yenilenmiştir.

Çizelge 4. 12. Bradford yöntemi ile elde edilen standart grafik üzerinde BSA’nın konsantrasyonuna bağlı olarak O.D. değişimi.



Çalışmamızda ihtiyaç duyulması durumunda protein miktarının kalitatif analizine olanak verecek şekilde jel ya da membran üzerinde ‘Coomassie brilliant mavi’ boyama ile protein miktarı kontrol edilmiştir.

Coomassie Boyaması aşağıda ki şekilde yapılmıştır.

- 1- Jel küçük bir boyama kabına alınmıştır.
- 2- Coomassie çözeltisi eklenmiş ve 90-120 dak. karıştırıcının üzerinde inkübe edilmiştir.

- 3- İnkübasyon sonrası boyama çözeltilisi dökülerek yıkama çözeltilisi eklenip tek bir kere hızlıca jelin yıkanması sağlanmıştır.
- 4- Örnek üzerine tekrar jel yıkama çözeltilisi eklenip gece boyu 4°C’de karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir.
- 5- İnkübasyon sonrası örnekler saf su ile yıkanarak proteinler incelenmiştir.

4.5.5. *eye2/pht* ikili mutant suşların oluşturulması ve oluşturulan hücrelerin taranması

Bu aşamada amaçlanan, yurt dışı danışmanımız Dr. Dieckmann’ın aracılığı ile edinmiş olduğumuz *Chlamydomonas phototropin* mutant suş ile *eye2-2* suşunu mating ile birleştirerek her iki proteinden de mutant olan ikili mutant suş elde etmeye çalışmaktır.

Eşleşme sonucu, elde edilen koloniler PCR ile aşağıda ki şekilde taranmış ve her iki gen bölgesinin de negatif olduğu suş taranmıştır.

4.5.5.1. *eye2-2* ve *pht* suşlarını eşleştirme ve PCR çalışması

1. *eye2-2* ve *pht* suşları ayrı ayrı 250 ml uygun besiyeri içerisinde sürekli ışık altında kültüre edilmiştir.
2. Hücre yoğunlukları $2,5 \times 10^6$ /ml – $3,5 \times 10^6$ /ml değerine ulaştığında hücreler santrifüjlenerek (3000 rpm, 5 dk.) toplanmış ve ardından TAP-N besiyeri içerisinde 24 saat sürekli ışık altında inkübasyona devam edilmiştir.
3. İnkübasyon sonrası hücreler santrifüj ile çöktürülmüş ve 150 ml TAP-N besiyerlerinde ayrı ayrı çözülmüştür. Hücreler son aşama olarak 1 L’lik erlen içerisinde karıştırılmış ve 20-50 rpm’de hafifçe karıştırarak 2 saat eşleşmelerinin sağlanması amaçlı inkübe edilmiştir.
4. Eşleşmenin ardından elde edilen koloniler gruplar halinde denenmiş, EYE2 ve PHT proteinini kodlayan genlerin bulunmadığı ikili mutant suş PCR ile aranmıştır.
5. PCR reaksiyonunda her iki gen bölgesinin negatif olduğu mutant suşun bulunabilmesi durumunda PCR reaksiyonunun doğruluğundan emin olmak

için internal kontrol olarak *C. reinhardtii* 18S Ribozomal RNA gen bölgesi kullanılmıştır.

6. Her üç gen bölgesine ait primerler aynı tüpte olacak şekilde PCR reaksiyonu kurulmuştur (Tablo 4.13).
7. PCR reaksiyon koşulları; 94°C-3 dak.; 94°C-30 sn; 55°C-30 sn; 72°C-1 dak. (40 döngü); 72°C-1 dak.'dır. PCR reaksiyon ürünleri %2'lik agaroz jelde görüntülenmiştir. PCR bileşenleri Tablo 4.14'de verilmiştir.

Çizelge 4. 13. Kullanılan primerlerin dizileri.

Primerin adı	Primerin dizisi (5' – 3')	Ürün (bp)
Phot Forward	ATACGACCAAGGACCATGCA	420 bp
Phot Reverse	CGTTAGCAAATGGTGGGAGG	
EYE2 Forward	GCGAGACACTATGGGACGTA	210 bp
EYE2 Reverse	CAGAAACTCACCCACATGC	
18SR Forward	AACCTGGTTGATCCTGCCAG	500 bp
18SR Reverse	CACCAGACTTGCCCTCCA	

Çizelge 4. 14. PCR reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları.

Reaksiyon Bileşenleri	Stok Konsantrasyonu	Çalışma Konsantrasyonu	Miktar (µl)
Taq Buffer	10X	1X	2,5
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2,0
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0,5
Phot-F	10 µM	0,4 µM	1,0
Phot-R	10 µM	0,4 µM	1,0
EYE2-F	10 µM	0,4 µM	1,0
EYE2-R	10 µM	0,4 µM	1,0
18SrRNA-F	10 µM	0,28 µM	0,7
18SrRNA-R	10 µM	0,28 µM	0,7
Betaine	5 M	1 M	5,0
Taq Polimeraz	5 U/µl	2 U/µl	0,4
DNA	-	50-100 ng	1,0
dH ₂ O	-	-	8,2
Toplam Hacim			25,0

5. BULGULAR

5.1. Mutant *eye2* Geninin Hazırlanması ve *EYE2* Geni Bulunmayan *eye2-2* (*Arg 7*) Suşuna Transformasyonu

Bu aşama için yurt dışı proje ortağımız Prof. Dr. Carol Dieckmann'ın laboratuvarından temin edilen *eye2* geninin klonlandığı pARG 7-8 plazmidi kullanılmıştır. pARG 7-8 plazmidi Arjinin (Arginine-ARG) besin belirtecini içermekte ve bu özelliği ile aktarıldığı hücrelerin seçilimini sağlamaktadır. *Chlamydomonas eye2-2* suşu ise *EYE2* genini bulundurmadığı gibi *ARG* genini de bulundurmaz ve kültürü için TAP besiyerine ilave olarak 0,2mg/ml arjinin ilavesini gerektirir.

Bu özelliklerden yola çıkarak planlanan çalışmamızda, pARG7-8 plazmidine *ARG* geninin hemen arkasına klonlanan mutant *eye2* geni elektroporasyon ile *Chlamydomonas eye2-2* suşunun genomik DNA'sına aktarılmıştır.

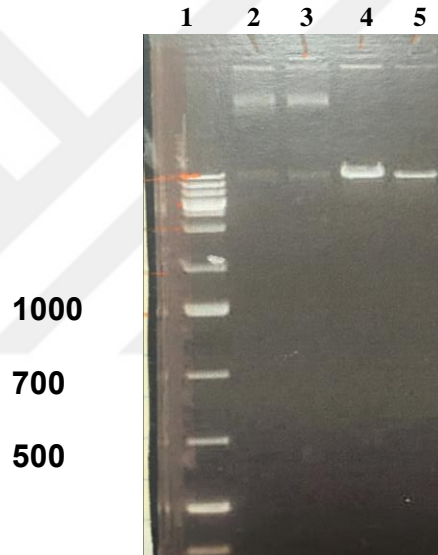
Elektroporasyonun başarılı olması durumunda *ARG* geninin ekspresyonu gerçekleşmekte ve dolayısıyla arjinin bulunmayan TAP besiyerinde büyüyen söz konusu bu transformantlarda teorik olarak *ARG* geninin peşi sıra klonlanan *EYE2* geninin de ekspresyonunun gerçekleşmesi de beklenmektedir.

Ancak gerek bu aşamada gerekse daha önce bu mantıkla yapılan klonlama ve transformasyon çalışmalarında her zaman tüm transformantlarda hedef proteinin ekspresyonu gözlemlenememiştir. Bu nedenle transformasyon sonrası elde edilen koloniler benzer çalışmalarda western blot ve/veya immunofloresans mikroskopi ile protein ekspresyonunun gözlemlenmesi için incelenmiştir (Mittelmeier et al., 2015)

5.2. pEYE2 Rekombinant Plazmidinin Doğrulanması

pEYE2 rekombiant plazmidi hazırlandıktan sonra saflaştırılmış, 4.5.1.2'de açıklandığı şekilde plazmid DNA izolasyonu yapılmış ve transformasyonda kullanılmak üzere *EcoRI* enzim kesimi yapılmıştır.

Çalışmamızdaki peşpeşe yapılan başarısız transferler sonrası, *Chlamydomonas* hücrelerine transfer edilecek lineer DNA'nın konsantrasyonu 30-60ng/μl ve transfer edilecek toplam DNA miktarı da 400-600ng aralığında olmak üzere optimize edilmiştir. Bu yoğunlukta lineer DNA elde etmek için aşağıda açıklanan plazmid DNA izolasyonu 30 ml kültür için 2ml'lik 14 ependorf tüpünde eş zamanlı olarak yapılmış, elde edilen DNA'lar tek tüpte birleştirilerek restriksiyon enzim kesimi için kullanılmıştır. Çalışmamızda büyük miktarda plazmid DNA izolasyonuna imkan veren özel kitler de kullanılmıştır ancak sonucun aynı olması nedeniyle kit kullanmadan standart plazmid DNA izolasyonu ile deneylere devam edilmiştir. Plazmid DNA izolasyonu sonuçları Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5. 1. pEYE2 plazmidinin saflaştırılma sonrası enzim ile kesim öncesi ve sonrasına ait agaroz jel görüntüsü (%1 Agaroz jel). Uygulamalar sırasıyla 1; DNA moleküler ağırlık standardı, 2-3; kesilmemiş pEYE2 plazmid DNA'ları, 4-5. *EcoRI* enzim kesimi yapılmış pEYE2 plazmid DNA'ları.

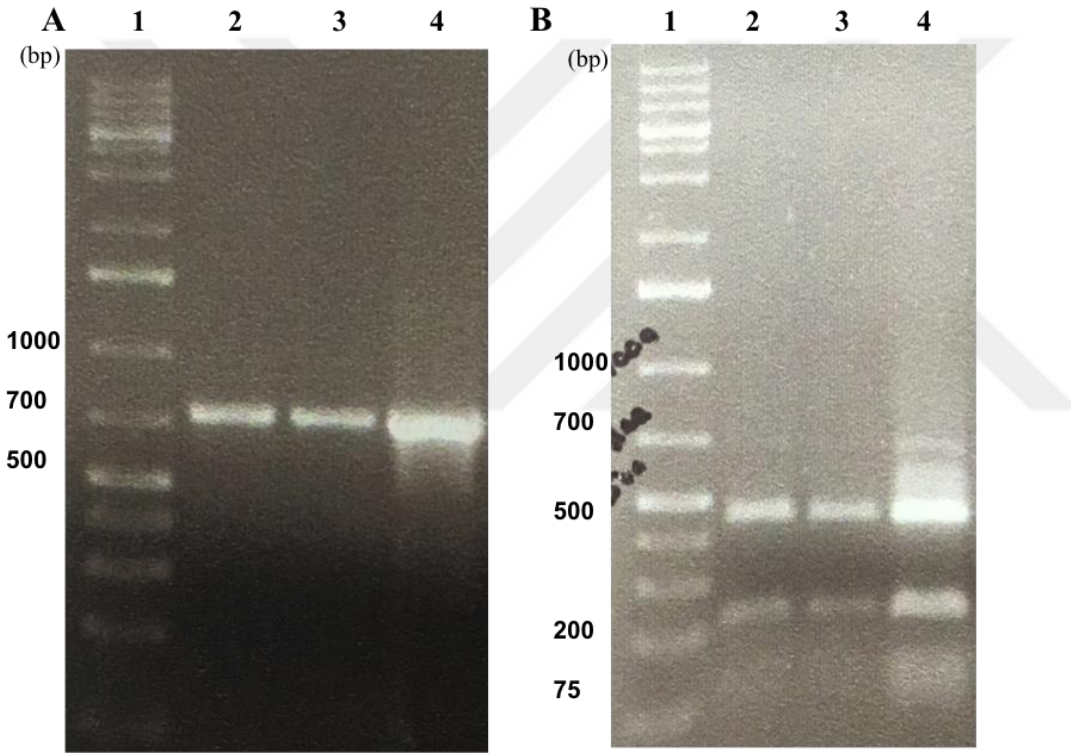
Lineer pEYE2 plazmidi 4.4.1.3 ve devamında anlatıldığı şekilde *Chlamydomonas* hücrelerine transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası büyüyen koloniler PCR ile doğru gen bölgesini içerip içermediklerinin incelenmesi için kontrol edilmiştir.

5.3. Transformantların PCR ile Doğrulanması

pEYE2 plazmidi lineer hale getirildikten sonra *Chlamydomonas eye2-2* suşuna aktarılmıştır. Transformasyon sonrası elde edilen koloniler TAP

besiyerinde kültüre edilmiş ve transformantların pEYE2 plazmidini alıp almadıklarının doğrulanması için PCR yapılmıştır.

PCR ile çoğaltılan bölge pARG plazmidine klonlanan *EYE2* gen bölgesini de içerecek şekilde tasarlanmış olup, böylelikle *EYE2* gen bölgesi bulunmayan mutant suşa transformasyon ile *EYE2* gen bölgesinin aktarılıp aktarılamadığının belirlenmesi hedeflenmiştir. Ancak transformantı, PCR ile kontrol etmenin yanı sıra elde edilmiş olan 700 bp'lik lineer PCR ürünü içerisinde iki yerden tanıma bölgesi olan *Eco72I* enzimi ile muamele edilmiş böylece doğruluğunun ispatı amaçlanmıştır (Şekil 5.2A ve B).



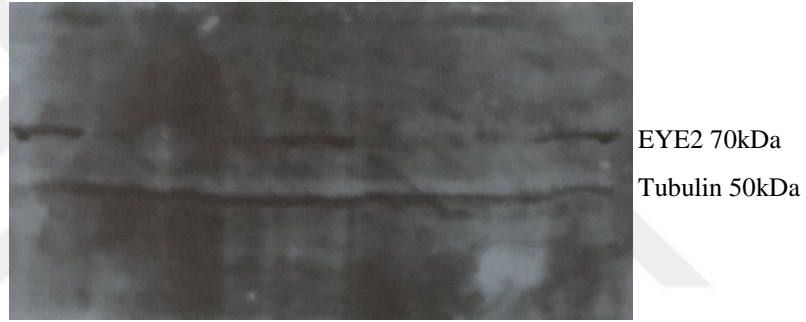
Şekil 5. 2. A. Transformantlara ait PCR ürünü jel görüntüsü. A. Transformantların PCR sonucu elde edilen ürünlerine ait örnek sırası; Uygulamalar sırasıyla 1- 1kb marker DNA, 2- transformant no:1, 3- transformant no:2, 4- Pozitif kontrol olarak pEYE2 plazmid DNA kullanılmıştır. B. Transformantlara ait PCR ürünlerinin enzim kesimi sonucu elde edilen DNA fragmanlarının görüntüsü. Örnek Sırası; 1- 1kb marker DNA, 2- transformant no:B1, 3- transformant no:B2, 4- Pozitif kontrol olarak pEYE2 plazmid DNA (Beklenen enzim kesim 58 bp, 200 bp ve 442 bp' dir.)

Enzim PCR ürünü olan bölgeyi 58 bp, 200 bp ve 442 bp olacak şekilde 3 fragmana ayırmaktadır. Şekil 5.2.A ve 5.2.B'de görüldüğü gibi transformantdan beklenen büyüklükte PCR fragmanları ve beklenen büyüklükte enzim kesim

ürünleri elde edilmiştir. PCR reaksiyonu ve enzim kesimi denemelerinde aktarılan plazmid DNA (pEYE2) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

5.4. Mutant Hücrelerde EYE2 Protein Ekspresyonunun Belirlenmesi

Transformantların tamamı PCR ve enzim kesim reaksiyonları ile tanımlanmıştır ancak denememizde EYE2 protein ekspresyonunun gerçekleşmesi de temel alındığı için bu doğrulamanın ardından, doğrulanan transformantlarda EYE2 proteininin ekspresyonunun olup olmadığının incelenmesi için western blot yapılmış ve Tubulin proteini pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Transformantların western blot sonucu elde edilen görüntüleri Şekil 5.3'de verilmiştir.

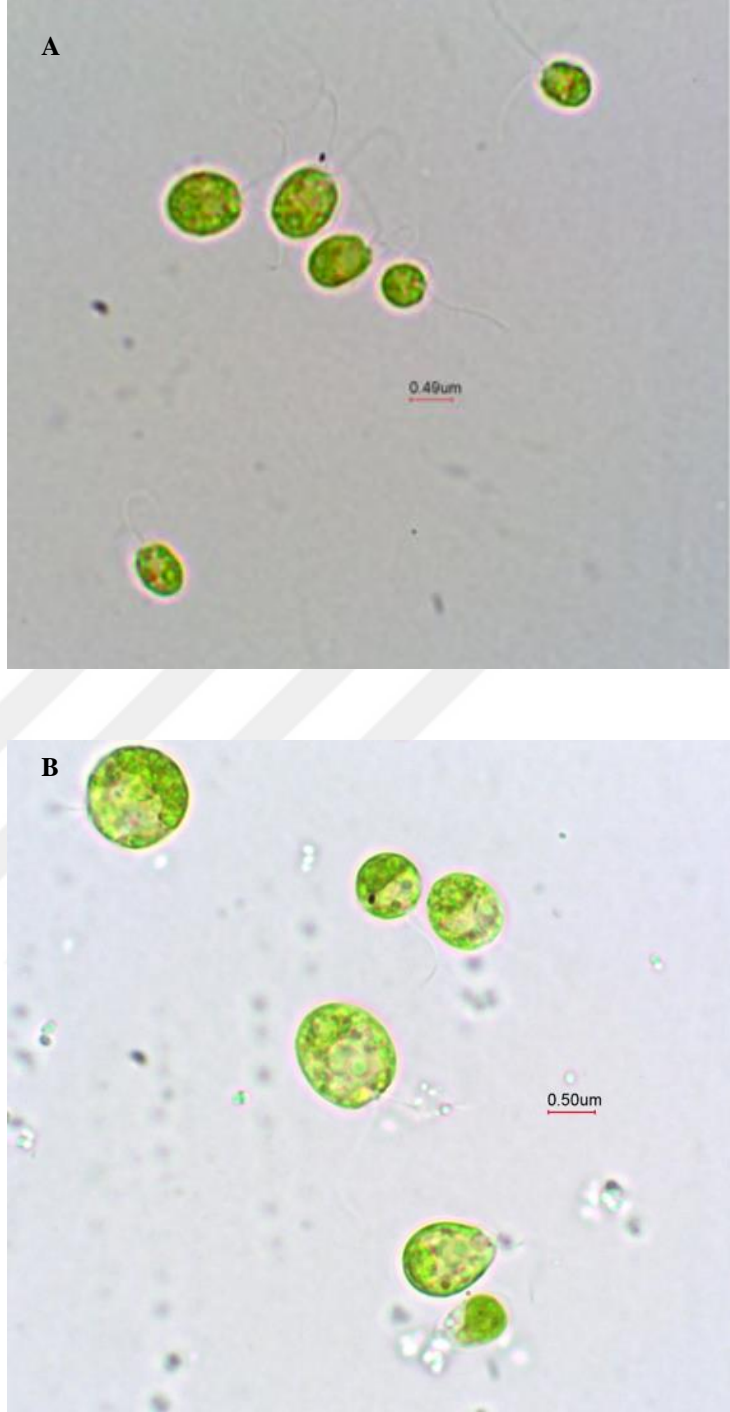


Şekil 5. 3. Western blot görüntüsü. Uygulamalar sırasıyla; 1-Yabanıl hücrede EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonu, 2- Transformasyonda kullanılan mutant suşda Tubulin Protein ekspresyonu 3- Transformant no:1, 4- Transformant no:2, 5- Transformant no:3, 6- Transformant no:4, 7- Transformant no:5, 8- Transformant no:6, 9- Transformant no:7.

Şekil 5.3'de 1 numaralı sıra; yabanıl tip *Chlamydomonas* hücresinde, EYE2 protein ekspresyonunu ve pozitif kontrol olarak kullanılan Tubulin protein ekspresyonunu göstermektedir. 2 numaralı sıra; transformasyonda kullanılan *Chlamydomonas eye2-2* suşuna aittir ve EYE2 protein ekspresyonu ve Tubulin protein ekspresyonu incelenmiş ancak sadece Tubulin protein ekspresyonu görülmüştür ki bu da bu hücreden elde edilen transformantlarda EYE2 proteinin görülmesi durumunda transformasyonun başarılı olduğu ve protein ekspresyonunun transforme edilen gen bölgesi sayesinde gerçekleştiği anlamının çıkarılabilemesini sağlayacaktır. 3 numaralı sıra; 1 numaralı transformant hücreye ait EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonuna aittir ve transformantta Tubulin protein ekspresyonu görülmüştür, bu da protein ekspresyonunun doğru çalıştığı

şeklinde yorumlanmış, EYE2 proteininin görülmemesi ise bu durumda ekspresyonun gerçekleşmemesi şeklinde yorumlanmıştır. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu transformant kullanılmamıştır. 4 numaralı örnek; 2 numaralı transformanta ait EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonuna aittir. Transformantta Tubulin protein ekspresyonu görülmüştür bu da protein ekspresyonunun doğru çalıştığı şeklinde yorumlanmış, EYE2 proteininin ise çok düşük ekspresyonu görülmektedir. Bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu transformant kullanılmamıştır. 5 numaralı örnek; 3 numaralı transformanta ait EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonuna aittir. Transformant hücrede görülen EYE2 proteininin ekspresyon miktarı çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu transformantın kullanılmasının tercihini sağlamıştır (Transformanta B1 kodu verilmiştir). 6, 7 ve 8 numaralı sıralar; sırasıyla 4, 5, 6 numaralı transformant hücrelere ait EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonuna aittir. Transformantlarda Tubulin protein ekspresyonu görülmüştür, bu da protein ekspresyonunun doğru çalıştığı şeklinde yorumlanmış EYE2 proteininin görülmemesi ise bu durumda ekspresyonun gerçekleşmemesi şeklinde yorumlanmıştır ve bu nedenle çalışmanın ilerleyen aşamalarında bu transformantlar kullanılmamıştır. 9 numaralı örnek; 7 numaralı transformanta ait EYE2 ve Tubulin protein ekspresyonuna aittir. Transformant hücrede görülen EYE2 proteininin ekspresyon miktarı çalışmanın sonra ki aşamalarında bu transformantın kullanılmasının tercih edilmesini sağlamıştır (Transformanta B2 kodu verilmiştir).

Transformantlar, ışık mikroskobu ile göz noktasının iriliği ya da ata suş olan *eye2-2*'ya göre morfolojik herhangi bir farklılık olup olmadığının belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Yapılan mikroskobik çalışmalarda dikkate değer bir farklılık belirlenememiştir. Göz noktasının büyüklüğü ve morfolojik yapı karşılaştırılabilir özelliktedir. Şekil 5.4'de yabancı tip ve göz noktası mutant *C. reinhardtii* hücrelerine ait ışık mikroskobu fotoğrafları verilmiştir.

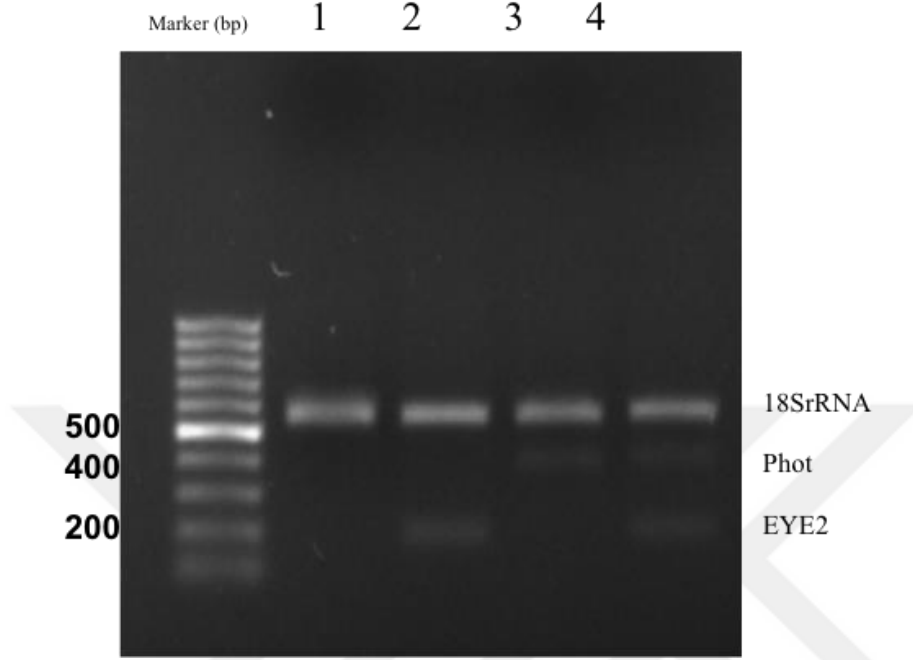


Şekil 5. 4. Hücrelerin ışık mikroskobu ile çekilmiş örnek görüntüleri. A. Yabancıl tip hücre, B.Transformant hücre.

5.5. *eye2/pht* İkili Mutasyon Taşıyan Suşların PCR ile Taranması

Bu aşamada, Dr. Dieckmann'ın laboratuvarından temin edilen phototropin mutant suş (*pht*) ile *eye2-2* suşunu eşleşme ile birleştirerek her iki proteinden de mutant olan ikili mutant suşun elde edilmesi amaçlanmıştır.

Eşleşme sonrası elde edilen koloniler PCR ile taranmış ve her iki gen bölgesinin de negatif olduğu suş aranmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünlere ait jel görüntüsü Şekil 5.5’de verilmiştir.

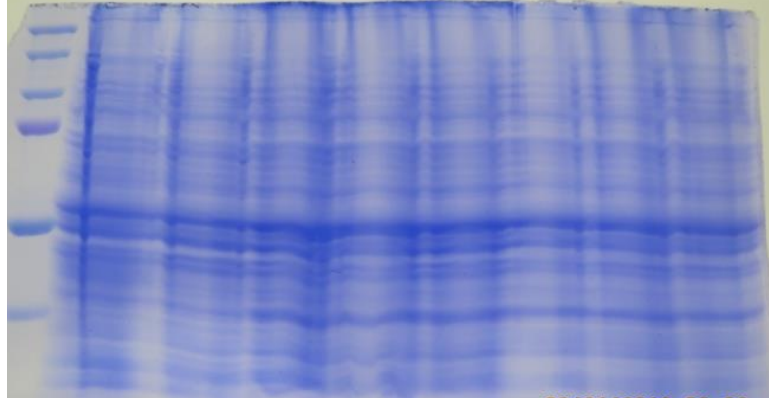


Şekil 5. 5. *eye2/pht* ikili mutant suş adaylarına ait PCR ürününe ait örnek agaroz jel görüntüsü. Uygulamalar sırasıyla; 1- *eye2* ve *phot* mutant örnek, 2- *phot* mutant örnek, 3- *eye2* mutant örnek, 4- Mutasyon bulunmayan yabancıl tip örnek ,Şekil 5. 5, çalışmamızda elde ettiğimiz çeşitli mutant hücrelerden örnekler seçilerek hazırlanmış bir örnek görüntüsüdür.

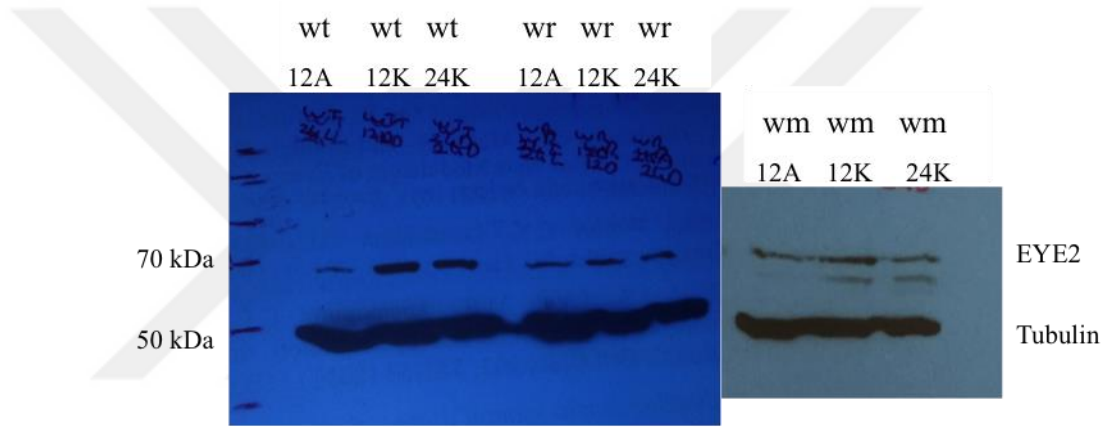
EYE2 ve *Phot* gen bölgelerinde ki mutasyonlar nedeniyle planlanan ikili mutant suşda *EYE2* ve *Phot* gen bölgeleri bulunmadığı için PCR sonucu ürün beklenmemektedir. Şekil 5.5’de hazırlanan örnek görüntüde internal kontrol olarak kullanılan 18SrRNA gen bölgesi kullanılmıştır.

5.6. Zamana Bağlı Değişimin Western Blot ile Belirlenmesi

Çalışmada *EYE2* proteinin ekspresyonundaki değişiminin incelenmesi amacıyla yapılan western blot denemelerinden önce ekstrakte edilen total proteinler SDS-PAGE ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.6). Protein eldesinde sorun olmadığı görülen örnekler ile çalışmalara devam edilmiştir.



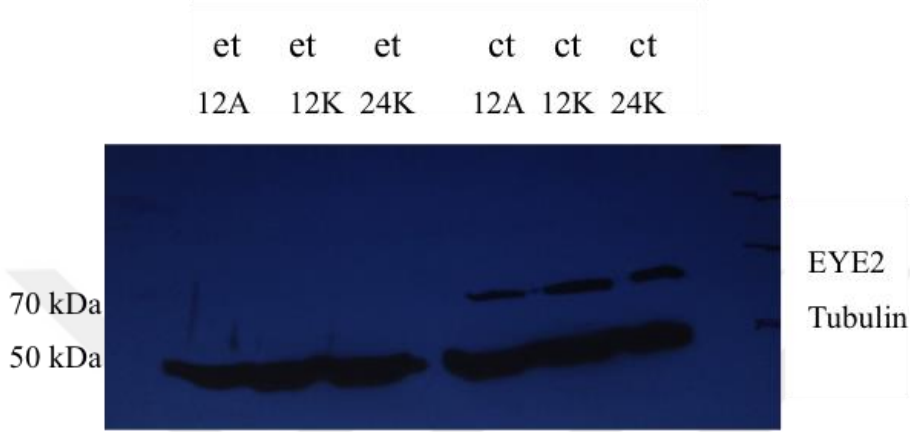
Şekil 5. 6. SDS-PAGE sonrası Coomassie boyası ile muamele edilmiş jel görüntüsü.



Şekil 5. 7. Yabanıl tip, *C. reinhardtii* suşlarının farklı besiyerlerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü. “wt” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen yabanıl tip *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna, “wr” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı olarak asetat kullanılan R besiyeri içerisinde kültüre edilen *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna, “wm” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı kullanmadan hazırlanan M besiyeri içerisinde kültüre edilen *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir.

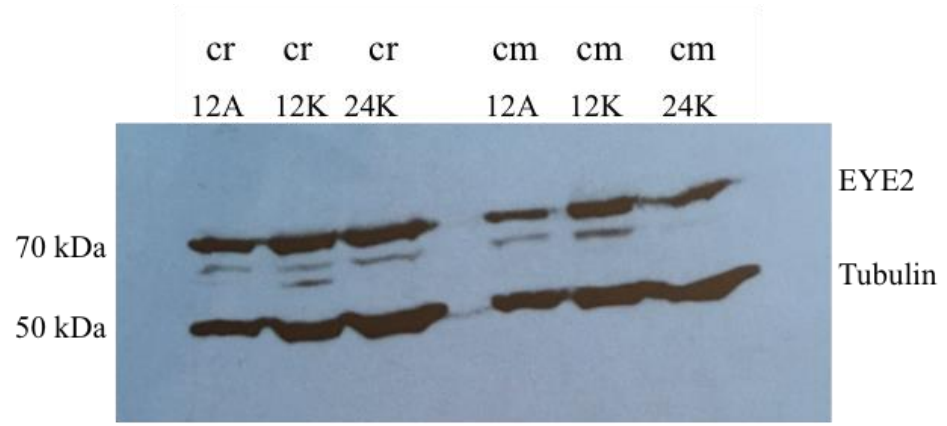
Şekil 5.7.’de “wt” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen yabanıl tip *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. “wr” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı olarak asetat kullanılan R besiyeri içerisinde kültüre edilen *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. “wm” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı kullanmadan hazırlanan M besiyeri içerisinde kültüre edilen *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Kültürler 12:12 (Aydınlık (A):Karanlık (K)) hayat döngüsünde ve 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. 12A; Aydnlık döngüsü başlangıcında

alınan örnek için kullanılmıştır. 12K; Karanlık döngüsü başlangıcında alınan örnek için kullanılmıştır. 24K; 24 saat karanlıkta inkübe edilen örneklerden 24. saat sonunda alınan örnek için kullanılmıştır. Western blot ile EYE2 protein ekspresyonu incelenmiştir yaklaşık 70 kDa olan protein ile birlikte pozitif kontrol olarak Tubulin proteini de aynı membranda incelenmiştir. Tubulin proteini yaklaşık 50 kDa büyüklüğündedir.



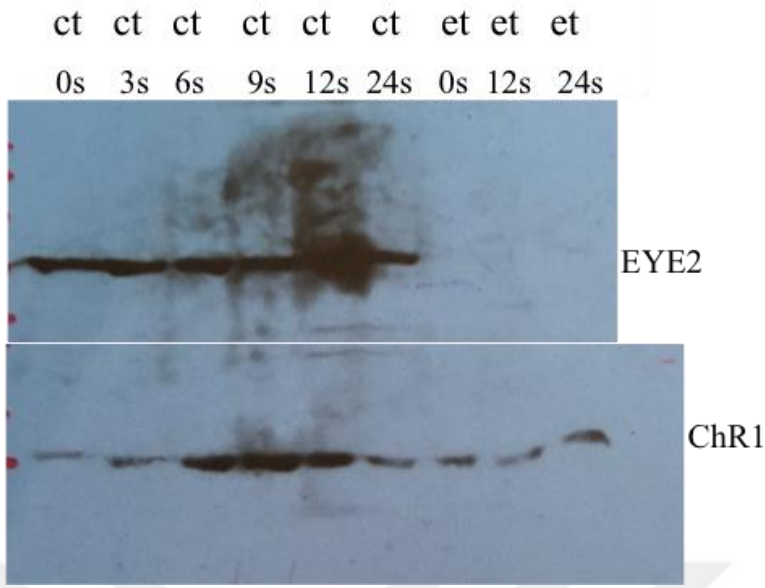
Şekil 5. 8. *eye2-2* ve *cys* mutant *C. reinhardtii* suşlarının TAP besiyerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü. “et” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *EYE2* gen bölgesi bulunmayan mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna, “ct” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen Cys gen bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir

Şekil 5.8.’de “et” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *EYE2* gen bölgesi bulunmayan mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. “ct” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen Cys bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Western blot ile EYE2 protein ekspresyonu incelenmiş ve yaklaşık 70 kDa olan protein ile birlikte pozitif kontrol olarak Tubulin proteini de aynı membranda incelenmiştir. Tubulin proteini yaklaşık 50 kDa kadardır.



Şekil 5. 9. *cys* mutant *C. reinhardtii* suşlarının R ve M besiyerlerinde ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine ait western blot görüntüsü. “cr” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı olarak aasetat kullanılan R besiyerinde kültüre edilen *EYE2* gen bölgesi bulunmayan *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna, “cm” ile ifade edilen örnek; Karbon kaynağı eklenmeden hazırlanan M besiyerinde kültüre edilen *CYS* gen bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir.

Şekil 5.9.’da “cr” ile ifade edilen örnek; karbon kaynağı olarak aasetat kullanılan R besiyerinde kültüre edilen *EYE2* gen bölgesi bulunmayan *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. “cm” ile ifade edilen örnek; Karbon kaynağı eklenmeden hazırlanan M besiyerinde kültüre edilen *CYS* gen bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Kültür koşulları yukarıda belirtildiği şekildedir. Western blot ile *EYE2* protein ekspresyonu incelenmiştir yaklaşık 70 kDa olan protein ile birlikte pozitif kontrol olarak Tubulin proteini de aynı membranda incelenmiştir. Tubulin proteini yaklaşık 50 kDa kadardır. Kültürler 12:12 (Aydınlık (A):Karanlık (K)) hayat döngüsünde ve 24 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. 12A; Aydınlık döngüsü başlangıcında alınan örnek için kullanılmıştır. 12K; Karanlık döngüsü başlangıcında alınan örnek için kullanılmıştır. 24K; 24 saat karanlıkta inkübe edilen örneklerden 24. saat sonunda alınan örnek için kullanılmıştır. Western blot ile *EYE2* protein ekspresyonu incelenmiştir yaklaşık 70 kDa olan protein ile birlikte pozitif kontrol olarak Tubulin proteini de aynı membranda incelenmiştir. Tubulin proteini yaklaşık 50 kDa kadardır.

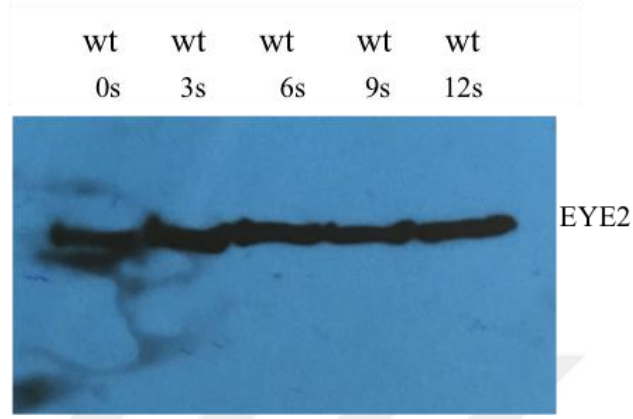


Şekil 5. 10. *Cys* mutant *C. reinhardtii* suşunun ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesine ait western blot görüntüsü. “ct” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *Cys* bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri, “et” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *eye2-2* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir.

Şekil 5.10.’da “ct” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *Cys* bölgesinde mutasyon oluşturduğumuz *cys* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Kültürler 12:12 (Aydınlık (A):Karanlık (K)) hayat döngüsünde inkübe edilmiştir. Örnekler karanlık döngünün başlangıç saati 0. (sıfır) saat sayılmak üzere 3. saat, 6. saat, 9. saat, 12. saat ve 24. saat başlarında toplanmıştır ve membran üzerinde sırasıyla 0s, 3s, 6s, 9s, 12s, 24s, olarak ifade edilmiştir.

Şekil 5.10’da “et” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen *eye2-2* mutant *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Kültürler 12:12 (Aydınlık (A):Karanlık (K)) hayat döngüsünde inkübe edilmiştir. Örnekler karanlık döngünün başlangıç saati 0. (sıfır) saat sayılmak üzere 12. saat ve 24. saat başlarında toplanmıştır ve membran üzerinde sırasıyla 0s, 12s, 24s, olarak ifade edilmiştir.

Western blot ile EYE2 protein ekspresyonu incelenmiştir yaklaşık 70 kDa olan protein ile birlikte bir fotoreseptör protein olan ChR1 protein ekspresyonu da incelenmiştir. ChR1 proteini yaklaşık 70 kDa kadardır.



Şekil 5. 11. Yabani tip, *C. reinhardtii* türünün ve farklı zaman aralıklarında protein ekspresyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılan örnek western blot görüntüsü. “wt” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen yabani tip *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir.

Şekil 5.11.’da “wt” ile ifade edilen örnek; TAP besiyerinde kültüre edilen yabani tip *C. reinhardtii* suşu kullanılarak yapılan protein ekspresyonuna ait verileri ifade etmektedir. Kültürler 12:12 (Aydınlık (A):Karanlık (K)) hayat döngüsünde inkübe edilmiştir. Örnekler karanlık döngünün başlangıç saati 0. (sıfır) saat sayılmak üzere 3. saat, 6. saat, 9. saat ve 12. saat başlarında toplanmıştır ve membran üzerinde sırasıyla 0s, 3s, 6s, 9s, 12s, olarak ifade edilmiştir.

Western blot ile yaklaşık 70 kDa olan EYE2 protein ekspresyonu incelenmiştir.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, *Chlamydomonas reinhardtii* göz noktasının hücre bölünmesinin ardından yeniden oluşumu sürecinde fonksiyonel olduğu düşünülen EYE2 proteininin, bu çalışma kapsamında oluşturulan redoks aktif bölgesinde iki Cys rezidülerini hedefleyen ikili mutant suş ile yabancı tip suşlardaki ekspresyon değişimlerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda *EYE2* geninin thierodoksin aktif bölgesindeki Cys rezidülerinde ait TGC üçlü kodonlarındaki guanin, sitozin ile değiştirilmiş ve TCG (Serin) üçlü kodonu elde edilmiştir. Bu şekilde oluşturulan mutant EYE2 proteinini eksprese etmesi beklenen dizinin klonlandığı plazmid, *EYE2* geninin defektli olduğu *Chlamydomonas eye2-2* suşuna aktarılmış ve mutant EYE2 proteininin ekspresyonunun değişimi incelenmiştir.

Tek hücreli yeşil alglerden olan *Chlamydomonas sp.*, kamçı hareketliliği, kloroplast dinamiği, hücre duvarının özel yapısı ve ışıksız ortamda karbon kaynağı olarak asetatı kullanması nedeniyle genetik araştırmalarda büyük önem taşımakta ve model organizma olarak kullanılmaktadır. Genom yapısı 2007'de aydınlatılan *C. reinhardtii* hayat döngüsünde içerdiği karanlık ve aydınlık evre ile bir çok organizmadan ayrılır (Merchant et al., 2007).

Göz Noktası ise Mast (1916), tarafından *Volvocaceae* alg ailesine dahil üyelerde bulunan, ışık mikroskobu seviyesinde karetonoid pigmentlerinin konsantrasyonunun yüksek olması sebebiyle parlak turuncu renkte görülen, göz noktası ya da stigma, hücrelerin yüzmeleri esnasında ışığı algılamasına yardımcı olan bir organel olarak tanımlanmıştır. *C. reinhardtii* göz noktası, iki ya da daha fazla, yaklaşık olarak 80-130 nm çapında, elektronca zengin, düzenli granüllerden oluşan tabakalar içermektedir ve her bir tabaka, tilakoid membran tarafından birbirine bağlanmaktadır (Morel-Laurens and Feinleb, 1983). Söz konusu olan bu granüllü tabakanın ve dolayısıyla göz noktasının oluşumu her bir hücre bölünmesinin ardından yenilenmektedir. Fakat bu yeniden oluşum sürecinde göz noktasının granülasyonunun şekillenışı hala cevaplanmayı bekleyen bir sorudur. Konuyla ilgili yapılan çalışmalarda özellikle üç proteinin önemli olduğu düşünülmektedir; bunlardan PHT göz noktasının iriliğinin kontrolünü sağlarken, EYE2 ve EYE3 kloroplast stromasında pigment granülasyonunu sağlar. Göz

noktasının yeniden oluşumu sürecinde rol oynayan proteinler yapılan çalışmalar sonucunda edindikleri görevlere göre genel olarak üç gruba ayrılmıştır. İlk grup, göz noktası oluşumunun düzenlenmesinde fonksiyonel olduğu düşünülen proteinlerden oluşurken, ikinci grubu, göz noktası granüllerinin 4 numaralı kamçı kökçüğü üzerinde ki yerleşimini düzenlediği düşünülen proteinler oluşturmaktadır (Dieckmann, 2003; Lamb et al., 1999; Mittelmeier et al., 2008; Trippens et al., 2012). Son grup proteinlerin ise karotenoid dolu lipid granüllerinin, düzenlenmesi ve kloroplast içerisindeki yerleşiminden sorumlu olan proteinlerin oluşturduğu düşünülmektedir. Bu grup içerisinde göz noktası oluşumunu başlatan proteinlerin öncelikli olarak göz noktasının yerleşiminden sorumlu olan ikinci grup proteinler olabileceği, bu grup proteinlerin aktivatör ya da reseptör gibi davranarak diğer grup proteinleri doğrudan ya da dolaylı olarak tetikleyebilecekleri konuyla ilgili yapılan çalışmalarda öne sürülmüştür (Roberts et al., 2001; Dieckmann, 2003; Kreimer, 2009). İkinci grubun etkisi ile başlayan sürecin son grup proteinler ile devam ettiği bir diğer önemli nokta olmuştur. Lokalize olacağı yer belirlenen göz noktası için ikinci grup proteinlerin lipid granüllerini hazırlamaya başladığı ve bu aşamanın göz noktasının oluşumu için önemli olduğu düşünülmüştür ancak ilk grup proteinler olmadan karotenoid dolu lipid granüllerin yerleşiminin düzenlenmesinin gerçekleşmesinin olası olmayacağı da öne sürülmektedir. Bu gibi fikirler ışığında EYE2 ile yapılan mRNA düzeyinde ki çalışmalarda ya da yine kamçılı ve göz noktası bulunan yeşil alglerden olan *Spermatozopsis similis*'in göz noktası fraksiyonları ile yapılan çalışmalarda, EYE2'nun birinci grup proteinler içerisinde olabileceği, göz noktasının yapısal şeklinin oluşumunda ve düzenlenmesinde fonksiyonel olacağı düşünülmüş ancak tam anlamıyla kanıtlanamamıştır (Reninger et al., 2001).

EYE2'nun ilk grup proteinler arasında girebilme olasılığını düşündüren içerdiği Thioredoksin aktif bölgedir (Morisse et al., 2014). Thioredoksin ailesi redoks reaksiyonları katalizleme özellikleri ile gösterilmiştir (Lemaine et al., 2004). Bu bölge EYE2'da 2. ekzon içerisinde 186-194. amino asitler arasında olup iki adet Cys içermektedir. Cys bölgeleri yapılan çalışmalarda, elektron iletme mekanizmaları nedeniyle protein katlanmalarında ve enzimatik reaksiyonlar gibi hücre içerisinde önemli gelişimsel yollarda yer aldığı gösterilen bölgelerdir. Bu nedenle EYE2 thioredoksin bölgesinin içerdiği Cys'lerin proteine düzenleyici ve

kontrol edici bir rol vermiş olabileceği fikrinin edinilmesini sağlamıştır (Netto et al., 2007). EYE2 proteini üzerinde tek bir Cys bölgesinin mutasyona uğratıldığı çalışmalar bulunmaktadır ve EYE2 ekspresyonunda değişiklik görülmemiştir (Roberts et al., 2001). Bu çalışmada literatürdeki çalışmalarda elde edilen veriler doğrultusunda Cys bölgeleri proteinin fonksiyonun belirlenmesi için çıkış noktası olarak seçilmiş bu doğrultuda, literatürden farklı olarak iki Cys bölgesinde mutasyon yapılmış ve EYE2 proteininin ekspresyon seviyesi yabanıl tipe göre büyük bir farklanma göstermemiştir. Bununla birlikte bu çalışmada planlanana benzer şekilde, iki Cys bölgesi mutasyona uğratılarak farklı proteinler üzerinde yapılan çalışmalarda bulunmaktadır. Pulcu et al., (2015) tarafından yapılan çalışmalarda alfa-hemolizin proteinin Cys mutasyonları denenmiş ve etkileri incelenmiştir, ve Cys bölgeleri proteinin fonksiyonel bölgesi olarak tanımlanmıştır. Tüm bunların dışında düşünüldüğü gibi Thierodoksin aktif bölge içerisinde bulunan Cys bölgelerinin fonksiyonel olmadığı durumlarda rapor edilmiştir. Çalışmada elde edilen verilerde *cys* mutant suşlarda göz noktasının oluşumunun engellendiği görülmemiştir. Hücrelerde göz noktası bulunmakta ve ışığa yönelim gerçekleşmekte ancak ışığa karşı alınan yanıt yabanıl hücrelere göre daha yavaş olmaktadır. Benzer sonuçlar Roberts ve ekibi (2001) ile Lamb ve ekibi (1999) tarafından da rapor edilmiş benzer sonuçların alındığı mutasyonlar gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, Roberts ve ekibi (2001) tek Cys bölgesi mutantasyonlu EYE2 mutant suşlarla çalışmış, edindiği benzer sonuçları granül oluşumunda olabilecek bir hasar ile açıklamıştır, bu ifade edilen sonuçlar ile de uyumludur ancak Roberts et al (2001)'e göre tekli mutant ışığa verdiği yanıt göre yabanıl tipten farklılık göstermemekte sadece hızlı bölünen kültürlerde göz noktası oluşumunda fenotipik bozukluk görülmektedir. Bu çalışmada buna benzer veriler elde edilmemiş, göz noktasındaki fenotipik bozukluk hızlı ya da yavaş bölünen tüm kültürlerde gözlenmiştir (Roberts et al. (2001)' un çalışmasında Cys mutasyonlarının sebep olduğu fenotipik bozukluk, EYE2 proteininin göz noktası düzenlenmesine ilişkin ilk grup proteinler arasında yer aldığı, karanlık sonrası göz noktasının yerleşimini belirleyen proteinlerin ardından sentezlenen lipid granüllerinin düzenlenmesi ile ilişkili olabileceği, yapılan mutasyon nedeniyle hücrede lipid granülleri oluşumu gerçekleşmiş ve granüller 4 numaralı kamçı kökçüğüne doğru yakınlaşmış olsalar da düzenlenemediklerinden dolayı düzenli tek bir göz noktası görülemediği şeklinde yorumlara neden olmuştur.

Bu çalışmada *Cys* mutant suşlarda göz noktasının fenotipik bozukluk olsa da oluşmuş olması ve ışığa yönelimin gerçekleşiyor olması ilgilenilen bölgede bulunan *Cys* bölgelerinin protein fonksiyonunu tamamen durduracak kadar fonksiyonel olmadığını düşündürmektedir. Bu da yine her zaman Thioeredoksin aktif bölgelerinin düşünüldüğü kadar büyük fonksiyonları olmayabileceği görüşlerini doğrulamaktadır. Bununla birlikte EYE2 proteini 3. ekzonda ikinci bir Thioeredoksin aktif bölge içermektedir ve bu bölgede de iki *Cys* bölgesi bulunmaktadır, proteinin fonksiyonel bölgesinin bulunması için bu iki bölgenin de incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

EYE2 protein ekspresyonu incelenmiştir. Yabancıl tip ile birlikte *cys* mutant suşda zamana ve besiyerine bağlı olarak EYE2 protein ekspresyonunun gösterildiği suşlardandır. Bu çalışmada EYE2 proteini düşüldüğü gibi göz noktası lipid granüllerinin düzenlenmesinden sorumlu ise protein ekspresyonunun göz noktasının kaybolduğu karanlık koşullarda yeniden oluşumu tetiklemek için artmasının, göz noktasının bulunduğu aydınlık koşullarda ise artık düzenlenmiş göz noktası bulunduğu için ekspresyon seviyesinde düşüş görüleceği beklenmiştir. Zaman etmeni dışında literatürde taranan göz noktası mutant suşlarda besiyerinin önemi de vurgulanmaktadır. Lamb et al (1999) elde ettiği normalden küçük göz noktası bulunan mutant suşda yaptığı çalışmalarda suşun asetat bulunmayan besiyerinde kültüre edildiğinde göz noktasının fenotipik bozukluklar içerdiğini ancak sıradan asetat içeren besiyeri ile kültüre edildiğinde fenotipik olarak göz noktasının düzgün olduğunu göstermiştir. Bu da suşların fototrofik ya da heterotrofik kültüre edilmelerinin göz noktası proteinlerinin fonksiyonlarını etkilediğini göstermiştir (Lamb et al., 1999).

Bu çalışmada üç farklı besiyeri kullanılmıştır, ilk besiyeri TAP'dir, ikinci besiyeri heterotrof olarak kültüre edilmelerini sağlayacak olan karbon kaynağı olarak asetat'ın bulunduğu, literatürde heterotrof besiyeri olarak kullanılan "R" besiyeridir (Heifetz et al., 2000, Therien et al., 2014). Son olarak ise literatürde karbon kaynağı içermeyen, hücrelerin fototrofik kültürünün yapıldığı "M" besiyeridir. M besiyeri, hücrelerin kamçı hareketlerini arttırdığı ve fotosentezi zorunlu hale getirdiği için, literatürde göz noktası, kamçı hareketliliği ve ışığa yönelim ile bağlantılı çalışmalarda sıkça kullanılmıştır. Ancak son yıllarda M

besiyeri daha çok biyoreaktör çalışmalarında fotosentez verimliliği için kullanılmıştır (Lamb et al., 1999; Tamburic et al., 2012; Zheng et al., 2012).

Tamburic et al., (2012) çalışmasında biyoreaktörler için *Chlamydomonas* hücrelerini M besiyerinde kültüre etmiştir ancak bu kültür gelişimi için fotosentez gerekli olduğunda kültürlerin gece büyümediği dolayısıyla hücre gelişiminin diğer besiyerlerine göre en az olduğunu belirtmiştir. Tamburic et al., (2012) göz noktası ile ilgili çalışma yapmamış olmasına karşın sonuçları Lamb et al., (1999) ile de uyumlu görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen veriler de benzer şekildedir. M besiyerinde kültüre edilen hücrelerde büyüme diğerlerine göre yavaş olmuştur ancak bu kültürlerde yapılan fototaksis denemelerinde diğerlerine göre çok daha başarılı sonuçlar alınmıştır.

Farklı besiyerlerinde yabancı tip suş ile yapılan EYE2 protein ekstraksiyonu sonuçları Şekil 5.7'de verilmiştir. Western blot denemesinde pozitif kontrol olarak Tubulin kullanılmıştır. Tubulin kamçı ve kamçı kökçüklerinde yoğun olarak bulunan bir proteindir ve hücre içerisinde ekspresyon miktarı değişmeyen proteinlerdendir. Yapılan çalışmalarda protein ekspresyonu denemelerinde ekspresyondaki değişimin doğrulanması amaçlı kullanıldığı bildirilmiştir (Roberts et al., 2001; Mittelmeier et al., 2015). Bu çalışmada da benzer amaçla Tubulin kullanılmıştır. Şekil 5.7'de TAP besiyerinde EYE2 proteininin karanlık döngü başlangıcı ile birlikte arttığı görülmüştür. Karanlık döngü başlangıcında gerçekleşen ekspresyon artışı, EYE2 proteininin göz noktasının karanlık döngü başlangıcından sonuna kadar aynı seviyede kalmıştır. Bu sonuçlar, Reninger et al., (2001), Roberts (2001) ve Morisse et al., (2014) önerdiği şekilde, proteinin içerdiği aktif bölgeler nedeniyle proteinin regülatör görevi görmesi ve göz noktasının yeniden düzenlenmesi fonksiyonlarına sahip olduğu bu nedenle protein ekspresyonunun zamana bağlı olarak karanlık döngü boyunca arttığı görüşüne uygun görünmemektedir. Ancak ekspresyonun karanlık başlangıcında artmış olması EYE2'nun regülatör görevi nedeniyle tüm döngü boyunca aynı ekspresyon seviyesi ile kaldığı bu şekilde göz noktasının lokalizasyonu ve lipid granüllerinin düzenlenmesini başından itibaren kontrol ettiğini düşündürmektedir.

Yabancı tip suş ile farklı besiyerlerinde yapılan benzer denemelerde de benzer sonuçlar alınmıştır. Şekil 5.7'de görüldüğü gibi TAP besiyeri ile karşılaştırıldığında özellikle M besiyerinde EYE2 protein ekspresyon miktarı tüm

saat aralıklarında birbirlerine benzer oranlarda düşüş göstermiştir. Bu da Lamb et al., 1999'un belirttiği gibi fototrofik kültürlerde EYE2 proteinin göz ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Zheng et al., (2012)'un da çalışmasında belirttiğine benzer şekilde R besiyerinde TAP besiyerine oranla küçük olsa da ekspresyon miktarında azalma gözlenmiştir ancak yorum yapacak kadar belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Her iki besiyeride karbon kaynağı içermesi nedeniyle sonuç anlaşılabilir olmuştur .

EYE2 protein ekspresyonu *cys* mutant suşlarında da zamana ve besiyerine bağlı olarak incelenmiş (Şekil 5.8 ve 5.9) ve anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Protein ekspresyonları yabanıl tip suşlara benzer olarak karanlık döngünün başlangıcı sonrası artmış ve ardından sabit kalmıştır. Roberts et al., (2001)'da da belirtildiği gibi mutant hücrelerin normal yabanıl tip hücelere oranla gelişimlerinin yavaş olması nedeniyle hücreler özellikle, M besiyeri içerisinde ve karanlık döngüde yabanıl tip suşa göre daha yavaş büyümüştür. Bu da protein ekstraksiyonu ve sonuç eldesini güçleştirmiştir.

Bu çalışmada yabanıl tip suş ve *cys* mutant suş karanlık döngü boyunca TAP besiyerinde kültüre edilerek sadece zaman faktörüne bağlı olarak ayrıntılı incelenmiş, EYE2 protein ekspresyonu gözlenmiştir. Şekil 5.10'da *cys* mutant suşda karanlık döngünün başlangıcından bitişine kadar EYE2 protein ekspresyonu ve fotoreseptör olduğu bilinen ChR1 proteinine ait ekspresyon değişimi verilmiştir. EYE2 proteininin karanlık döngü başlangıcında artan ekspresyon seviyesi karanlık döngü boyunca değişmemiştir. Bu da önce ki verilere uygun görünmektedir. ChR1 ekspresyonunun ise *cys* mutant suşda 6. saat sonrası karanlık döngü bitimine kadar artış gösterdiği görülmüştür. Mittelmeier et al., (2015) *min1* mutant suşda yaptığı çalışmalarda fotoreseptör proteinlerin göz noktası oluşumunda ki rolü ve önemini açıklamış olası protein ekspresyon artışlarına dikkat çekmiştir, bu da ChR1 'de gördüğümüz artışın anlamını arttırmıştır. Kateriya, S., (2004) ve Berthold et al., (2008) de çalışmalarında ChR1'in ChR2'ye göre hücrede yıkımının geç olduğu bunun da fotoreseptör olarak ChR1'in daha kuvvetli aday olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışma ile edinilen ekspresyon değişimi verilerinin de yine geçmiş çalışmaları desteklediği düşünülmektedir.

Şekil 5.11’de yabancı tip hücrede EYE2 protein ekspresyonu incelenmiştir ancak yine edinilen diğer sonuçları doğrular şekilde karanlık boyunca ekspresyonda artış olduğu gözlemlenmiş ancak gözlenen artış dikkate değer bir aralıkta olmadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada, mavi ışık reseptörü olduğu bilinen ve göz noktasının ışık yoğunluğuna bağlı olarak iriliğinin değişiminin regülasyonunda görevli olan PHT proteininin bulunmadığı *pht* mutant suş ile oluşturulacak olan *eye2/pht* ikili mutant suşda göz noktasının iriliğinin değişimi mikroskobik yöntemler ile incelenmesi de hedeflerden birini olmuştur. Huang and Beck (2003) yaptıkları çalışmada PHT’in *Chlamydomonas* hücre döngüsü için kilit rol oynadığı ve hayat döngüsünü düzenlediğini bildirmiş ve bu veriyi PHT gen bölgesi susturularak elde edilen mutant suşlar ile doğrulamıştır. Proteinin bu etkisi olası ışık reseptörü aktivitesine bağlanmıştır. Yine yapılan çalışmalarda Trippens et al., (2012) elde ettiği *pht* mutant suş ile ışık reseptör aktivitesini göstermiştir. Çalışmamızda elde edilen *phot/eye2* ikili mutant suş ile yapılan çalışmalarda göz noktası eksikliğine bağlı olarak yaşamsal bir eksiklik söz konusu olmamış ancak hücrelerde fototaktik yanıtı rastlanmamıştır. Bu da iki proteinin göz noktası ile bağlantısı olduğu görüşünü doğrulamıştır.

Tüm bu çalışmada söz konusu mutant suşların eldesi için yapılan transformasyonlarda, plazmid DNA’nın konsantrasyonu ile ilgili bir çok deneme yapılmıştır. Prokaryotik transformasyonda 10-100ng plazmid DNA transformasyon için yeterli geldiği bilinmektedir. Mayalarla yapılan çalışmalarda ise aynı şekilde 10-100ng arası plazmid DNA kullanıldığı bilinmektedir. *C. reinhardtii* ile yapılan transformasyon denemelerinde ise en az 500 ng plazmid DNA ile yapılan transformasyonlarda sonuç alınmıştır. Yamano et al., (2012) yaptığı çalışmada *C. reinhardtii* transformasyonunu hızlı ve verimli yapmayı amaçlamış ve her 1000 ng plazmid DNA için yaklaşık 500 transformant elde ettiğini göstermiştir ancak bu çalışmada veriler, Shimogawara et al., (1997) ve Mittelmeier et al., (2015)’e benzer olarak daha düşük koloni sayısını göstermektedir ve her 1000 ng plazmid DNA için en iyi olasılık ile en fazla 50 transformant elde edilmiştir. Bu sonuçta transformasyon için kullanılan kompetent suşların da önemli olduğu düşünülmektedir.

Bu çalışmada, sonuç olarak, EYE2 proteini üzerinde Thiredoksin aktif bölgede bulunan iki Cys bölgesinde mutasyonlar yapılmış olup, mutant suş elde edilmiştir. Elde edilen bu mutant suş ve yabanıl suş EYE2 protein ekspresyonu bakımında zamana ve besiyerine bağlı olarak incelenmiş EYE2 proteininin fonksiyonu ve aktif bölgesi belirlenmeye çalışılmıştır. Elde edilen veriler EYE2 proteininin Thiredoksin aktif bölgesinde bulunan Cys aminoasitlerinin proteinin etkileşim yolağını değiştirmediğini ve protein ekspresyonunun yabanıl tip hücrelere benzer şekilde geręekleřtięini göstermiştir. Farklı besiyerlerinde yapılan denemelerde elde edilen sonuçlara göre ise yabanıl tip ve mutant hücrelerin tamamı M besiyeri içerisinde en yavaş büyürken, göz noktasının iriliği de bu besiyeri içerisinde en küçük olarak belirlenmiştir. EYE2 protein ekspresyonu, kullanılan üç farklı besiyeri içerisinde kültüre edilen hücrelerde zamana bağlı artışlar göstermiş olsa da bunların anlamlı artışlar olmadiğını düşünmekteyiz. Elde edilen bu veriler ışığında bu çalışmanın EYE2 proteininin ikili mutant suşlar oluşturularak fonksiyonel bölgesinin gösterilmesi ayrıca protein ekspresyonunun da incelenmesi açısından önemli olduğunu ve ileride yapılacak çalışmalara öncü olacağı inancında bulunmaktayız.

7. ÖNERİLER

C. reinhardtii son yıllarda özellikle moleküler çalışmalarda gen dizisinin bilinmesi ve haploid organizma olması nedeniyle sıkça kullanılmaktadır. Organizmanın içerdiği göz noktası ise hücrenin gerek hayat döngüsü süresince tekrar tekrar bölünmelerinde ki yeniden oluşumu gerekse fotosentez ile olası bağlantısı nedeniyle büyük önem taşımaktadır. Göz noktası ayrıca ışığa gösterdiği hassasiyet ve kamçı hareketliliği için gerekli olan sinyal iletimi yolağı açısından da bir çok fizikçi tarafından ilgi duyulan bir alandır. Göz noktasının yeniden oluşumu ve kamçı dinamiği birbirinden kopamayacak iki konudur ve çalışmalarda da birbirleri ile olan bağlantıları gösterilmiştir. Yapılan tüm bu çalışmalara ve gösterilen ilgiye karşın yine de göz noktasının oluşum sürecinin yol izi ve görevli proteinler halen tam olarak bilinmemektedir. Fonksiyonel olduğu düşünülen proteinlerin de görevleri ve fonksiyonel grupları hakkında yeterli veri yoktur. Bu proteinlerden biri olan EYE2 göz noktasında lokalize olduğu ve kamçı hareketliliği için gerekli olduğu bilinen bir protein olmasına rağmen görevi ve fonksiyonel grubu halen açıklanamamıştır. Bu nedenle yapılan bu araştırmada EYE2 proteininin fonksiyonel bölgesinin gösterilmesi ve kamçı dinamiği ile bağlantı kurulmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Söz konusu bu çalışmanın bir çok araştırmaya da yol göstereceği düşünülmektedir ve konuyla ilgili çeşitli öneriler sunulmuştur.

Bu çalışmada, EYE2 protein ekspresyonu analizlerinde kullanılan western blot yöntemine ilave olarak protein ekspresyonunun daha maliyetli ve tecrübe gerektiren yöntemler olmasına karşın immunofloresans mikroskopi ya da konfokal mikroskopi gibi hücre içerisinde proteini belirlemeyi ve ekspresyon miktarını tespit etmeyi sağlayan yöntemlerin kullanılması önem arz etmektedir.

EYE2 proteini üzerinde iki sistein bölgesi mutant olan suşlar elde edilmiş ve ekspresyonları incelenmiştir. İleride yapılacak çalışmalarda EYE2 proteininde bulunan diğer Cys bölgeleri üzerinde mutasyonların yapılması ve proteinin aktif bölgesinin bulunmasına yönelik çalışmaların devam etmesinin önemli olduğu düşünülmektedir.

C. reinhardtii hücresinde göz noktası ve kamçı hareketliliği birbirinden ayrılmaz iki bileşendir. Aynı şekilde yolaklarının da birbiri ile ilişkili olduğu

düşünülmektedir. Bu doğrultuda tek başına protein ekspresyonunun ve aktif bölgesinin belirlenmesi ile birlikte protein etkileşiminin belirlenmesinin de önemli olduğu fikri öne çıkmaktadır . Protein etkileşiminin “Maya İki Hibrit”, “İmmün Çöktürme” ve ardından “Kütle Spektrometresi”, gibi yöntemler ile belirlenmesinin de yol izinin aydınlatılmasında büyük ilerlemelere neden olacağına inanmaktayız.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Archibald, J.M.**, 2009, The puzzle of plastid evolution, *Current Biology*, 19:R81–R88pp.
- Beckmann, M. and Hegemann, P.**, 1991, In vitro identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*, *Biochemistry*, 30:3692-3697pp.
- Bennett, R.R. and Golestanian, R.**, 2015, A steering mechanism for phototaxis in *Chlamydomonas*, *Journal of the Royal Society Interface*, 12:1-6pp.
- Berthold, P., Tsunoda, S.P., Ernst, O.P., Mages, W., Gradmann, D. and Hegemanna, P.**, 2008, Channelrhodopsin-1 Initiates Phototaxis and Photophobic Responses in *Chlamydomonas* by Immediate Light-Induced Depolarization, *Plant Cell*, 20:1665-1667pp.
- Bradford, M.M.**, 1976, ‘‘A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding’’, *Analytical Biochemistry*, 72:248-254pp.
- Breton, G. and Kay, S.**, 2006, Circadian rhythms lit up in *Chlamydomonas*, *Genome Biology*, 7:215p.
- Boyd, J.S., Mittemeier, T.M., Lamb, M., Dieckmann, C.L.**, 2011, Thioredoxinfamily protein EYE2 and Ser/Thr kinase EYE3 play interdependent roles in eyespot assembly, *Molecular Biology of the Cell*, 22:1421–1429pp.
- Boyd, J.S., Gray, M.M., Thompson, M.D., Horst, C.J., Dieckmann, C.L.**, 2011, The daughter four-membered microtubule rootlet determines anterior-posterior positioning of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cytoskeleton*, 2011, 68:459-469pp.
- Boyd, J.S., Lamb, M.R. and Dieckmann, C.**, 2011b, Miniature- and Multiple-Eyespot Loci in *Chlamydomonas reinhardtii* Define New Modulators of Eyespot Photoreception and Assembly, *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 1:489–498pp.
- Buist, G, Steen, A., Kok, J., Kuipers, O.P.**, 2008, LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans, *Molecular Microbiology*, 68:838–847pp.
- Calvin, M. and Benson, A.A.**, 1948, The path of carbon in photosynthesis, *Science*, 107: 476–480pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Crescitelli, F., James, T., Erickson, J., Loew, E. and McFarland, W.,** 1992, The eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii*: a comparative microspectrophotometric study, *Vision Research*, 32:1593-1600pp.
- Deininger, W., Kroger, P., Hegemann, U., Lottspeich, F. and Hegemann, P.,** 1995, Chlamyrodopsin represents a new type of sensory photoreceptor, *EMBO Journal*, 14:5849-5858pp.
- Dieckmann, C.L.,** 2003, Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*, *Bioessays*, 25:410-416pp.
- Foster, K., Smyth, R.,** 1980, Light antennas in phototactic algae. *Microbiology reviews*, 44:572-630pp.
- Foster, K., Saranak, J., Patel, N., Zarilli, G., Okabe, M., Kline, T. and Nakanishi, K.,** 1984, A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*, *Nature*, 311:756-759pp.
- Foster, K. and Saranak, J.,** 1988, Rhodopsin activation: A novel view suggested by in vivo *Chlamydomonas* experiments, *Journal of the American Chemical Society*, 110:6588-6589pp.
- Gaffal, K., el-Gammal, S. and Freidrichs, G.,** 1993, Computer-aided 3D-reconstruction of the eyespot-flagellar/basal apparatus-contractile vacuoles-nucleus-associations during mitosis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Endocytosis and Cell Research*, 9:177-208pp.
- Gorman, D.S. and Levine, R.P.,** 1965, "Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 54:1665-69pp.
- Govorunova, E.G., Sineshchekov O.A.,** 2005, Chemotaxis in the green flagellate alga *Chlamydomonas*, *Biochemistry (Mosc)*, 70:717-725.
- Grung, M., Kreimer, G., Calenberg, M., Melkonian, M. and Liaen-Jensen, S.,** 1994, Carotenoids in the eyespot apparatus of the flagellate green alga *Spermatozopsis similis*: Adaptation to the retinal-based photoreceptor, *Planta*, 193:38-43pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Grossman, A. R., Harris, E.E., Hauser, C., Lefebvre, P.A., Martinez, D., Rokhsar, D., Shrager, J., Silflow, C. D., Stern, D., Vallon, O. and Zhang, Z. D.,** 2003, *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics, *Eukaryotic Cell*, 2:1137–1150pp.
- Harris, E.H.,** 1989, “The *Chlamydomonas* Sourcebook. A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use”, San Diego: Academic Press.
- Harris, E. H.,** 2001, *Chlamydomonas* as a model organism, *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology*, 52:363–406pp.
- Harz, H. and Hegemann, P.,** 1991, Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*, *Nature*, 351:489-491pp.
- Harz, H., Nonnenga Oer, C. and Hegemann, P.,** 1992, The photoreceptor current of the green alga *Chlamydomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series:B*, 338:39-52pp.
- Heifetz, P.B., Förster, B., Osmond, C.B., Giles, L.J. and Boynton, J.E.,** 2000, Effects of Acetate on Facultative Autotrophy in *Chlamydomonas reinhardtii* Assessed by Photosynthetic Measurements and Stable Isotope Analyses, *Plant Physiology*, 122:1439–1446pp.
- Hegemann, P., Hegemann, U. and Foster, K.,** 1988, Reversible bleaching of *Chlamydomonas reinhardtii* rhodopsin in vivo, *Photochemistry and Photobiology*, 48:123-128pp.
- Hegemann, P., Neumeier, K., Hegemann, U. and Kuehnle, E.,** 1990, The role of calcium in *Chlamydomonas* photomovement responses as analysed by calcium channel inhibitors, *Photochemistry and Photobiology*, 52:575-583pp.
- Hegemann, P., Gaertner, W. and Uhl, R.,** 1991, M⁻-trans retinal constitutes the functional chromophore in *Chlamydomonas* rhodopsin, *Biophysical Journal*, 60:1477-1489pp.
- Hegemann, P.,** 1997, Vision in microalgae, *Planta*, 203:265-274.
- Holmes, J. and Dutcher, S.,** 1989, Cellular asymmetry in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Journal of Cell Science*, 94:273-285pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holland, E.M., Braun, F.J., Nonnenga Oer, C., Harz, H. and Hegemann, P.,** 1996, The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. I. Kinetics and influence of divalent cations, *Biophysical Journal*, 70:924-931pp.
- Holland, E.M., Harz, H., Uhl, R. and Hegemann, P.,** 1997, Control of phobic behavioral responses by rhodopsin-induced photocurrents in *Chlamydomonas*, *Biophysical Journal*, 73:1395-1401pp.
- Huang, K. and Beck, C.F.,** 2003, “Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Proceeding of National Academy of Science*, 100:9269-9274pp.
- Kantsler, V., Dunkel, J., Polin, M. and Goldstein, R.E.,** 2013, Ciliary contact interactions dominate surface scattering of swimming eukaryote, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:1182-1192pp.
- Kamiya, R. and Witman, G.,** 1984, Submicromolar levels of calcium control the balance of beating between the two flagella in demembrated models of *Chlamydomonas*, *The Journal of Cell Biology*, 98:97-107pp.
- Kateriya, S., Nagel, G., Bamberg, E. and Hegemann, P.,** 2004 “Vision ” in single celled algae, *News in Physiological Sciences*, 19:133–137.
- Keeling, P. J.,** 2010, The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series:B*, 365:729–748pp.
- Kindle, K.,** 1992, High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas*, *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America*, 87:1228-1232pp.
- Korolkov, S., Garnovskaya, M., Basov, A., Chunayev, A. and Dumler, I.,** 1989, The detection and characterization of G-proteins in the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Letters*, 270:132-134pp.
- Kreimer, G. and Melkonian, M.,** 1990, Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae, *European Journal of Cell Biology*, 53:101-111pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kreimer, G., Overlander, C., Sineshchikov, O., Stolzis, H., Nultsch, W. and Melkonian, M.,** 1992, Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant ey 627, mt (-), *Planta*, 188:513-521pp.
- Kreimer, G.,** 2009, The green algal eyespot apparatus: a primordial visual system and more, *Current Genetics*, 55:19–43pp.
- Kroger, P. and Hegemann, P.,** 1994, Photophobic responses and phototaxis in *Chlamydomonas* are triggered by a single rhodopsin photoreceptor, *FEBS Letters*, 341:5-9pp.
- Laemmli, U.K.,** 1970, ‘‘Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4’’, *Nature*, 227:680-685pp.
- Lamb, M., Dutcher, S., Worley, K. and Dieckmann, C.,** 1999, Eyespot-assembly mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, 153:721-729pp.
- Lawson, M., Zacks, D., Derguini, F., Nakanishi, K. and Spudich, J.,** 1991, Retinal analog restoration of photophobic responses in a blind *Chlamydomonas reinhardtii* mutant. Evidence for an archaebacterial like chromophore in a eukaryotic rhodopsin, *Biophysical Journal*, 60:1490-1498pp.
- Leliaert, F., Verbruggen, H. and Zechman, F. W.,** 2011, Into the deep: new discoveries at the base of the green plant phylogeny, *BioEssays*, 33:683–692pp.
- Leliaert, F., Smith, D.R., Moreau, H., Herron, M.D., Verbruggen, H., Delwiche, C.F. and Clerck, O.D.,** 2012, Phycology an Molecular Evolution of the Green Algae, *Critical Reviews in Plant Science*, 31:1-46pp.
- Lemaire, S.D., Guillon, B., Marechal, P.L., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M. and Decottignies, P.,** 2004, New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101:7475-7480pp.
- Linden, L. and Kreimer, G.,** 1995, Calcium modulates rapid protein phosphorylation/dephosphorylation in isolated eyespot apparatuses of the green alga *Spermatozopsis similis*, *Planta*, 197:343-351pp.
- Mast, S.O.,** 1916, The process of orientation in the colonial organism, *Gonium pectorale*, and a study of the structure and function of the eye-spot, *The Chlamydomonas Sourcebook Vol:1*, Harris E.H. (Eds.), San Diego, 64p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Melkonian, M. and Robenek, H.,** 1980, Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study, *Journal of Ultrastructure Research*, 72:90-102pp.
- Melkonian, M., Robenek, H. and Steup, M.,** 1981, Occurrence and distribution of lipid-sterol complexes in chloroplast envelope membranes of algae and higher plants as visualized by freeze fracture, *Protoplasma*, 109:349–358.
- Merchant, S. S., Prochnik, S. E., Vallon, O., Harris, E. H., Karpowicz, S. J., et al.,** 2007, The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, *Science*, 318:245–251pp.
- Mittelmeier, T.M, Thompson, M.D., Lamb, M.R., Lin, H. and Dieckmann, C.L.,** 2015, MLT1 links cytoskeletal asymmetry to organelle placement in *chlamydomonas*, *Cytoskeleton*, 72:113–123pp.
- Mittelmeier, T.M., Thompson, M.D., Öztürk, E. and Dieckmann, C.L.,** 2013. Independent localization of plasma membrane and chloroplast components during eyespot assembly, *Eukaryotic Cell*, 12:1258–1270pp.
- Mittelmeier, T.M., Boyd, J.S., Lamb, M.R., Dieckmann, C.L.,** 2011, Asymmetric properties of the *Chlamydomonas reinhardtii* cytoskeleton direct rhodopsin photoreceptor localization, *The Journal of Cell Biology*, 193:741–753pp.
- Mittelmeier, T.M. Berthold, B., Danon, A., Lamb, M.R., Levitan, A., Rice, M.E. and Dieckmann, C.L.,** 2008, C2 domain protein MIN1 promotes eyespot organization in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eukaryotic Cell*, 7:2100–2112pp
- Morel-Laurens, N. and Feinleib, M.,** 1983, Photomovement in an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas*, *Photochemistry and Photobiology*, 37:189-194pp.
- Morel-Laurens, N. and Bird, D.,** 1984, Effects of cell division on the stigma of wildtype and an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas*, *Journal of Ultrastructure Research*, 87:46-61pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Morisse, S., Michelet, L., Bedhomme, M., Marchand, C.H., Calvaresi, M., Trost, P., Fermani, S., Zaffagnini, M. and Stéphane S.D.,** 2014, Thioredoxin-dependent Redox Regulation of Chloroplastic Phosphoglycerate Kinase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *The Journal of Biological Chemistry*, 289:30012–30024pp.
- Nagel, G., Szellas, T., Huhn, W., Kateriya, S., Adeishvii, N., Berthold, P., Ollig, D., Hegemann, P. and Bamberg, E.,** 2003, “Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 100:13940-13945pp.
- Nakamura, K., Bray, D., Costerton, J. and Wagenaar, E.,** 1973, The eyespot of *Chlamydomonas eugametos*: a freeze-etch study, *Canadian Journal of Botany*, 51:817-819pp.
- Netto, L.E.S., Oliveira, M.A., Monteiro, G., Demasi, A.P.D., Cussiol, J.R.R., Discola, K.L., Demasi, M., Silva, G.M.,** 2007, Reactive cysteine in proteins: Protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146:180-193pp.
- Nonnenga Ber, C., Holland, E.M., Harz, H. and Hegemann, P.,** 1996, The nature of rhodopsin-triggered photocurrents in *Chlamydomonas*. 2. Influence of monovalent ions, *Biophysical Journal*, 70:932-938pp.
- O’Kelly, C. J.,** 2007, The origin and early evolution of green plants. In: *Evolution of Primary Producers in the Sea*, Falkowski, P. G. and Knoll, A. H., Eds., Elsevier Academic, Burlington, MA, 287–309pp.
- Pazour, G., Sineshchekov, O. and Witman, G.,** 1995, Mutational analysis of the phototransduction pathway of *Chlamydomonas reinhardtii*, *The Journal of Cell Biology*, 131:427-440pp.
- Pulcu, G.S., Mikhailova, E., Choi L.S. and Bayley, H.,** 2015, Continuous observation of the stochastic motion of an individual small-molecule walker, *Nature Nanotechnology*, 10:76-83pp.
- Purton, S. and Rochaix, J.D.,** 1995. “Characterisation of the ARG7 gene of *Chlamydomonas reinhardtii* and its application to nuclear transformation”, *European Journal of Phycology*, 30, 141-48.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Renninger, S., Backendorf, E. and Kreimer, G.,** 2001, Subfractionation of eyespot apparatuses from the green alga *Spermatozopsis similis*: isolation and characterization of eyespot globules, *Planta*, 213:51-63pp.
- Roberts, A.M.,** 2006, Mechanisms of Gravitaxis in *Chlamydomonas*, *Biological Bulletin*, 210:78-80pp.
- Roberts, D.G.W., Lamb, M.R., Dieckmann, C.L.,** 2001, Characterization of the EYE2 gene required for eyespot assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Genetics*, 158:1037–1049pp.
- Rochaix, J. D.,** 1995, *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast, *Annual Review of Genetics*, 29:209–230pp.
- Schaller, K., and Uhl, R.,** 1997, A microspectrophotometric study of the shielding properties of eyespot and cell body in *Chlamydomonas*, *Biophysical Journal*, 73:1573-1578pp.
- Schaller, K., David, R. and Uhl, R.,** 1997, How *Chlamydomonas* Keeps Track of the Light Once It Has Reached the Right Phototactic Orientation, *Biophysical Journal*, 73:1562-1562pp.
- Schmidt, M., Gebner, G., Luff, M., Heiland, I., Wagner, V., Kaminski, M., Geimer, S. et al.,** 2006, Proteomic analysis of the eyespot of *Chlamydomonas reinhardtii* provides novel insights into its components and tactic movements, *Plant Cell*, 18:1908–1930pp.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A. and Usuda, H.,** 1997, High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation, *Genetic*, 148:1821-1828pp.
- Sineshchekov, O., Govournova, E. and Litvin, F.,** 1989, Role of the photosynthetic apparatus and stigma in the formation of spectral sensitivity of phototaxis in flagellated green algae, *Biofizika*, 34:255-258pp.
- Sineshchekov, O.A., Jung, K.H. and Spudich, J.L.,** 2002, “Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*”, *Proceeding of National Academy of Science*, 99:8689-8694pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E., Tabata, S., Miura, K., Fukuzawa, H., Nakamura, S. and Takahashi, T., 2003, “Archaeal-type rhodopsins in Chlamydomonas: model structure and intracellular localization”, Biochemical and Biophysical Research Communications, 301:711-717pp.**
- Takahashi, T., Yoshihara, K., Watanabe, M., Kubota, M., Johnson, M., Derguini, R. and Nakanishi, K., 1991, Photoisomerization of retinal at 13-ene is important for phototaxis of Chlamydomonas reinhardtii. Simultaneous measurements of phototactic and photophobic responses, Biochemical and Biophysical Research Communications, 178:1273-1279.**
- Tamburic, B., Zemichael, F.W., Maitland, G.C. and Hellgardt, K., 2012, Effect of the Light Regime and Phototrophic Conditions on Growth of the H₂-producing Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*, Energy Procedia, 70:710-719pp.**
- Therien, J.B., Zadvornyy, O.A., Posewitz, M.C., Bryant D.A. and John W Peters, J.W., 2014, Growth of Chlamydomonas reinhardtii in acetate-free medium when co-cultured with alginate-encapsulated, acetate-producing strains of Synechococcus sp., Biotechnology for Biofuels, 7:154p.**
- Thompson, M., 2016, Channelrhodopsin-1: Cellular Localization and Role in Eyespot Assembly and Placement in Chlamydomonas reinhardtii.**
- Trippens, J., Greiner, A., Schellwat, J., Neukam, M., Rottmann, T., Lu, Y., Kateriya, S., Hegemann, P. and Kreimer, G., 2012, “Phototropin Influence on Eyespot Development and Regulation of Phototactic Behavior in Chlamydomonas reinhardtii”, Plant Cell, 11:4687-4702pp.**
- Uhl, R., Desel, H. and Wagner, R., 1987, Separation and characterization of light scattering transients from rod outer segments of vertebrate photoreceptors: design and performance of a multiangle flash photolysis apparatus (MAFPA), Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 11:1-14pp.**

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- University of the Basque Country**, “Yeast counts in Neubauer *improved* or Thoma counting chambers” http://insilico.ehu.es/counting_chamber/thoma.php (Erişim tarihi: 1 Ağustos 2017).
- Yamano, T., Iguchi, H. and Fukuzawa, H.**, 2012, Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1-4pp.
- Yang, S. and Tsuboi, M.**, 1999, Polarizing microscopy of eyespot of *Chlamydomonas*: in situ observation of its location, orientation, and multiplication, *Biospectroscopy*, 5:93-100pp.
- Yoshimura, K., Kamiya, R., Hirona, M., Isogai, N. and Okita, N.**, 2005, Phototactic activity in *Chlamydomonas* ‘nonphototactic’ mutants deficient in Ca_2^+ dependent control of flagellar dominance or in innerarm dynein, *Journal of Cell Science*, 118: 529-537pp.
- Wallin, I.E.**, 1927, *Symbiöticizm and the origin of species*, Baltimore: Williams & Wilkins Company, 171p.
- Walne, P. and Arnott. H.**, 1967, The comparative ultrastructure and possible function of eyespots: Euglenagranulata and *Chlamydomonas eugametos*, *Planta*, 77:325-353pp.
- Witman, G.B.**, 1993, *Chlamydomonas* phototaxis, *Trends in Cell Biology*, 3:403–408pp.
- Zheng, Y., Chi, Z., Lucker, B. and Chen, S.**, 2012, Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production, *Bioresource Technology*, 103:484-488pp.

ÖZGEÇMİŞ

Esra ÖZTÜRK YİĞİT, Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olup, 10.04.1985 tarihinde Sakarya'da doğmuştur. İlk öğrenimini, Hendek Atikehanım İlkokulu (1991-1993) ve Hendek Cumhuriyet İlkokulunda (1993-1996), orta öğrenimi ve lise öğrenimini Hendek Atikehanım Anadolu Lisesi'nde tamamlamıştır. 2003 yılında bu liseden mezun olduktan sonra aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne girmiştir. 2008 yılında Çevre Ağırlıklı Öğretim Programı'nda "Aquaporinler" konulu lisans tezini tamamlamış ve Biyolog diploması alarak mezun olmuştur. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı Hidrobiyoloji Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başlamış ve 2010 yılında Yüksek Lisans eğitimini "Chlamyopsin-5 Sensory Rhodopsin (Cop5) Protein Ekspresyonunun Işığa Bağlı Değişiminin RT-PCR Metodu İle Belirlenmesi" konulu tezini vererek tamamlamıştır. 2010 yılında aynı anabilim dalında doktora eğitimine başlamış ve aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başlamıştır. Halen Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.