



**OMURGASIZLARDA YENİ BULUNAN ATP
BAĞIMLI DNA LİGAZ II (LİGII) ALT-AİLESİNİN İLK
ÜYESİ *Tetrahymena thermophila* TtLigII-1
ENZİMİNİN HÜCRESEL GÖREVİNİN
TANIMLANMASI**

Doktora Tezi

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Eskişehir 2023

**OMURGASIZLARDA YENİ BULUNAN ATP BAĞIMLI DNA LİGAZ II (LİGII)
ALT-AİLESİNİN İLK ÜYESİ TETRAHYMENA THERMOPHILA TTLİGII-1
ENZİMİNİN HÜCRESEL GÖREVİNİN TANIMLANMASI**

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Doktora Tezi

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2023

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen 1403F088 no.lu proje ve 112T422 no.lu TÜBİTAK-1001 projeleri kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Nurçin KÜÇÜKOĞLU'nun OMURGASIZLARDA YENİ BULUNAN ATP BAĞIMLI DNA LİGAZ II (LİGII) ALT-AİLESİNİN İLK ÜYESİ TETRAHYMENA THERMOPHILA TTLİGII-1 ENZİMİNİN HÜCRESEL GÖREVİNİN TANIMLANMASI başlıklı çalışması 20/01/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek “Eskişehir Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği”nin ilgili maddeleri uyarınca, Moleküler Biyoloji Anabilim dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Unvan Adı Soyadı

İmza

Üye

: Prof. Dr Sezai TÜRKEK

Üye

: Prof. Dr. Mehmet İNAN

Üye

: Prof.Dr. Nalan YILMAZ SARIÖZLÜ

Üye

: Prof. Dr. Zerrin SALTAN

Üye

: Doç. Dr. Onur ÖZTAŞ

Prof. Dr. Murat TANIŞLI

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

20/01/2023

DANIŞMAN ONAYI

Danışmanlığını yürüttüğüm Doktora öğrencisi Nurçin KÜÇÜKOĞLU, OMURGASIZLARDA YENİ BULUNAN ATP BAĞIMLI DNA LİGAZ II (LİGII) ALT-AİLESİNİN İLK ÜYESİ TETRAHYMENA THERMOPHILA TTLİGII-1 ENZİMİNİN HÜCRESEL GÖREVİNİN TANIMLANMASI başlıklı tez çalışmasını tamamlamıştır. Hazırlamış olduğu tez tarafımdan incelenmiş ve öğrencinin tez savunma sınavına alınması bilimsel ve etik açıdan uygun görülmüştür.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

ÖZET

OMURGASIZLARDA YENİ BULUNAN ATP BAĞIMLI DNA LİGAZ II (LİGII) ALT-AİLESİNİN İLK ÜYESİ TETRAHYMENA THERMOPHILA TTLİGII-1 ENZİMİNİN HÜCRESEL GÖREVİNİN TANIMLANMASI

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Bilim Dalı

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2023

Danışman: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

Genomların korunması, tamiri ve genetik çeşitliliğinde DNA Ligaz enzimleri görev alır. Omurgalı canlılarda ATP bağımlı DNA Ligaz I, III ve IV bulunurken mitokondriyal genom replikasyonu ve tamirinde görev alan Ligaz III omurgasız ökaryotlarda bulunmaz. Omurgasız ökaryot grubunda yer alan tek hücreli ve silli bir model organizma olan *Tetrahymena thermophila* kalıtsal ve yaşamsal olayları yöneten mikroçekirdek (MİK) ve makroçekirdeğe (MAK) ile mitokondriyal genoma sahiptir. Eşeyli üremede yoğun genom düzenlenmesi ile MİK'den MAK oluşur. *T. thermophila* genomunda iki Ligaz I, bir Ligaz IV ile bir de hipotetik Ligaz geni bulunur. Bu tez kapsamında; hipotetik Ligaz geninin in silico, in vivo ve in vitro yöntemlerle ligasyon kabiliyeti, çekirdekte genom düzenlenmesi ile mitokondriyal genomun replikasyon ve tamirindeki olası görevlerinin araştırılması amaçlanmıştır. Filogenetik ağaç analizi; sadece omurgasız ökaryotik canlılarda bulunan bu çalışma ile Ligaz II adı verilen yeni bir ligaz alt ailesinin varlığını ve bu hipotetik ligaz enziminin (TtLigII) bu aile ailenin üyesi olduğunu ortaya koymuştur. *T. thermophila*'da rekombinant üretilerek saflaştırılan TtLigII-6xHis enzimi in vitro DNA ligaz aktivite reaksiyonunda, yapışkan uçlu DNA parçalarını birleştirme aktivitesine sahiptir. TtLigII-sfGFP füzyon proteini mitokondrilerde ve konjugatif hücrelerin MİK ve MAK'larına lokalize olmuştur. Bu tez çalışması ile ökaryotik ATP bağımlı DNA Ligaz ailesinin LigI, LigIII ve LigIV alt aileleri yanında LigII alt ailesine de sahip olduğu; ilk üye TtLigII'nin ise çekirdek ile mitokondrilerde DNA tamirinde görev alabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Tetrahymena, DNA Tamiri, Genom Reorganizasyonu, DNA Ligaz.

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF THE CELLULAR ROLE OF THE TETRAHYMENA
THERMOPHILA TTLIGII-1 ENZYME THAT THE FIRST MEMBER OF THE
NEWLY DEFINED ATP-DEPENDENT DNA LIGASE II (LIGII) SUBFAMILY IN
INVERTEBRATES

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Department of Molecular Biology

Programme in Biology

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2023

Supervisor: Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU

DNA ligase enzymes are involved in the protection, repair and genetic diversity of genomes. While ATP-dependent DNA Ligase I, III and IV are found in vertebrates, Ligase III, which is involved in mitochondrial genome replication and repair, is not found in invertebrate eukaryotes. Single-celled ciliated *Tetrahymena thermophila*, which is under the invertebrate eukaryotes, has a genome of mitochondria, micronucleus (MIC) and macronucleus (MAK) that direct hereditary and somatic events. In sexual reproduction, MAK is formed from MIC by intense genome editing. *T. thermophila* genome contains two Lig I, one Lig IV and one hypothetical Ligase gene. Within the scope of this thesis; it is aimed to investigate with in silico, in vivo and in vitro methods whether the hypothetical Ligase gene has ligase activity, and whether it can take part in nuclear and mitochondrial genome repair as well as replication. Maximum likelihood phylogenetic tree analysis revealed that this hypothetical ligase enzyme (TtLigII) is actually a member of a new ligase subfamily called Ligase II, which is only found in invertebrate eukaryotic organisms. TtLigII-6xHis enzyme, which was produced recombinantly in *T. thermophila* and purified affinitically, has the repair activity of phosphodiester nicks in dsDNA fragments showed by ligating these fragments in in vitro DNA ligase activity reaction. TtLigII-sfGFP was localized into mitochondria, MIC and developing MAC in conjugation. This thesis study concluded that the eukaryotic ATP-dependent DNA Ligase family has a new subfamily called LigII next to the well studied LigI, LigIII and LigIV subfamilies and that its first member, TtLigII, could possibly take role in the repair of nuclei and mitochondria dsDNA nicks.

Keywords: *Tetrahymena*, DNA Repair, Genome Reorganization, DNA Ligase.

TEŞEKKÜR

Danışman hocam sayın Prof. Dr. Muhittin ARSLANYOLU'na lisansüstü çalışmalarım süresince sonsuz deneme ve hata yapma şansı bulduğum bir çalışma ortamı yarattığı için teşekkür ederim.

Araştırmalarımızı değerli bulup projeler aracılığıyla fonlayan TÜBİTAK'a katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışma konumu anlamadığı halde zaman zaman anlatmamı isteyen ve heyecan duyan babam merhum Celal KÜÇÜKOĞLU'na, uzun soluklu doktoram süresince her koşulda yanımda olan tüm aileme teşekkür ederim; heyecanlarını, desteklerini ve umutlarını hissetmek çok kıymetliydi.

Birlikte çalışma şansı bulduğum tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Deney aralarındaki sohbetlerimiz için sevgili arkadaşım Dr. Sinem “Western Queen” DABAĞOĞLU PSAV'a, akademik heyecanının bulaşıcılığı ile verdiği ilham için canım arkadaşım Dr. Erhan “Ciliathusiast” ASLAN'a ne kadar teşekkür etsem azdır.

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Nurçin KÜÇÜKOĞLU

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	12
1.1. DNA Tamiri	12
1.2. DNA Ligazlar	13
1.3. <i>Tetrahymena thermophila</i>	13
1.4. Amaç ve hipotez.....	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
2.1. Biyoinformatik Çalışmalar.....	28
2.1.1. Filogenetik ağaç	28
2.1.2. 3-Boyutlu modelleme.....	29
2.2. Deneyisel Çalışmalar.....	29
2.2.1. Plazmitlerin yapılandırılması ve transformasyon	29
2.2.2. Enzimatik üretim, saflaştırma ve in-vivo aktivite karakterizasyonu	30
2.2.3. Hücre içi lokalizasyon ve mikroskopi.....	33
3. BULGULAR.....	344
3.1. Biyoinformatik Analiz Bulguları	34
3.1.1. Filogenetik ağaç	34
3.1.2. DNA Ligazların 3 Boyutlu Yapı Modellemesi ile Görev İlişkisi	388
3.1.3. <i>Tetrahymena thermophila</i> DNA Ligazlarının vejetatif büyüme, açlık ve konjugasyon boyunca mRNA ifade değişimi	42
3.2. Deneyisel Bulgular	43
3.2.1. <i>T. thermophila</i> Lig II alt ailesi üyesi TtLig II'nin konjugasyon boyunca hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi	43

3.2.2 TtLigII'nin <i>Tetrahymena thermophila</i> 'da homolog ifade sistemi ile rekombinant üretimi, afinitik saflaştırılması ve ligaz aktivite tayini	45
4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	544
4.1. Sonuç	544
4.2. Tartışma	54
4.2.1. Rekombinant TtLigII enzimi ligaz aktivitesine sahiptir.....	55
4.2.2. PFAM ve filogenetik analiz bulguları literatür ile uyum içindedir	56
4.2.3. Tip 1 Katalitik Birimine sahip LigI, LigIII ve LigIV DNA ligazları arke ligazlarından köken alır	57
4.2.4. Tip 2 Katalitik Birim taşıyan ligazlar viral kökenlidir.....	58
4.2.5. Omurgasızlarda kaybedilen atasal LigIII yerine LigII görev yapıyor olabilir mi?	61
4.2.6. TtLigII'nin görev yeri mitokondri ile çekirdektir.....	63
4.3. Öneriler	70
KAYNAKÇA.....	72
EKLER	79
ÖZGEÇMİŞ	88

TABLÖLAR/ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Ökaryotik canlılarda yaygın olarak bulunan DNA Ligaz enzimlerinin biyolojik görevleri ve görev zamanlar	20
Tablo 2.1. Bu çalışmada oluşturulan vektörler ve hücre hatları.	30
Tablo 3.1. Ligasyon reaksiyon tamponlarının karşılaştırılması. T4 Ligase Buffer içeriğinin QLB'den temel farkı DNA'yı yoğunlaştıran PEG 6000 içermemesidir.	50
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan DNA Ligaz üyelerinin PFAM analizleri. Bu analiz ile katalitik merkezlerini oluşturan temel protein ailelerinin korunmuş şekilde farklılık gösterdiği görülür.	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. DNA Ligazların reaksiyon basamakları.	14
Şekil 1.2. DNA Ligazların yapısal özellikleri.	15
Şekil 1.3. DNA Ligaz I'in yapısal farklılaşması.	18
Şekil 1.4. DNA Ligaz IV'ün yapısal farklılaşması.....	19
Şekil 1.5. Çekirdek ve mitokondride görev alan Ligaz III'lerin yapısal farklılaşmalarının şematik gösterimi.	20
Şekil 1.6. Omurgasız çekirdek ve mitokondri DNA'larının replikasyonu ve tamirinde görev alan DNA Ligaz I İzoformları.....	21
Şekil 1.7. Tetrahymena thermophila'nın konjuasyon safhaları..	23
Şekil 1.8. MAK gelişimi esnasında meydana gelen DNA reorganizasyon olaylarından biri olan minikromozom oluşumu ve endoreplikasyonun şematik gösterimi.25	
Şekil 1.9. IES'lerin çıkarılmasının şematik gösterimi.	26
Şekil 2.1. TtLigII geninin 10xHis ya da sfGFP takılı olarak klonlandığı ekstra kromozomal vektörler.	30
Şekil 3. 1. ATP bağımlı DNA Ligaz enzimlerinin katalitik birimlerini oluşturan iki temel domaininden biri olan OBD'ye göre şematik kategorizasyonu.	34
Şekil 3.2. Canlılar aleminde bulunan ATP bağımlı DNA ligazların maksimum likelihood filogenetik ağaç analizi.	37
Şekil 3.3. TtLigII için yapılan Swiss Model analizinde elde edilen lokal ve domainsel katlanmalar.....	38
Şekil 3.4. TtLig2'nin Swiss Model'den elde edilen lokal katlanmalarının Alpha Fold ile elde edilen tahmini katlanma üzerine örtüştürülmesi..	39
Şekil 3.5. Ligaz II alt ailesi üyelerinden 4'ünün AlphaFold program ile 3B yapı modellemesi.	40
Şekil 3.6. Tetrahymena thermophila DNA Ligazlarının 3B yapı modellerinin karşılaştırılması.	40

Şekil 3.7. Ökaryotik ligaz alt ailelerinin dikey hizalamaları ile elde edilen motif bilgileri.....	41
Şekil 3.8. Vegetatif, Açlık ve Konjugasyon boyunca Tetrahymena ligazlarının mRNA ekspresyon seviyelerinde değişimler.	42
Şekil 3.9. Konjugasyon sırasında C-terminal GFP takılı LigII'nin hücre içindeki lokalizasyonu.	44
Şekil 3.10. TtLigII-10xHis'in hipotonik ve nükleer liziz tamponu ile izolasyon denemesinin anHis antikoru ile western blot analizi.	46
Şekil 3.11. TtLigII-10xHis rekombinant proteininin izolasyon ve afinitik saflaştırılması.	47
Şekil 3.12. Biyoreaktör kültür hücrelerinden protein ekstratının izolasyonu ve TtLigII-10xHis'in afinitik saflaştırılması.....	48
Şekil 3.13. TtLigII-10xHis'in λ faj EcoRI/HindIII ile parçalanmış DNA parçalarını ligasyon analizi.).	49
Şekil 3.14. QLB ve T4 ligaz tamponu LB ile 25 ve 30°C'lerde gerçekleşen ligasyon reaksiyonları.....	51
Şekil 3.15. TtLigII-10xHis'in T4 Ligasyon tamponundaki ligasyon aktivitesi sonucu ürünlerin oluşma verimliliği.....	53
Şekil 3.16. TtLigII-10xHis'in T4 Ligasyon tamponundaki ligasyon aktivitesi sonucu ürünlerin oluşma verimliliği.....	53
Şekil 4.1. PFAM veri tabanında “Katalitik Birim 2” taşıyan organizmaların genel gruplaşma haritası	59
Şekil 4.2. <i>T. thermophila</i> DNA Ligaz enzimlerinin konjugasyon süresince ekspresyon seviyelerinin hücresel olaylarla ilişkisi.	64
Şekil 4.3. TtLigII enziminin vejetatif hücrelerdeki lokalizasyon paterni.	65
Şekil 4.2. IES eliminasyonunda oluşan DNA substratları ile Ku80/LigazIV bağımsız mekanizmalarının karşılaştırılması..	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bç	: baz çifti
Cd	: Kadmiyum
DNA	: deoksiribonükleik asit
Rpm	: round per minute
WT	: wild type (yabanıl ırk)
KO	: Knockout
Kb	: kilo baz
kDa	: kilo dalton
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mM	: milimolar
Mg	: Magnezyum
µM	: mikromolar
RNA	: ribonükleik asit
S	: saat
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
WB	: western blot

1. GİRİŞ

Canlılar aleminde genomun bütünlüğünün korunması sadece hücrel faaliyetlerin sürdürülebilirliği için değil, türün devamı için de çok önemlidir. Canlıların DNA'sında her gün meydana gelen 100.000 civarında mutasyonun sürekli kontrolü ve tamiri oldukça hassas ve karmaşık bir mekanizmayla sağlanır (Hoeijmakers, 2009).

1.1. DNA Tamiri

DNA tamiri temelde tek ve çift zincir kırık tamiri olarak kategorize edilir. Tek zincir kırık tamirleri (Single Strand Breaks/SSB); Baz Çıkarma Tamiri (Base Excision Repair/BER), Nükleotid Çıkarma Tamiri (Nucleotide Excision Repair/NER) ve Yanlış Eşleşme Tamiri (Mismatch Repair/MMR) şeklinde sınıflandırılırken çift zincir kırık (Double Strand Breaks/DSB) tamirleri ise Homolog Olmayan Uçların Birleştirilmesi (Non-homologous End Joining/NHEJ) ve Homolog Rekombinasyon (HR, Homologous Recombination/HR) mekanizmalarıdır (Iyama ve Wilson, 2013). Bakteri ve maya çalışmaları ile ilk temelleri atılan, memeli hücreleri ile detaylandırılan tamir yollarının görev zamanını DNA hasarının yapısı ve hücre döngüsü belirler.

DNA'nın deaminasyon, oksidasyon ve metilasyondan kaynaklanan fakat DNA sarmal yapısında bozulmaya neden olmayan küçük baz lezyonları, Baz çıkarma tamiri (BER) ile düzeltilir. Hasarın tanınmasıyla başlayan tamir, ikinci basamakta hatalı bazın bir glikozilaz enzimiyle deoksiriboz şekerden kesilip uzaklaştırılması ile devam eder ve son adımda bazsız şeker zincirden kesilip uzaklaştırılır; eksik baz polimerizasyon ve zincirin kalanı ile birleştirilerek tamir tamamlanır. Tüm bu işlemler tamir kompleksinin bileşenlerinin farklılık gösterdiği, kısa yamalı BER (short patch BER, spBER) ya da uzun yamalı BER (long patch BER, lpBER) adı verilen iki alt mekanizmadan biriyle gerçekleştirilir (Krokan ve Bjoras, 2013). spBER sadece hatalı bazın çıkarılıp doğrusunun eklenerek ligasyonunu sağlarken, lpBER hatalı baz ile birlikte 3' ucundaki birkaç ekstra bazın da çıkarılıp yeniden polimerize edildiği bir mekanizmadır (Izumi ve Mellon, 2016). Bu farklılaşmaya ek olarak spBER hücre döngüsünün hangi aşamada olduğuna bağlı olmaksızın çekirdek ve mitokondri DNA'sının tamirinde baskın olarak görev almaktayken, genellikle S fazındaki hücre çekirdeklerinde lpBER görev alır (Krokan, 2013). Tamirin ilk adımında hasarı belirleyen tanıma faktörü, yola hangi BER mekanizması ile devam edileceğinde de söz sahibidir.

Nükleotit çıkarma tamiri (NER); UV, mutajen ya da çeşitli kemoterapi ajanlara maruz kalma sonucu, DNA heliks yapısında değişiklik oluşturacak şekilde nükleotitlerde meydana gelen “bulky” lezyonlarda görev alır (Hoeijmakers, 2009). Heliks yapısında çıkıntıya neden olan hatalı nükleotit çıkarılır, doğrusu polimerize edilir ve kalan zincire bağlanır (Goosen, 2013). Tüm hücresel safhalarda görev alan NER bileşenlerinden oluşan tamir mekanizmasına global genom NER (ggNER) denir. Bazen “bulky” nükleotitler transkripsiyonun duraksamasına neden olur; bu durumda ggNER’de görev alan faktörlerden farklı faktörlerin organizasyonu ile transkripsiyon bağımlı NER (transcription coupled NER/ tcNER) mekanizması devreye girer (Goosen, 2013; Hu vd., 2015).

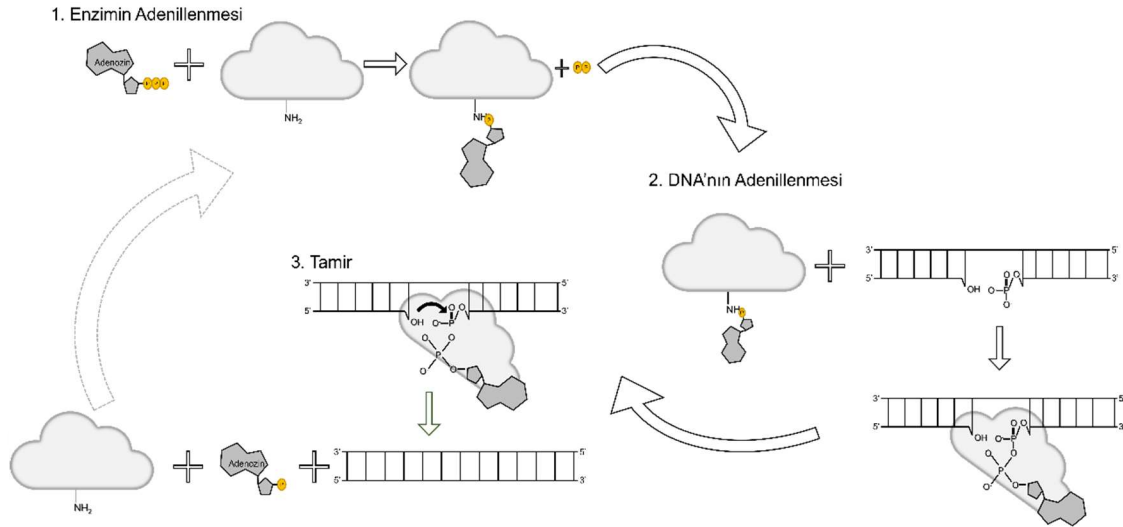
Çift zincir kırıklarının tamiri homolog rekombinasyon (HR) ve homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) mekanizmaları ile gerçekleştirilir. HR işleyiş prensibi gereği kardeş kromatidin varlığına ihtiyaç duyar ve bu nedenle sadece S ve G2 evresindeki hücrelerde meydana gelir. Genellikle G1 evresindeki hücrelerde, yani kardeş kromatidin olmadığı durumlarda, homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) mekanizması aktiftir (Iyama ve Wilson, 2013).

Yukarıda bahsi geçen ve son derece karmaşık bir mekanizma ile düzenlenen tamir yollarının her biri kırık DNA’nın ligaz enzimi ile birleştirilmesiyle sonlanır. Bu nedenle tezin kapsamı olan DNA ligaz enzim konusu dışında kalan DNA tamir yollarına değinilmemiştir.

1.2. DNA Ligazlar

DNA’nın replikasyonu, rekombinasyonu ve tamirini içeren biyolojik olaylar esnasında çift zincirli DNA üzerinde oluşan çentiklerin (DNA’nın fosfat-riboz iskeletinde bir fosfodiester kovalent bağ eksikliği) *in vivo* tamirini, DNA ligazlar gerçekleştirir. Ligasyon reaksiyonu tüm DNA Ligazlar için korunmuş olup, üç basamakta meydana gelir; (i) enzimin adenilasyonu, (ii) DNA’nın adenilasyonu ve (iii) tamir. Ligasyonun ilk adımı olan adenilasyon aşaması; tüm ligazların ortak motiflerinin ilki olan K(x)DG(x)R motifinin lizin (K) amino asidine bir AMP molekülünün bağlanmasıyla gerçekleşir. Ardından, ikinci aşamada, bu AMP molekülü kırık DNA zincirinin 5' fosfat ucuna aktarılır. Son aşamada ise kırık DNA’nın 3' ucunun hidroksil grubu AMP bağlı 5' fosfat

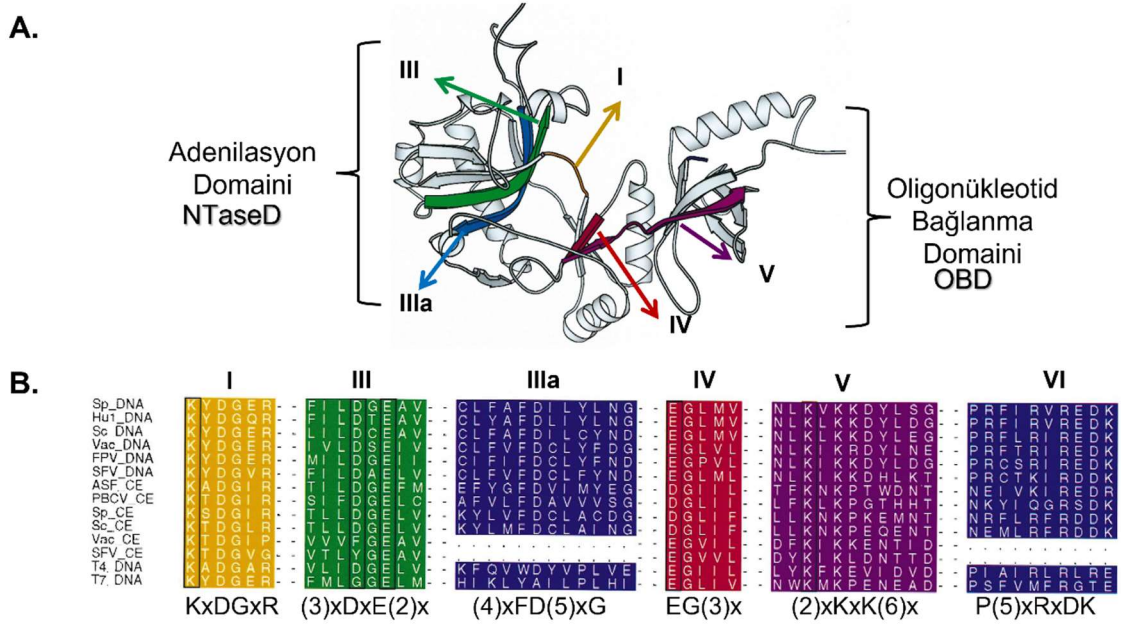
ucuna nükleofilik atak yapmasıyla, kırık tamir edilir ve ortama bir AMP molekülü salınır (Timson vd., 2000; Tomkinson vd., 2006; Ellenberger ve Tomkinson, 2008) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. DNA Ligazların reaksiyon basamakları. Detaylı bilgi metinde verilmiştir.

Ligasyon mekanizmasından anlaşılacağı üzere enzim adenillenme ve DNA'ya bağlanma kabiliyetine sahip olmalıdır; yani DNA Ligaz enzimlerinin en küçük işlevsel yapısını Nükleotidil Transferaz Domaini (NTaseD) ile Oligonükleotid Bağlanma Domaini (OBD) oluşturur. Ökaryotik Ligazlar bu ikisine ek olarak N-terminallerinde DNA'ya bağlanma domaini (DBD) de taşır. Genel itibariyle görevlerine bakıldığında, Nükleotidil Transferaz domaini enzimin katalitik merkeziyle birlikte korunmuş 6 motiften ilk 5'ini içerir ve hem self-adenilasyonu hem de substrat adenilasyonunda görevlidir (Timson vd., 2000; Sallmyr vd., 2020). Oligonükleotid Bağlanma Domaini, ligasyon aktivitesi için vazgeçilmez olan 6. korunmuş motifi içerir ve enzim üzerinde iki konformasyonu bulunur. İlki 6. motifin NTase domaine yakın olduğu pozisyonudur ve enzimin self-adenilasyonu için gereklidir ve adenilasyon sonrasında modülü terk etmeleri için ATP'nin beta ve gama fosfatlarına bağlanarak yönlendirir. Adenilasyon sonrasında NTase'dan uzak bir konformasyon ile DNA'ya bağlanarak substratın stabilizasyonunu sağlar (Williamson vd., 2014; Williamson ve Leiros, 2019). Ökaryotik ligazların DNA bağlanma domaini ise substratın enzim içindeki stabilizasyonunu sağlamakla görevlidir, DBD'nin bulunmadığı yapılarda ligasyon verimi düşmekle birlikte

ligasyon tamamlandıktan katalitik bir görevi olmadığı bildirilmiştir (Şekil 1.2) (Rossi vd., 1997; Cherepanov ve deVries, 2003).



Şekil 1.2. DNA Ligazların yapısal özellikleri. A. Katalitik aktivite gösteren iki temel domainden oluşan PBCV Ligaz'ın deneysel 3 Boyutlu yapısı ve korunmuş motifleri. B. Tüm ATP bağımlı DNA Ligazlar için korunmuş 6 motif görülmektedir (Timson, vd., 2000). Detaylı bilgi metinde verilmiştir.

Tüm ligazların NTaseD ve OBD dizileri incelendiğinde 6 korunmuş motif bulunmaktadır (Şekil 1.2). İnsan LigI, Vaccinia virus ile T4 Ligazlarında yapılan mutasyon analizleri ile OBD'deki 6. motifin görevleri hakkında ilk bilgiler elde edilmiştir. Buna göre ilk motifteki lizin enzimin adenillenmesi için elzemken T4 çalışmasında oluşturulan diğer mutant versiyonlar enzimin N-terminalindeki dizinin katalitik olmadığını ve 6. motifin enzimin adenillenmesi için elzem olduğunu ortaya koymuştur (Kodama vd., 1991; Rossi vd., 1997; Sekiguchi ve Shuman, 1997). Kristal yapı çalışmaları bu motiflerden I, IIIa ve IV'ün ATP'nin temas edebileceği hidrofobik bir cep oluşturduğunu, motif I, III ve V'in AMP'nin oksijenlerine bağlandığını, motif VI'nın ATP'nin 2. ve 3. fosfatlarına bağlanarak modülü terketmek için yönlendirdiğini ortaya koymuştur. Motif I ve Motif V'teki korunmuş Lizinler enzimin adenilasyonu için esansiyel olup, reaksiyonun ikinci basamağında DNA'nın adenillenmesi sonrasında bu adenil grubunu bükerek kırığın 5' ucunu 3' OH grubunun nükleofilik atağı için hazır duruma getirir (Subramanya ve Doherty, 1996; Williamson vd., 2018). Tüm bu aşamalarda ATP bağımlı ligazların 2 adet divalent katyon ihtiyacı olduğu da belirlenmiştir; bunlardan ilki katalitik olarak görev yapmaktadır ve aktif merkezdeki

lizinin AMP ile bağ kurabilir elektrostatik duruma getirmesinin yanısıra motif I, III ve IV ile ATP'nin ilk fosfatına bağlanarak enzimin adenillenmesini sağladığı bildirilmiştir. İkincil divalent katyon ise VI. motif ve ATP'nin 2. ve 3. fosfatlarına bağlanarak modülü terk etmeleri için yönlendirir (Unciuleac vd., 2015; Unciuleac vd., 2017; Williamson ve Leiros, 2019). NAD⁺ bağımlı Ligazlar'da VI. motifin bu görevini 1a domaini yerine getirirken ATP bağımlı ligazların aksine tek bir divalent katyon işlev göstermesi için yeterlidir (Unciuleac vd., 2019).

Tüm DNA Ligazlar reaksiyon mekanizmasında izah edildiği üzere AMP donörü olan bir kofaktöre ihtiyaç duyarlar; bu nedenle kullandıkları kofaktöre göre NAD⁺ ya da ATP bağımlı DNA Ligazlar olarak 2 ana gruba ayrılırlar (Wilkinson vd., 2001; Tomkinson vd., 2006).

ATP bağımlı DNA Ligazların 3-Boyutlu yapıları incelendiğinde, NTaseD ve OBD'lerin açılıp kapanabilen bir yapıda olmasını sağlayan, bu hareketle DNA'yı adeta bir kıskaç gibi sarmalarını mümkün kılan son derece esnek bir linker ile birbirlerine bağlı oldukları bildirilmiştir (Williamson vd., 2014; Williamson ve Leiros, 2020). Bu iki domainin PFAM analizleri; NTaseD'nin tüm ATP bağımlı DNA Ligazlar da korunmuş ortak bir domain olduğunu (PF01068) ve enzimatik aktivite için elzem olan ilk 5 motifin bu domainde yer aldığını raporlanmıştır. Fakat sadece 6. motifi taşıyan OBD'nin ökaryot ve prokaryot organizmalarda ayırım gösteren iki farklı PFAM ile temsil edildiği bulunmuştur (Williamson vd., 2016). DNA Ligazların 3 boyutlu katlanmaları ve reaksiyon mekanizmaları son derece korunmuş olsa da bu korunmuş domainlerin dizisel benzerlikleri %20 civarındadır (Simsek ve Jasin, 2011).

NAD⁺ bağımlı DNA ligazlar PFAM analizlerine göre NTaseD'de tüm diğer ligaz gruplarından farklılık gösterir. Öbakteriler ve entomopox virüslerde dağılım gösteren NAD⁺ bağımlı DNA ligazlar bakteri dünyasında replikasyonda birincil olarak görev alarak Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesini sağlar ve elzemdirler (Tomkinson vd., 2006; Williamson vd., 2016). Yapıları minimal ligaz enzimi organizasyondan ilave domainlerin eklenmesi ile farklılık gösterir; bu çekirdek domainsel yapının N-terminalinde 1a ismi verilmiş ilave bir domain ile C-terminalinde BRCT domaini bulunmaktadır. Bakterilerde NAD⁺ bağımlı "housekeeping" DNA ligaz (LigA) yanı sıra ATP bağımlı DNA ligazlar da bulunabilmektedir. Williamson ve arkadaşları PFAM analizi ile bakterilerdeki ATP bağımlı DNA ligazların filogenetik ilişkilerini incelemiş ve

B, C, D ve E olarak 4 alt gruba ayrıldığını bildirmiştir (Williamson vd., 2016). Bunlardan B, C ve D'nin yaygın bir dağılım ile prokaryotik dünyada farklı kombinasyonlarla bulunduğu; E'nin ise bir iki istisna dışında Gammaproteobacteria sınıfıyla sınırlı bir dağılım gösterdiği ve bulunduğu bakterilerin tek ATP bağımlı DNA Ligaz enzimi olduğu bulunmuştur (Williamson vd., 2016). Görevlerine bakıldığında, C'nin BER'de görev aldığı, D'nin Ku enzimleriyle birlikte NHEJ'de görev yaptığı, B ve E alt grubu üyelerinin olasılıkla çentik tamirinde rol oynadığı öne sürülmüştür (Williamson vd., 2016; Williamson ve Leiros, 2020). Gammaproteobacteria sınıfıyla sınırlı Lig E alt grubunun domain analizleri diğer 3 bakteriyel ATP Bağımlı DNA Ligaz alt grubundan farklı tipte domain taşıdığını; filogenetik ağaç analizleri ise diğer alt grup üyeleri olan B, C ve D gibi arke ligazlarına değil bakteriyofaj ligazlarına yakınlık gösterdiğini göstermiştir (Williamson vd., 2016).

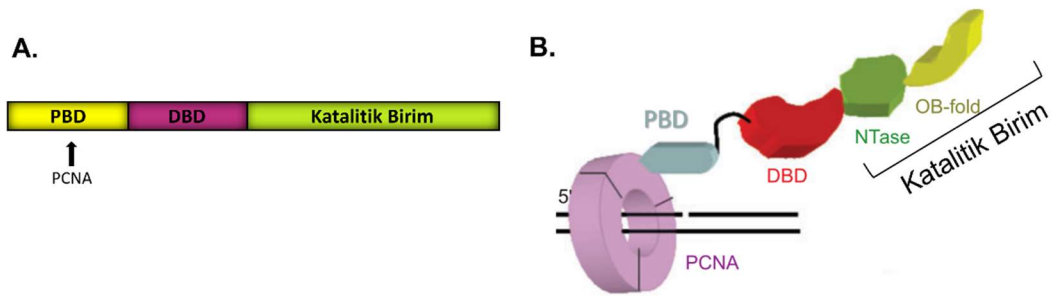
Bakterilerde NAD⁺ bağımlı DNA ligazlar yanında ikincil olarak bulunan ATP bağımlı DNA ligazlar esasen bakteriyofajlar, virüsler, arkeler ve ökaryotlarda bulunur replikasyon, rekombinasyon ve tamirde rol oynarlar (Tomkinson vd., 2006; Ellenberger ve Tomkinson, 2008).

Viral ligazların yapısı incelendiğinde yine NTaseD ve OBD'ye parçalanmış oldukça korunmuş katalitik bir ana domainden oluştukları, pek çoğunun N-terminalinde ise domain kategorisi veya bir görev tanımı yapılmamış, farklı büyüklükte genel geçer ekstra bir dizi bulunduğu görülmüştür (Sekiguchi ve Shuman, 1997; Shuman, 2009; Sriskanda ve Shuman, 1998). T4 DNA Ligazın DNA'ya bağlı kristali ile 3B analizi sonucunda bu N-terminaldeki dizisel yapının “kayan kısıkaç” yapısındaki replikasyon makinesinin bileşenlerine bağlanabilmeyi sağlayan bir DNA Bağlanma Domaini (DBD) olduğu bildirilmiştir (Shi vd., 2018; Vivona ve Kelman, 2003). T7 ve PBCV gibi “minimal ligaz” olarak tabir edilen enzimlerde bulunmayan bu DBD bölgesinin görevsel homoloğu, daha iyi tanımlanmış ökaryotik Lig I'lerdeki **PCNA bağlanma motifidir (PBM)** (Shi vd., 2018).

Katalitik olarak yeter şartı sağlayan minimal domainler enzimin doğru zamanda doğru yerde olması için yeterli değildir. Bu nedenle özellikle ökaryotik ligaz enzimleri görev yeri ve zamanının kontrolünü sağlayan, katalitik olmasa da zaruri olan ek domainlere sahiptir ve ökaryotik DNA ligazlar bu yapısal farklılıklarına göre kategorize edilmiştir.

Ökaryotik canlı dünyasında Ligaz I, Ligaz III (α ve β) ve Ligaz IV isimli 3 tip ATP bağımlı DNA ligaz enzimi mevcuttur. Ökaryotik DNA ligaz enzimlerinin isimlendirilmesinde Ligaz I'den III'e geçilmesinin nedeni; yanlışlıkla DNA Ligaz II olarak adlandırılmış enzim grubunun aslında Ligaz III alt-ailesi üyesi olduğunun sonradan anlaşılmasıdır. Literatürde oluşan bu karmaşanın giderilmesi amacıyla, bu enzimler Ligaz III adı altında toplanmış, Ligaz II alt grubu ise boş kalmıştır (Martin ve Macneill, 2002; Sallmyr vd., 2020; Simsek vd., 2011; Simsek ve Jasin, 2011; Timson vd., 2000; Tomkinson vd., 2006; Yutin ve Koonin, 2009).

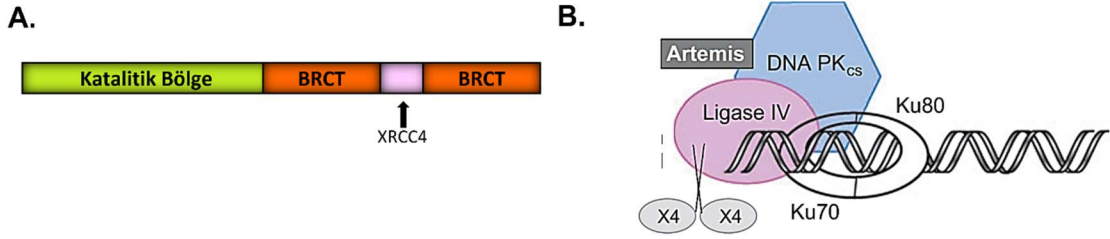
DNA Ligaz I enzimleri, tüm ökaryotların replikasyonunda Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde görev alır. Yapısında katalitik birimin N-terminalinde DNA bağlanma domaini "DBD" ve PCNA bağlanma domaini "PBD" bulunur. PCNA, Ligaz I'i replikasyonun kesikli zincirine yönlendirerek replikasyonda oluşan Okazaki fragmentlerinin ligasyonunu sağlar (Ellenberger ve Tomkinson, 2008; Sallmyr vd., 2020) (Şekil 1.3). Replikasyon dışında ayrıca bölünmekte olan hücrelerdeki nükleotit çıkarma tamiri (NER) ile genellikle S fazı hücre çekirdeklerinde baz çıkarma tamirinde (BER) ve MMR mekanizmalarında görev alırlar (Goosen, 2013; Krokan & Bjoras, 2013). DNA Ligaz I'in knock-out edildiği fare embriyolarının hayatta kalmadığı fakat embriyonik safha sonrasındaki delesyonlarının ölümcül olmadığı belirlenmiştir (Bentley vd., 2002; Han vd., 2014; Kumamoto vd., 2021).



Şekil 1.3. DNA Ligaz I'in yapısal farklılaşması. A. Domain yapısının, B. PCNA ve LigI'in birlikte şematik gösterimi. Şekil B Ellenberger ve Tomkinson'ın 2008 tarihli yayınından değiştirilerek kullanılmıştır (Ellenberger ve Tomkinson, 2008).

Yine tüm ökaryotlarda bulunan DNA ligaz IV'lerin katalitik bölgelerinin C-ucunda iki adet BRCT domaini ile bu iki domain arasında Xrcc4 (X-ışını tamiri çapraz tamamlayıcı protein 4 = X-ray repair cross-complementing protein 4) bağlanma motifi bulunur (Şekil 1.4). Ligaz IV'lerin BRCT domaini enzimin self adenilasyonu için zaruri olup, Ku heterodimerleri ve XRCC4 ile birlikte homolog rekombinasyon (HR) veya

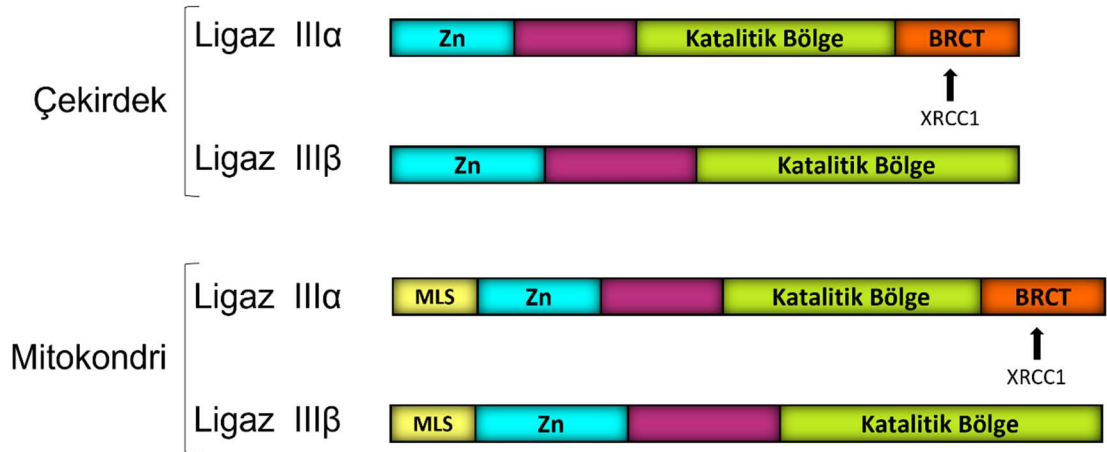
homolog olmayan uçların birleştirilmesi (NHEJ) gibi hücresel olayların son basamağında görev alırlar ancak embriyonik evre sonrasında hücrede bulunmamaları hücre için ölümcül sonuçlar doğurmaz (Pannunzio vd., 2018; Shuman, 2009).



Şekil 1.4. DNA Ligaz IV'ün yapısal farklılaşması. A. Domain yapısının, B. Ku70-Ku80 heterodimer yapısı ve LigIV'ün birlikte şematik gösterimi. Şekil B Ellenberger ve Tomkinson'ın 2008 tarihli yayınından değiştirilerek kullanılmıştır (Ellenberger ve Tomkinson, 2008).

Ökaryotik LigI ve IV alt-ailelerinden farklı olarak DNA LigIII alt-ailesi, bazı istisnalar dışında sadece omurgalı canlılarda bulunmaktadır. Ligaz III'lerin alternatif splicing ile oluşan ve C-terminallerinde BRCT domainin olup olmamasıyla ayırt edilen iki izoformu bulunur (Mackey vd., 1997). BRCT domaini Ligaz III α izoformunda bulunur ve enzimin Xrcc-1 faktörüyle bağlanmasını sağlayarak Xrcc1 bağımlı tamir yollarında rol almasını vetaşdığı nükleer lokalizasyon sinyaliyle enzimin çekirdekte lokalize olmasını sağlar. Bu iki izoformun translasyonunun başlama yeri mitokondriyal ve nükleer iki formun oluşmasını sağlar (Şekil 1.5). Enzimi kodlayan dizinin ilk iki methionini arasında mitokondriyal lokalizasyon sinyali (MLS) bulunmaktadır. İlk methionin'den başlayan translasyon sonrası oluşan enzim MLS'yi içereceğinden mitokondriye lokalize olur. Sonraki metionin'den başlayan translasyon ile oluşan enzim ise MLS taşımamakta olup, C-terminalindeki BRCT ile çekirdeğe yönelir (Chen vd., 1995). BRCT bulundurmeyen Ligaz III β 'nın çekirdeğe yönelmesini ise C-terminalinde olduğu düşünülen NLS sinyalinin sağladığı düşünülmektedir. Ligaz III'lerin mitokondri ve çekirdekte DNA'nın tek zincir kırıklarının tamirinde görev aldığı bilinmektedir; Ligaz III'ün mitokondriyal versiyonlarının bulunmamasının lethal sonuçlar doğurması, enzimin mitokondriyal genom stabilizasyonu için elzem olduğunu gösterir. Ayrıca tüm izoformların N-terminallerinde, diğer ligazlarda bulunmayan ve PARP-1 sınıfına giren Çinko Parmak Domani (ZnF) bulunur. ZnF'ler PARP-1'lerin DNA'nın hasarlı bölgesinin tanınmasını ve enzimin hasarlı bölgeye bağlanmasını sağlar. Tek zincir kırıklarının tamirine ek olarak enzimin hem N-terminalindeki ZnF hem de C-terminalinde bulunan OBD ve BRCT domainleri DNA'ya bağlanmayı sağlayan iki ayrı domain grubudur. Bu iki grubun birlikte işlev göstermesiyle DNA'nın kırık iki ucunu da stabilize ederek çift

zincir kırıklarının tamirinde görev alabileceği düşünülerek yapılan çalışmalar, LigIII'ün hata oranı yüksek olsa da çift zincir kırıklarını birleştirmede de görev aldığını göstermiştir (Wang vd., 2005). Bunun yanında yine düşük verimde de olsa Okazaki fragmenlerinin birleştirilmesinde alternatif rol oynadığı da bildirilmiştir (Arakawa ve Iliakis, 2015; Kumamoto vd., 2021).



Şekil 1.5. Çekirdek ve mitokondride görev alan Ligaz III'lerin yapısal farklılıklarının şematik gösterimi.

Ökaryotik DNA ligazların işlev göstermek için ihtiyaç duydukları faktörler bu enzimlerin görev zamanları hakkında da bilgi verir; buna göre bölünen ve bölünmeyen memeli hücre döngüsünde meydana gelen tamir olaylarında hangi DNA ligazların ne zaman görev aldıkları Tablo 1.1.'de özetlenmiştir (Iyama ve Wilson, 2013).

Tablo 1.1. Ökaryotik canlılarda yaygın olarak bulunan DNA Ligaz enzimlerinin biyolojik görevleri ve görev zamanları (Iyama ve Wilson, 2013).

Ligaz 1	Ligaz 3	Ligaz 4
Tek Zincir Kırıkları	Tek Zincir Kırıkları	Çift Zincir Kırıkları
NER BER Okazaki Fragmentleri	NER BER	HR NHEJ
Çekirdek	Çekirdek Mitokondri	Çekirdek
G1/S Fazı	G0/G1 Fazı	Tüm fazlar
Ökaryot	Omurgalı	Ökaryot

Omurgalı canlılardaki mitokondriyal Lig III'ün omurgasızlar ve bitkilerde yapısal ortoloğu bulunmamaktadır. *Saccharomyces cerevisia* ile *Arabidopsis thaliana*'da yürütülen çalışmalar ise her iki organizmanın da Lig I mRNA'sının kodladığı enzimlerin translasyonu esnasında, iki başlangıç kodunundan hangisinin seçilerek kullanıldığına bağlı olarak farklılaşmış iki Lig I enzim formunun üretildiğini göstermiştir. Buna göre ilk AUG'den başlayan translasyon sonucu oluşan Lig I enzimi mitokondriye lokalize olurken, ikinci AUG'den başlayan translasyon sonucu oluşan Lig I enziminin ise çekirdekte görev yaptığı bildirilmiştir (Şekil 1.6). (Sunderland vd., 2006; Timson vd., 2000; Willer vd., 1999).



Şekil 1.6. Omurgasız çekirdek ve mitokondri DNA'larının replikasyonu ve tamirinde görev alan DNA Ligaz I izoformları. A. Maya *cdc9*, B. *Arabidopsis thaliana* LigI'inin üretimi esnasında başla kodonu tercihi göre meydana gelen çekirdek ve mitokondri izoformları. (Sunderland vd., 2006; Timson vd., 2000; Willer vd., 1999).

Tek hücreli Kinetoplastida grubu organizmalarda, çok sayıda küçük ve büyük mitokondriyal halkasal DNA'nın iç içe geçerek mitokondri içi bir bölgede oluşturdukları karmaşık genom paketine kinetoplastid DNA veya kısaca kDNA adı verilmiştir. Kinetoplastit genomlarının replikasyonu ve korunması kDNA ligaz ismi verilen iki izoformla gerçekleşir. Yapılan çalışmalar sonucu; lokalizasyon yeri ve zamanının farklı olduğu belirlenen bu izoformlardan Lig k β 'nın mtDNA'nın replikasyonunda Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde birincil olarak görev aldığı, Lig k α 'nın ise replikasyon sonrası oluşan lineer DNA'nın uçlarının birleştirilerek halkasal hale getirilmesinde görev aldığı raporlanmıştır (Downey vd., 2005; Sinha vd., 2004; Sinha vd., 2006).

Bitkilerde ökaryotik ATP bağımlı DNA ligaz enzimlerine ek olarak, tohum gelişimi esnasında Lig I'ler gibi Okazaki fragmentlerinin birleştirilmesinde görev alan ancak yapısal olarak taşıdıkları ek domain ile Lig I'lerden farklılaştığı düşünülen ligaz grubu "Lig VI" ismiyle yeni bir alt aile olarak sunulmuştur (Waterworth vd., 2010).

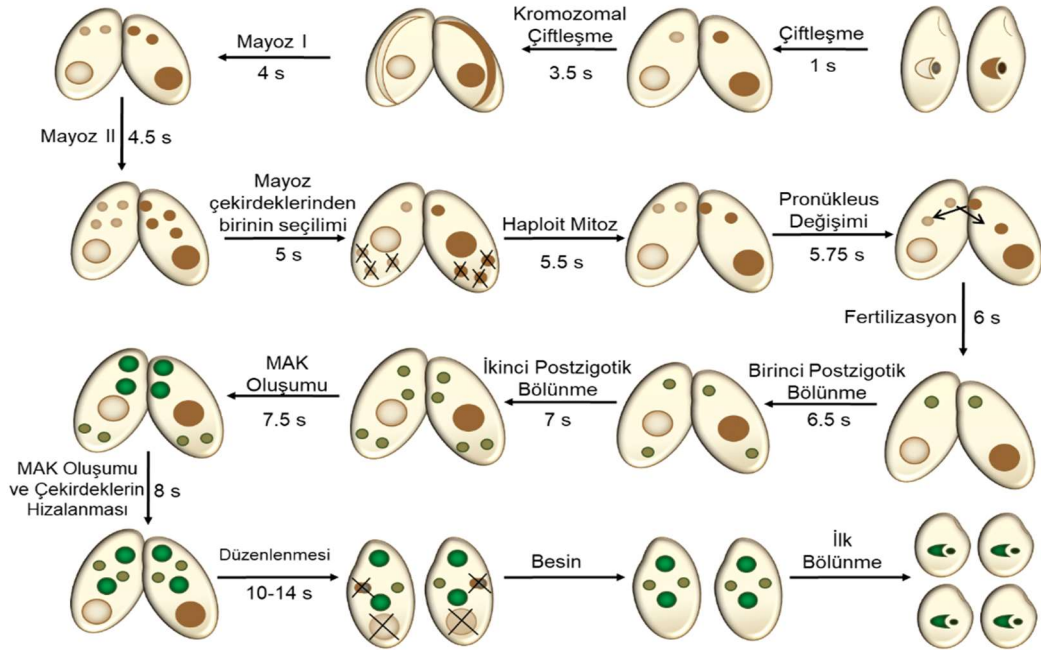
DNA Ligaz enzimlerinin yapısal farklılıkları görevleri ile direkt ilişkili olduğundan, evrimsel gelişimleri hakkındaki araştırmalar geri planda kalmış olup tüm DNA ligaz alt ailelerinin birlikte değerlendirildiği bir çalışma, birkaç makale dışında günümüzde dahi

literatürde bulunmamaktadır. Yutin ve Koonin, Nükleositoplazmik Büyük DNA virüslerinin (NCLDV) DNA ligazlarının evrimini araştırırken NCLDV enzimleri ile NAD⁺ ve ökaryotik ATP bağımlı DNA ligazları arasındaki filogenetik ilişkiyi de incelemişlerdir; NCLDV’de bulunan DNA ligazlardan ataya en yakın grubun NAD bağımlı DNA ligaz olabileceğini, bu virüsün ATP bağımlı DNA ligaz genlerini ikincil olarak kazandığını öne sürmüşlerdir. Tüm bunlara ek olarak ökaryotik Ligaz III grubunun Ligaz IV’ün duplikasyonu sonucunda evrimleşmiş olabileceğini öne sürmüşlerdir (Yutin ve Koonin, 2009). Simsek ve Jasin ise Ligaz III’lerin ökaryotlardaki tutarlı olmayan dağılımını araştırmış, atasal Ligaz III’ün metazoa oluşumu sonrası farklılaştığını, evrimsel süreçte pek çok canlı grubunun genomundan farklı zamanlarda silindiğini öne sürmüşlerdir (Simsek ve Jasin, 2011).

DNA Lig I, III ve IV’ler hakkında bulunan tüm bu yapı, işlev ve filogenetik/biyoinformatik temelli araştırmalara karşın, tek ve çok hücreli omurgasız ökaryotların genomlarında neden sadece ATP bağımlı LigI ve LigIV genlerinin bulunduğunu, eksik olan Lig III genleri yerine alternatif bir Ligaz geninin bulunup bulunmadığını araştıran bir çalışma henüz bildirilmemiştir. Ayrıca Lig III yokluğunda tek ve çok hücreli omurgasız ökaryotların çekirdek ve mitokondri genom DNA’larının replikasyonu, tamiri ve genetik çeşitlilik süreçlerinde hangi genin görev alabileceği sorusunun cevabı da bilinmemektedir. Bu tez kapsamında, bu soruların cevapları, omurgasız ökaryotları temsil eden tek hücreli, silli bir ökaryot olan *Tetrahymena thermophila* organizması model olarak kullanılarak araştırılmıştır. Tetrahymena organizması; ulaşılabilir genom bilgisi, biyolojisi hakkında bilgi birikimi, kültür şartlarının kolaylığı, genom manipülasyonu ile ilgili artan/yaygınlaşan teknik uygulamalar ile yakınlık gösterdiği diğer tekhücreli ve çokhücreli ökaryotlara model olabilmesi açısından kullanışlı bir araştırma organizmasıdır.

1.3. *Tetrahymena thermophila*

T. thermophila eşeyli ve eşeysiz üreyebilen, çift çekirdekli bir organizmadır. Bu çekirdeklerden diploit ($2n=10$) olanı genetik çeşitliliği sağlar fakat somatik olarak inaktiftir ve mikronükleus veya MİK adını alır; somatik görevleri yerine getiren, poliploid yapıdaki büyük çekirdek ise makronükleus ya da kısaca MAK olarak bilinmektedir. *T. thermophila*'nın açlık şartlarında 7 eşey tipinden iki farklı eşey tipine sahip olan bireylerin bir araya gelmesiyle başlayan genetik materyal değişimi, konjugasyon olarak bilinmekte olup, genetik çeşitliliğin sürmesini sağlar. Bu eşeyli üreme sürecinde yeni genetik rekombinasyona sahip iki yeni MİK meydana gelir, bunlardan biri MİK olarak kalırken, diğeri yoğun bir DNA reorganizasyonu sonucu yeni MAK olarak farklılaşır (Şekil 1.7).



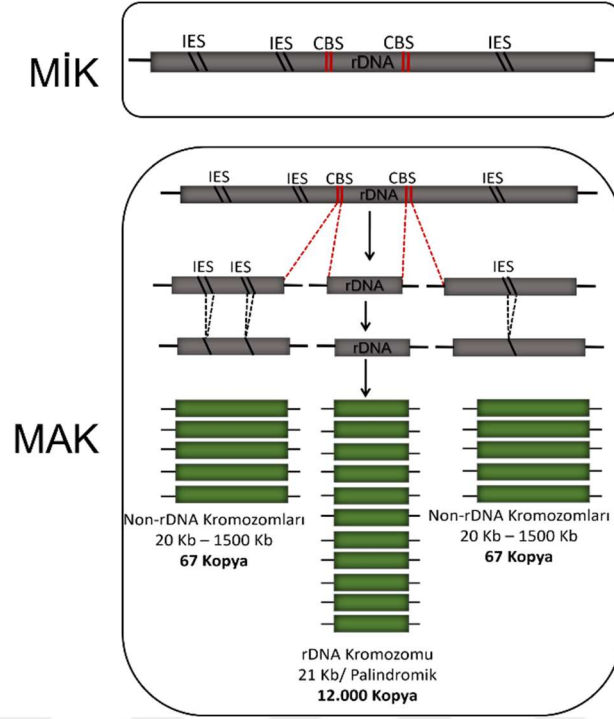
Şekil 1.7. *Tetrahymena thermophila*'nın konjugasyon safhaları. Şekildeki saatler senkronize hücreler için tahmini bir süreci anlatmakta olup, safhalar esasen hücredeki çekirdek repertuarı çekirdeklerin durumları ile takip edilir. Ayrıntılı açıklama için metne bakınız.

Konjugasyon *Tetrahymena*'nın 16 saat açlıkta kalması sonrasında başlar. Konjugasyonun 3.5- 4. saatleri arasında genetik kaynak olan MİK kromozomlarında çift zincir kırıkları (DSB'ler) meydana gelerek MİK'in hareket yeteneğini artırır ve MİK'in hücre içinde iplik gibi uzamasını sağlar; bu olay homolog kromozomlarda yer alan genlerin düzlemsel olarak yanyana gelmesi ile homolog rekombinasyonu kolaylaştırır. Konjugasyonun yaklaşık 4. saatine denk gelen bu olay sonrasında meydana gelen mayoz ile 4 adet haploit MİK oluşur ve bunlardan 1'i seçilerek diğer 3'ü parçalanarak yok edilir.

Konjugasyonun 5. saati itibariyle kalan tek haploit MİK'in mitoz geçirilmesiyle iki haploit MİK kopyası oluşur. Konjugasyonun yaklaşık 6. saati itibariyle her iki hücrenin haploit MİK'lerinden biri hücre içinde kalırken, diğerleri resiprokal olarak değiştirilir. Hücre içinde kalan haploit MİK ile diğer hücreden gelen haploit MİK birleşerek zigotik diploit MİK'i meydana getirir. Zigotik MİK'in art arda 2 mitoz geçirmesi neticesinde toplamda 4 adet diploit MİK oluşur ve bunlardan ikisi oluşacak yavru hücrelerin yeni MAK'ları olmak üzere seçilerek, hücrenin anterior bölgesine taşınırlar. Bu olaylarla eş zamanlı olarak transkripsiyonel görevi devam eden eski (yaşlı) MAK, 7-8. saatler itibariyle hücrenin posterior kısmına taşınır ve programlı çekirdek ölümü mekanizması ile yok edilir (Aslan ve Arslanyolu, 2015; Yao vd., 2015).

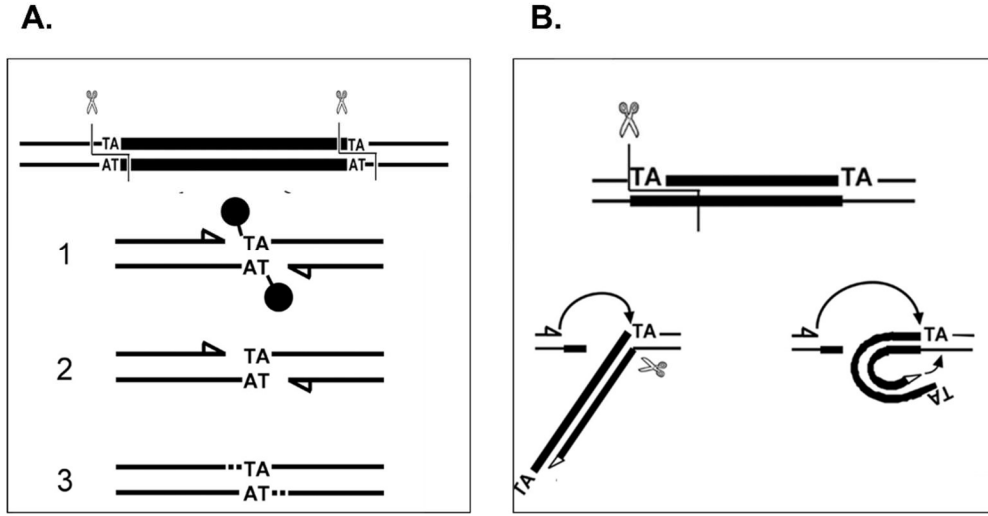
Konjugasyonun 2 MAK-2 MİK evresi olarak da bilinen 10. saatinden sonra yeni MAK'larda yoğun bir genom reorganizasyonu başlar. Bu reorganizasyon olayları minikromozomların oluşması ve endoreplikasyonu, genoma dağılmış halde bulunan elimine edilen içsel dizilerin (IES) çıkarılması ve eşey tiplerinin oluşması olarak özetlenebilir.

MİK genom kromozomlarının Kromozom Kırılma Dizileri (CBS) olarak bilinen, çok korunmuş 15 bazlık dizilerden kırılmasıyla Minikromozomlar oluşur. Meydana gelen minikromozom uçlarına de-novo telomer eklenirken endoreplikasyon ile kopya sayıları artarak yaklaşık 67 kopyaya ulaşır. Böylece $2n=10$ kromozomlu diploit MİK'ten 67 kopyalı poliploit mini kromozom içeren bir MAK genomu oluşur (Lin vd., 2016; Lin ve Yao, 2020; Rzeszutek vd., 2020; Yao vd., 2014). Ribozomal DNA bilgisini taşıyan rDNA kromozom bölgesi ise diğerlerinden farklı olarak 12.000 minikromozom kopyasına ulaşır (Şekil 1.8) (Lin ve Yao, 2020).



Şekil 1.8. MAK gelişimi esnasında meydana gelen DNA reorganizasyon olaylarından biri olan minikromozom oluşumu ve endoreplikasyonun şematik gösterimi.

MAK gelişimin minikromozom oluşma evresinde, transpozon biyolojisi ile yakın ilişkili bir işleyişe sahip IES (internally eliminated sequences) dizilerinin eliminasyonu da gerçekleşir. Böylece MAK genomun %20'sine karşılık gelen transpozon benzeri yaklaşık 10.000 IES dizisinin çıkartılarak temizlenmesi sağlanır (Kataoka ve Mochizuki, 2011; Noto ve Mochizuki, 2017; Yao vd., 2015). Paramecium'da IES'in iki ucunun da aynı anda kromozomdan kesilerek çıkarıldığı, bu sebeple serbest kalan kromozom uçlarının LigIV-Ku80 bağımlı mekanizma ile tamir edildiği bildirilmiştir ancak Oxytricha ve Tetrahymena'da IES'in tek uçtan kesilmesiyle başlayan sürecin hangi mekanizma ve enzimler yardımıyla tamamlandığı henüz bilinmemektedir (Şekil 1.9) (Saveliev ve Cox, 2001; Gratias ve Bétermier, 2003; Kapusta vd., 2011). Lin ve ark., mekanizmanın Ku80 bağımlı ilerleme ihtimalini, oluşturdukları Δ Ku80 Tetrahymena hücre hatlarının konjugasyonunda IES fragmentlerinin oluşumu ve minikromozomların oluşturulması olaylarını takip ederek test etmişler, sonuç olarak konjugasyonun 2 MAK-2 MİK evresinde (yaklaşık 10. saat) duraksadığını fakat IES fragmenlerinin beklenenden daha geç de olsa meydana geldiğini bildirmişlerdir (Lin vd., 2012).



Şekil 1.9. IES'lerin çıkarılmasının şematik gösterimi. **A.** Parametium'da IES'lerin iki ucu aynı anda kesilir ve genomun serbest uçları NHEJ mekanizmasıyla, LigIV-Ku80 varlığında tamir edilir. **B.** Tetrahymena (sol) ve Oxytricha'da IES'in tek ucunun kesilmesiyle başlayan süreçte hangi mekanizmanın rol aldığı bilinmemektedir.

IES eliminasyonu sonrasında, MİK'te set halinde bulunan eşey tipi genlerinden bazılarının çıkarılması ve kalanların yeniden düzenlenmesiyle eşey tipi oluşur. Lin ve Yao bu sürecin 2 MAK-2 MİK evresinden hemen sonra, V(D)J rekombinasyonuna benzer bir mekanizma ile yönetilip, ligasyon aşamasının Ligaz IV tarafından gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir (Lin ve Yao, 2020).

Tetrahymena'da hayat döngüsünün evreleri olan eşeysiz (hücre bölünmesi) ve eşeyli üreme (konjugasyon) ile UV ve oksidatif stres gibi şartlar altında oluşan DNA kırıklarının onarımında görev alabilecek 4 Ligaz geni bulunmaktadır: Bunlardan ikisi Ligaz I geni, biri Ligaz IV geni olup, sonuncusu ökaryotik ligazlara benzemeyen bir ligaz domaini içeren hipotetik bir ligaz genidir. Tetrahymena hipotetik ligaz enziminin hangi ökaryotik DNA ligaz alt ailesine girdiği henüz literatürde bilinmemesine karşın konu hakkında ilk araştırmalar araştırmacının yüksek lisans tez çalışmalarıyla başlatılmıştır. Bahsi geçen yüksek lisans çalışmasında hipotetik ligaz enzimi ya da geninden Ligaz II, TtLigII, TthLigII-p (protein) ya da TthLIGII (gen) olarak bahsedilmiş olup bu doktora tez çalışmasında da bu isimlendirmelere devam edilecektir (Küçüköğlu, 2010)

Tetrahymena'nın özel ve dinamik genom organizasyonu olaylarında hipotetik ligaz enziminin spesifik bir görev alıp almadığı bilinmemektedir. Ayrıca mitokondriyal genomların korunması ve sürekliliğinde görev alan omurgalı Ligaz III enzimine dair omurgasızların büyük çoğunluğunu kapsayan bir bilgi bulunmamaktadır. Bu doktora tezi;

TtLigII'nin tek ya da çift zincirli DNA kırıklarını tamir etme kapasitesinin, genomun yeniden düzenlenmesi ve/veya mitokondriyal DNA'nın tamiri ile genetik muhafazası gibi olası görevlerinin aydınlatılmasına odaklanmaktadır.

1.4. Amaç ve hipotez

DNA Ligazlar genomun korunması, replikasyonu ile reorganizasyonunda görev alırlar. Omurgalı ökaryotlarda görev ve yapıları belirgin şekilde farklılaşan üç adet DNA Ligaz enzimi bulunur: LigI, LigIII ve LigIV. LigI replikasyondaki temel görevi nedeniyle, LigIV ise çift zincir kırıklarının tamiri ile mayozdaki kilit rolüyle korunmuştur. Bununla birlikte görevi LigI gibi tek zincir kırıklarının tamiri olan ve özellikle mitokondriyal genomun korunmasını sağlayan LigIII sadece omurgalı (ve bazı omurgasız) canlılarda bulunmaktadır. Literatürde omurgasız canlıların mitokondrilerinde görev alan ligaz enzimleri üzerine az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, bir tamir mekanizması ya da enzim alt ailesi hakkında bir çalışma bulunmamaktadır.

T. thermophila'nın dört DNA ligazından 3'ünün dahil olduğu alt aile ve hücre içi olası görevler ön görülebilirken, ökaryotik ligazlara yapısal olarak benzemeyen hipotetik TtLigII'nin ligasyon enzim aktivitesinin belirlenmesi, tek zincir kırıklarının tamiri ile mitokondriyal genomun replikasyonu ve tamiri gibi hücre olaylarında görev alabilme potansiyelinin değerlendirilmesi, bu tez çalışmasının sınıadığı amaç ve test ettiği hipotezi oluşturmaktadır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan çeşitli gereçlerin listesi EK-1’de verilmiştir.

2.1. Biyoinformatik Çalışmalar

Biyoinformatik çalışmalarda TtLigII enziminin filogenetik ilişkilerinin aydınlatılması ve yorumlanması; 3 boyutlu yapı analizi ile yapısal özelliklerinin deneysel literatürle ortak/farklı yönlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Buna ek olarak veritabanlarında ulaşılabilen mRNA ifade verileri elde edilerek TtLigII’ye ait bilgiler bir araya getirilmiştir.

2.1.1. Filogenetik ağaç

Çalışmada örneklem oluştururken, siliyat genom veritabanında var olan organizmalara ait DNA Ligaz dizileri elde edilmiş, CDD (conserved domain search) ile dizilerin DNA Ligazlara ait olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Ortolog üyelerin yaygın çalışılan model organizmalara ait diziler olmasına dikkat edilmiş fakat analizde yanlışlık oluşturmaması için model organizmaların sayısı sınırlı tutulmuştur.

Williamson ve arkadaşlarının Lig E’ler üzerine yaptığı çalışma, bakteri ligazları yanında tüm ligazlar hakkında temel bilgileri sunduğundan ökaryotik DNA ligaz protein ailesi analizinde bakteriyel ligazların tüm alt gruplarının temsil edilmesine çalışılmıştır (Williamson vd., 2016).

Çalışma konumuz olan TtLigII’ye ait aminoasit dizisi bulucu olarak kullanılarak yapılan BLAST analizlerinde arama havuzu omurgasız canlılarla sınırlandırılarak elde edilen ligaz üyeleri de çalışmada kullanılmıştır. Filogenetik ağaç web tabanlı bir araç olan Phylogeny.fr ile oluşturulmuştur. Diziler, en yüksek doğruluk için varsayılan ayarlarla MUSCLE (v3.8.31) ile hizalanmış, hizalama sonrası boşluk içeren kolonlar temizlendikten sonra WAG metoduyla varsayılan ayarlarda PhyML (maksimum olasılık / Maksimum Likelihood) ağacı (v3.1/3.0 aLRT) yapılandırılmıştır (www.phylogeny.fr). Dahili dal için güvenilirlik (branch support), aLRT testi (SH-Like) kullanılarak hesaplanmıştır. Filogenetik ağacın grafik gösterimi ve düzenlenmesi, TreeDyn (v198.3)

ile gerçekleştirilmiştir. Veriler sunulmak üzere iTol programıyla düzenlenmiştir (Dereeper vd., 2008; Letunic ve Bork, 2021).

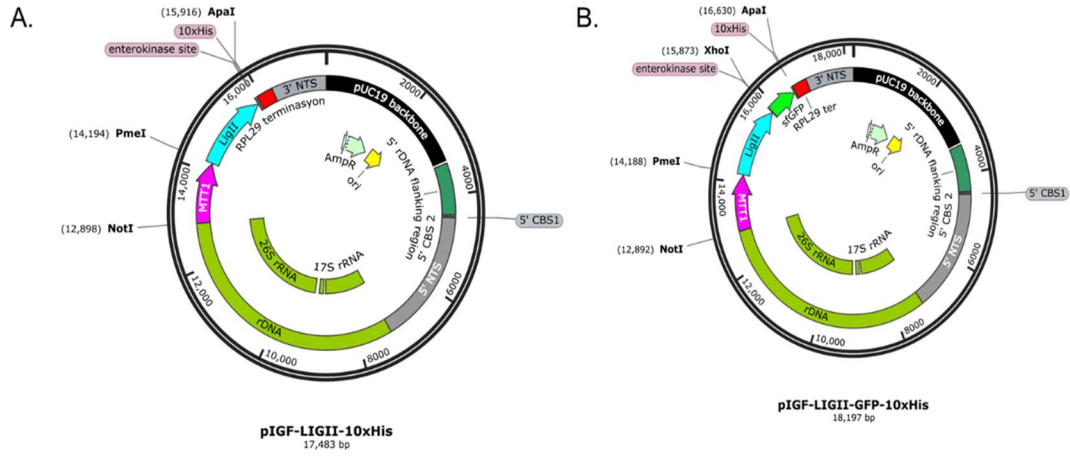
2.1.2. 3-Boyutlu modelleme

T. thermophila'nın TtLigII, TtLigI-1 ve TtLigIV DNA Ligazları ile TtLigII'ye filogenetik benzerlik gösteren diğer ligaz üyelerine ait diziler CoLab tabanlı AlphaFold'un ön ayarları değiştirilmeksizin kullanılarak modellenmiştir. Buna ek olarak SWISS Model veri tabanında bütünsel ve lokal analizler ile elde edilen katlanma bilgileri PyMOL ile görüntülenmiştir (Jumper vd., 2021; Mirdita vd., 2022; Pettersen vd., 2021; Varadi vd., 2022).

2.2. Deneysel Çalışmalar

2.2.1. Plazmitlerin yapılandırılması ve transformasyon

TtLigII protein kodlayıcı bölgesi RT-PCR ile üretildikten sonra SOEbyPCR metoduyla genin C-terminaline enterokinaz ve 10xHisTag dizileri eklenmiştir. Ekstrakromozomal vektör pIGF, seleksiyon için paramomisin direnci sağlayan ve CdCl₂ ile indüklenebilir metallothionein promotörü taşıyan, rDNA replikasyon orijini sayesinde vektörün yüksek kopya sayısına ulaşmasını mümkün kılan bir plazmittir (Malone, Anderson, Motl, Rexer, & Chalker, 2005). TtLigII-10xHis dizisi pIGF vektörünün PmeI-ApaI bölgesine klonlanarak pVLigII rekombinant protein üretim vektörü elde edilmiştir. Bu vektörün TtLigII ve 10xHis takısı arasına kodon optimize sfGFP geni SOEbyPCR ile eklenerek overekspres lokalizasyon vektörü pVLigIIsfGFP elde edilmiştir (Şekil 2.1-A ve -B) (Yılmaz ve Arslanyolu, 2015).



Şekil 2. 1. *TiLigII* geninin 10xHis ya da sfGFP takılı olarak klonlandığı ekstra kromozomal vektörler. A ve B sırasıyla pIGF-LigII 10xHis ve GFP.

Vektörler elde edildikten sonra çok kopyalı pIGF vektörleri konjugatif Tetrahymena hücrelerine, genom entegre vektörler ise vejetatif Tetrahymena hücrelerine biyolistik silah ile transforme edilmiş, antibiyotik baskısı ile seçilimi sağlanan bu hücrelerden sıvı N₂ stokları hazırlanmıştır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Bu çalışmada oluşturulan vektörler ve hücre hatları.

Rekombinant Hücre hattı	LigII-cHis	LigII-cGFP	GE-LigII-cGFP
Taşıdığı vektör	pIGF-LigII-10xHis	pIGFLigII-GFP	pNeoLigII-GFP
Vektör Tipi	Ekstra kromozomal	Ekstra kromozomal	Genom entegre
Transformasyon	Konjugatif	Konjugatif	Somatik
Transformant Hücre Tipi	Belirlenmedi	Belirlenmedi	Cu428
Paramomisin Konsantrasyonu	300 µg/ml	300 µg/ml	30 mg/ml

2.2.2. Enzimatik üretim, saflaştırma ve in-vivo aktivite karakterizasyonu

Hücre kültürü: Hücre kültüründe NEFF ya da SPP besiyeri kullanılmıştır. Açlık şartları sağlamak için ise 10 mM Tris-HCl pH:7,6 kullanılmıştır (Cassidy-Hanley, 2012).

Biyoreaktörde üretim: Yüksek miktarda rekombinant LigII-10xHis füzyon proteini üretimi için biyoreaktör kullanılmıştır (Infors HT Miniforce 2). Reaktörde 30°C sıcaklık, pH 7.0, %25 çözülmüş O₂, 0,1-1 litre total flow ve 200-400 rpm stirrer şartları kullanılmıştır. 500 ml besiyerine 42.000 hücre/ml yoğunluk sağlanacak şekilde başlangıç hücre kültürü eklenerek üretim süreci başlatılmıştır. Hücre yoğunluğunun 2 milyon hücre/ml'ye ulaşması beklenmiş (42 saat), bu aşamada 25x SPP stoğundann 20 ml

eklenmiştir. Kontrol olarak, indüklenmemiş hücrelerden 100 ml alınmış, kültüre 100 ml kadar taze SPP besiyeri ilave edilerek başlangıç hacmi muhafaza edilmiştir ve kültür 7,5 µg/ml CdCl₂ ile indüklenmiştir. İndüklemenin 3 ve 6. saatlerinde 100'er ml örnek alınarak kültüre yine 100'er ml besiyeri takviyesi yapılmıştır. İndüklemenin 6. saatinde CdCl₂ indüklenme konsantrasyonu 10 µg/ml'ye çıkartılmıştır. İndüklemenin 9. saatinden de örnek alındıktan sonra reaktör durdurulmuştur. Alınan örnekler 25'er ml'lik 4 tüpe bölünerek buzda bir süre inkübe edildikten sonra 4°C'ye ayarlı santrifüj ile peletlenmiş, hücreler soğuk Tris-HCl (pH:7,5) ile yıkandıktan sonra, çalışma yapılncaya kadar -86°C'de saklanmıştır.

İzolasyon: Lizis her 1 mg'a veya 1 ml hücre peletine 5-7 ml (ya da her 6 milyon hücre için 1 ml) Nükleer Lizis Tamponu (NLT: 20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, %0,1 Igepal, %25(v/v) Gliserol, 2 mM PMSF, 1x PIC) eklenerek, başlatılmıştır. NLT eklendikten sonra hücre süspansiyonu 10 dakika boyunca buzda inkübe edilmiş, sonrasında 10 kez 18G şırıngadan (insülin iğnesi) geçirilerek hücreler parçalanmıştır. Bu esnada ortama salınan genomik DNA'ların parçalanması için 20 µg/ml olacak şekilde DNase I eklenen süspansiyon 30 dakika buzda inkübe edilmiştir (Abmayr vd., 2006; Slomiany vd., 2000). Swing rotorlu santrifüj ile 4200 RCF'te 10 dk santrifüj sonrası çözünür lizat elde edilmiştir.

Tampon değişimi ve konsantrasyon: toplam protein lizatında bulunan 50 kDa'dan küçük proteinlerin uzaklaştırılması amacıyla Amicon® Stirred Cell (Cat: UFSC05001) kullanılmıştır (Millipore Ultrafiltration Discs, 50 kDa NMW Cat: PBQK07610). Bu işlem sonrasında Amicon® Ultra-50 (10 KDa MWCO) ile önceki işlemde hacmi 4 ml'ye inmiş olan lizat önce değişim tamponu olan Ni-NTA denge tamponu (0.4 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM İmidazol) ile 50 ml'ye tamamlanmış, sonra 5 ml'ye kadar konsantre edilmiştir. Finalde 5 ml'ye indirilen lizat doğrudan Ni-NTA afinite kolonlarında saflaştırmada kullanılmıştır.

Ni-NTA Afinitik Saflaştırma: Ni-NTA (Qiagen) %50 süspansiyonundan 0,5 ml santrifüj edilmiş ve Ni-NTA tanecikleri denge tamponu ile yıkanarak dengelenmiştir. Daha sonra 2 ml lizat ve yaklaşık 250 µl Ni-NTA tanecikleri bir araya getirilerek, 4°C'de gece boyu çalkalama ile inkübe edilmiştir.

Ni-NTA agaroz-lizat süspansiyonu bir kolona pakatlendikten sonra bağlanmayan protein (Flow through- FT) kısmı saklanmıştır. Yıkama ise 2'şer kez 20, 30 ve 40 mM imidazol içeren, 5 kez de 50 mM imidazol içeren 1,5 ml Ni-NTA yıkama tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Elüsyon 300, 400 ve 500 mM imidazol içeren 0,25 ml elüsyon tamponu ile yapılmıştır. Her yıkama ve elüsyonun protein içeriği NanoDrop'da 280 nm'de ölçülerek belirlenmiştir.

Diyaliz: Diyaliz membranı (Cellu-Sep F3 MWCO 12.000-14.000 Cat: Q1210-55) 1 saat distile suda yıkandıktan sonra 500 µl örnek diyaliz ünitesine (Uptima Fast Dialysers Cat: FD500) eklenmiştir, diyaliz ünitesi membran ile kapatılarak, 1 lt diyaliz tamponu içinde (10 mM Tris-HCl (pH: 7,5), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, %50 gliserol) 4°C'de gece boyu diyalize maruz bırakılmıştır. Süre sonunda enzim konsantrasyonu Bradford metoduyla ölçülmüştür (Bradford, 1976).

Western Blot: SDS-PAGE'de ayrılmış proteinler 45 µM'lik PVDF membrana, yarı-kuru transfer yöntemi ile 100 Amper, 250 V'ta 1 saat süreyle transfer edilmiş, ardından membran %5 yağsız süttozu içeren TBS-T'de, oda sıcaklığında, 1 saat boyunca bloklanmıştır. Birincil anti-His antikorunun (Origene Mouse Anti-His TA150038) 4°C'de 1:4000 konsantrasyonda gece boyu bağlanması sağlanmıştır. İkincil antikorun (Goat Anti-Mouse A00160 GeneScript) 1:10.000 konsantrasyonda oda sıcaklığında 3 saat boyunca bağlanması için inkübasyonu yapılmıştır.

Gümüş Boyama: SDS-PAGE elektroforesi bittikten sonra 10 dk süreyle distile suyla yıkanan jel, gece boyu oda sıcaklığında fiksasyon solüsyonu [%30 (v/v) etanol + %10 (v/v) asetik asit] ile muamele edilmiştir. Jel sonra 2 kez 10 dk, %20 (v/v) etanol ve 2 kez 10 dk distile su ile yıkanmış, 1 dk süreyle 0,8 mM sodyum tiosülfat ve 2 kez 1'er dk distile su ile yıkanarak, jel 12 mM gümüş nitrat ile 20 dk boyanmıştır. Jel, bantlar görünür hale gelinceye kadar görüntüleme solüsyonu [%3 (g/ml) potasyum karbonat ya da sodyum karbonat + 3,12 µl %10 (g/ml) sodyum tiosülfat + 6,24 µl %37 formaldehit] ile muamele edildikten sonra, bir kez %4 (g/v) Tris ve %2 (v/v) Asetik asit ve 2 kez distile suyla 30'ar dk yıkanarak görüntülenmiştir (Chevallet vd., 2006).

Aktivite: Aktivite reaksiyonunda yapışkan uçlu substrat olarak EcoRI (5 yerden keser, tanıma bölgesi: g/aattc) ve HindIII (6 yerden keser, tanıma bölgesi: a/agctt) ile kesilmiş λ/EcoRI+HindIII makerı (Thermo #SM0191) kullanılmıştır. Küt uçlu substrat

ise λ DNA'sının (NEB N3011S) DraI (13 yerden keser, tanıma dizisi: ttt/aaa; Sigma, 10 827 754 001) ve EcoRV (21 yerden keser, tanıma dizisi: gat/atc; Thermo, ER0301) enzimleriyle kesilerek, PCR saflaştırma kiti (MN Nucleospin, 740609.50) ile saflaştırıldıktan sonra kullanılmıştır. 10 μ l'lik reaksiyonda; 200 ng substrat DNA kullanılmış, inkübasyon sonunda reaksiyona 1 μ l proteinase K (20 mg/ml) ile yükleme boyası eklenerek 30 dk 37°C'de inkübe edildikten sonra %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. 90V'da 50 dk süreyle elektroforez sonrası λ DNA'sının birleşen fragmentlerinin jeldeki göçleri BioRad GelDoc EZ sistemi ile görüntülenmiş, absorbans analizi için BioRad Image Lab yazılımı kullanılmıştır.

Aktivite çalışmalarında iki farklı ligasyon tamponu denenmiştir. İlki klasik T4 DNA Ligaz reaksiyon tamponu olan NEB ligasyon tamponudur (1x: 50 mM Tris pH: 7,4; 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1mM ATP. Kat: B0202S). Diğeri ise Bauer ve arkadaşlarının T4 ligaz tamponuna göre verimin bazı şartlarda daha iyi olduğunu gösterdikleri Quick ligation buffer (1x: 66 mM Tris pH: 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1mM ATP, %6 PEG 6000) veya QLB'dir (Bauer vd., 2017).

Pozitif kontrol (PK) olarak 0,5 U NEB T4 DNA ligaz enzimi ve negatif kontrol olarak ise (NK) enzim yerine aynı hacimde ligaz saklama tamponu kullanmıştır. Reaksiyonlar temelde 25°C sıcaklıkta, 16 saat süreyle test edildikten sonra optimizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

2.2.3. Hücre içi lokalizasyon ve mikroskopi

Hücreler, yaklaşık 2,5x10⁵ hücre/ml yoğunluğa ulaşınca kadar 30°C'de, uygun antibiyotik içeren NEFF besiyerinde büyütülmüştür (Wunderlich ve Franke, 1968). Hücrelerin G0 fazında birikmesi için açlığa alınan hücreler en az 8 saat boyunca aç bırakılmıştır (Murata-Harju ve Fujishima, 2000).

Floresan Mikroskopi: Hücreler PBS'de %10 formalin ve % 25 metanol ile 4°C'de gece boyunca fiks edildi. PBS ile yıkandıktan sonra pelet, 40 ng/ml veya 1 μ g/ml DAPI içeren PBS ile çözülerek lama yayıldı (Kataoka ve Mochizuki, 2015; Loidl ve Mochizuki, 2009). Görüntüler Olympus marka IX53-CellSenseEntry floresan mikroskop ve XM10 monokromatik kamera ile elde edilmiş, veriler ImageJ programı ile düzenlenmiştir.

3. BULGULAR

Bu tez bulguları biyoinformatik ve deneysel olarak iki temel başlıkta sunulmuştur.

3.1. Biyoinformatik Analiz Bulguları

Biyoinformatik araştırmalarda öncelikle TtLigII'nin temsil ettiği ligaz alt ailesinin kapsamlı bir şekilde tanımlanabilmesi amacıyla filogenetik ağaç analizi gerçekleştirilmiştir. Filogenetik ağaç sonrasında TtLigII ile birlikte dağılım gösteren üyeler ve diğer Tetrahymena ligazları 3B yapı modellemesi ile motif, domain ve yapı değerlendirmesine alınmıştır. Son olarak Tetrahymena Ligazlarının mRNA seviyeleri transkriptom veritabanından çekilerek bir araya getirilmiş ve TtLigII'nin biyolojik göreviyle ilgili ilk ipuçları tanımlanmaya çalışılmıştır.

3.1.1. Filogenetik ağaç

Filogenetik analizlerde ilk olarak ağaçta kullanılan üyelerin PFAM analizi ile domain yapıları kategorize edilmiştir. Giriş bölümünde bahsedildiği üzere merkezi birimi oluşturan NTaseD (nükleotidil transferaz domaini) tüm ATP bağımlı DNA ligazlar için aynı PFAM koduna sahipken OB (oligonükleotid bağlanma domaini) iki farklı kodla temsil edilmektedir: PF04679 ve PF14743.9. Enzimin OB domaini PF04679 koduna sahipse katalitik birim bir bütün olarak sarı, PF14743.9 koduna sahipse kırmızı renkli bar ile temsil edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3. 1. ATP bağımlı DNA Ligaz enzimlerinin katalitik birimlerini oluşturan iki temel domaininden biri olan OBD'ye göre şematik kategorizasyonu.

Filogenetik olarak ise TtLigII'nin diğer DNA ligazlar ile ilişkisi ve filogenetik çerçevedeki konumunun belirlenmesi amacıyla maximum likelihood topoloji ağacı oluşturulmuştur (Şekil 3.2). Ana amaç TtLigII'nin canlılar alemi ile ATP bağımlı Ligaz

ailesindeki kategorizasyonu olduğundan üyeler ökaryotik ve prokaryotik canlı dünyasını temsil edecek şekilde seçilmiş, ağacın güvenilirliği ise “branch support” analizi ile test edilmiştir. Bu ağaçta Ligaz 2 ile temsil edilen ligaz alt ailesi ilk defa araştırmacının yüksek lisans tezi ile hipotezlenmiş olmasına karşın aktivite analizleri ile desteklenemediği için henüz literatürde yayımlanmamıştır (Küçükoğlu, 2010). Doktora tezimin kapsamında ise Ligaz II alt ailesi hipotezi ilave biyoinformatik veriler ile güçlendirilerek tekrar sunulmuştur.

Filogenetik ağacın rahat anlaşılabilmesi için dal uçlarında üyelere ait bilgiler özetlenmiştir; buna göre üyenin genus isminin ilk harfi büyük ve tür isminin ilk harfi küçük olacak şekilde kısaltılarak iki harfli kod adı ile enzimin NCBI erişim kodu ve eğer biliniyorsa enzimin ait olduğu ligaz alt aile numarası grubu eklenerek bir kısa isim kullanılmıştır. Örneğin "*Tetrahymena thermophila*, LigIV, XP_001019308.1" üyesi için kısaltma Tt4 şeklinde olacaktır ve ağaçta “Tt4 *Tetrahymena thermophila* XP_001019308.1” olarak verilmiştir. Üye PFAM kategorizasyonunda Tip 2 Katalitik Birim grubundaysa ait olduğu taksonomik kategori de belirtilmiştir. Ayrıca enzimin geldiği organizma grubu hakkında bilgi vermek için tür kısaltmasından sonra da kısa bilgi verilmiştir; TtAl2’de Al: Alveolata’ya karşılık gelir. Ağacın sağ tarafında dikey bar şeklinde ligaz üyelerinin dahil olduğu ligaz alt ailesi latin rakamlarıyla (1, 2, 3, 4 ve 6) verilmiştir; V, Viral ligazlara; P, prokaryotik ligaz; A, Arke ligazları; k ise kDNA ligaz üyelerine işaret etmektedir. Ağacın en sağındaysa yukarıda bahsedildiği üzere PFAM analizi ile elde edilen domain bilgileri şematize edilmiştir. Sarı ve kırmızı renkle temsil edilen katalitik birime ek olarak var olan domainler bu barlara farklı renklerdeki birimler şeklinde eklenmiştir. Domain farklılaşmasının tüm grubu değil bazı üyeleri temsil ettiği durumlarda, bu üyelerin ağaçtaki dal uçlarına aynı renkte kutucuklarla işaret eklenmiştir. Örneğin Ligaz VI grubunda katalitik birime ek olarak N-terminalde bulunan DRMBL yapısı (DNA repair metallo-beta-lactamase) ile Ligaz I’lerden farklılaşmıştır. Diğer gruplardaki domain farklılaşmaları da bu renk kodları ile takip edilebilir olup, literatüre uygundur.

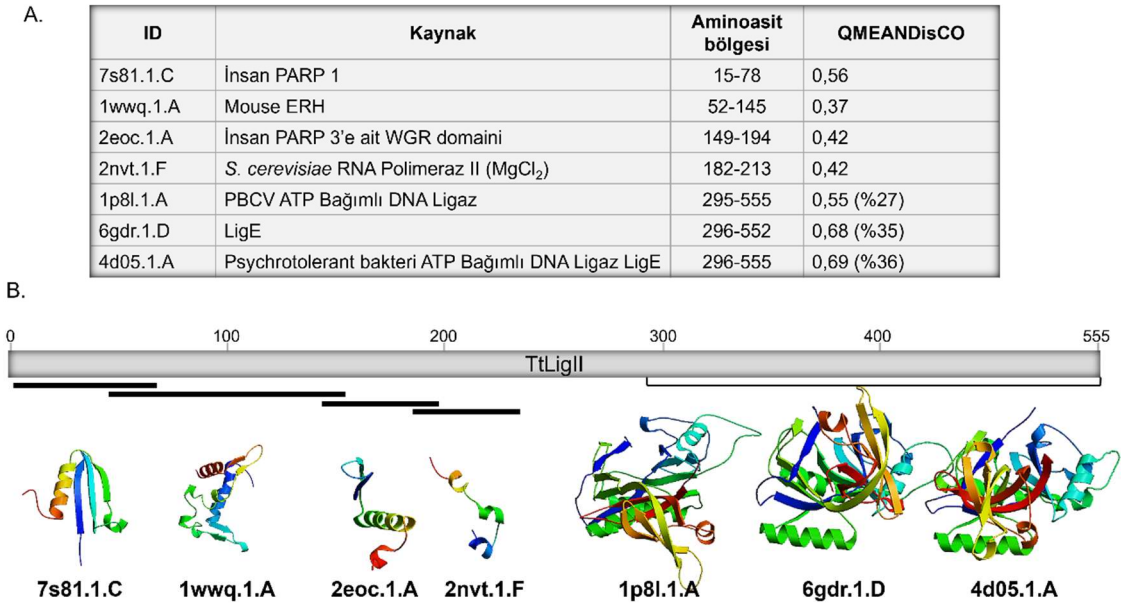
Filogenetik analiz NAD⁺ bağımlı DNA Ligaz enzimlerini ATP bağımlı DNA Ligaz enzim ağacı için dış grup olarak kullanmış olup dış grup beklenildiği gibi ağaç köküne konumlanmıştır. Maksimum likelihood filogenetik ağaç topolojisine genel bakıldığında; dış grup dalından sonra ATP bağımlı DNA Ligaz ortologlarının ağaçta 2

ana dala bölündüğü görülmektedir. İlk ana dal; T3, T4 ve T7 virüs ligazları, Arke ligazları ile Lig B, C ve D üyelerini kapsayan prokaryotik ligazlardan köken alan, omurgalı ve omurgasız ökaryotik Ligaz I alt dalı ile III ve IV'leri ihtiva alt dala bölünmüştür. Ayrıca Ligaz VI olarak adlandırılan bitki ligazlarının LigI alt dalının köküne yerleşerek, LigI alt ailesi ile ilişki kısmen farklılaşmış bir dal olduğu bulunmuştur. İlk ana dalın içinde LigIII ve LigIV'leri kapsayan ikinci alt dal incelendiğinde ise metazoon sünger *Amphimedon queenslandica* ile böceklerden *Apis mellifera* ve *Drosophila melanogaster*'e ait omurgasız ligazlarının aslen omurgalılarda dağılım gösteren Ligaz III grubuna ait enzimler olabileceği, bazı omurgasız türlerinin LigazIII grubu enzimleri de içerebileceği öngörüsünü ortaya çıkartmıştır. Fakat LigIII ve LigIV'leri kapsayan bu ikinci alt dal topolojisi istatistiksel olarak bir değer içermediğinden dolayı bu bulgu Tartışma'da tekrar ele alınmıştır.

Bu tez çalışmasının odaklandığı TtLigII ise benzer diziye sahip hipotetik Ligaz genleri ile birlikte "Ligaz II alt grubu" olarak isimlendirilen diğer ana dalda toplanmıştır. Bu alt grupta TtLigII yanında diğer tekhücreli ökaryotik silli organizmalara ait ligazlar, kDNA ligazlar, omurgasız ökaryotik ligazlar ile bakteriyel Lig E ve virüs ligazlarının yanı sıra funguslar (*Haliotis rufescens*, *Peziza echinospora*, *Morchella snyderi*...), metazoa üyeleri (deniz yıldızı *Anneissia* sp., deniz sümüklü böceği *Aplysia* sp. ve annelid solucan *Capitella* sp.), Oomycete (*Saprolegnia parasitica*, *Pythium insidiosum*) ve Alveolata (*Perkinsus olseni*, *Symbiodinium microadriaticum*) üyeleri gibi çok farklı omurgasız DNA ligazları da yerleşim göstermektedir. Kırmızı renkli kutular ile PFAM analizinin ökaryotik DNA LigII'lerin OB domainlerinin LigI ve LigIV gruplarından OB domainlerden farklılaştığını işaret etmektedir. Bu üyelerin neredeyse tamamının N-terminallerinde koyu kırmızı kutu ile temsil edilen görevleri henüz bilinmeyen bir domain bulunduğu da görülmüştür.

3.1.2. DNA Ligazların 3 Boyutlu Yapı Modellemesi ile Görev İlişkisi

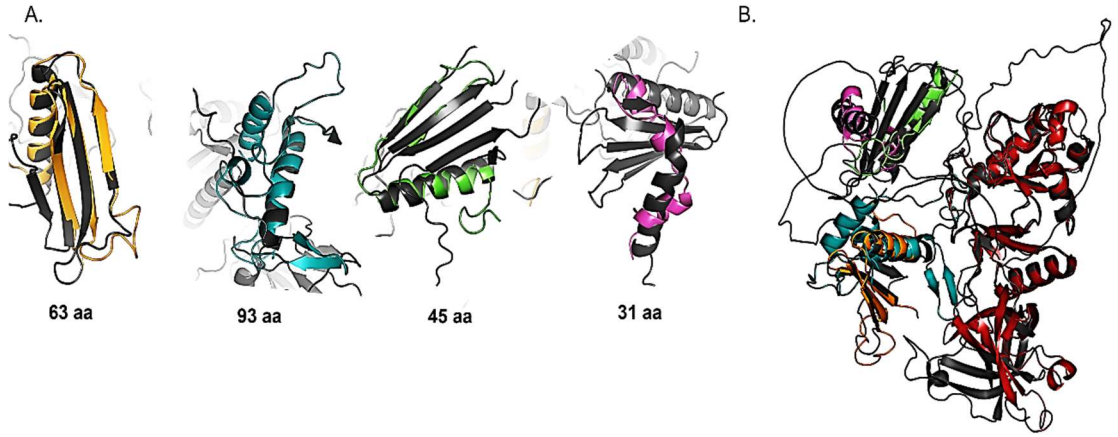
Lig II alt ailesi üyelerinin dizisel farklılaşması ile 3B katlanmasının analizi ile görev ilişkisinin kurulması bu bölümde amaçlanmıştır. TtLigII'nin yanı sıra mitokondride görev yaptığı kesin bilinen kDNA Ligazları ile Ligaz II alt grubunda yerleşim gösteren diğer bazı üyelerin 3 boyutlu yapıları modellenmiştir. TtLigII'nin hem Alpha Fold ile tüm dizinin tahmini katlanmaları hem de Swiss Model'den elde edilen identik dizilerden gelen kısmi/lokal katlanmalar bir arada değerlendirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. TtLigII için yapılan Swiss Model analizinde elde edilen lokal ve domainsel katlanmalar. A. Elde edilen katlanmanın ulaşım numarası, ait olduğu protein, proteinin görevi ve TtLigII'de temsil ettiği aminoasit dizi aralığı verilmiştir. B. Elde edilen lokal katlanmaların Swiss Model görüntüleri ile denk geldiği bölgenin dizinin tamamındaki konumu görülmektedir.

Şekil 3.3'de görüldüğü gibi NTaseD ve OBD'den oluşan merkezi birimin tamamını kapsayan kristal veriler mevcuttur, bunlardan QMean değeri en yüksek olan 4d05.1A modellemenin devamında kullanılmak üzere seçilmiştir. Görevi bilinmeyen N-terminal domainin tamamını kapsayan bir katlanma verisi Swiss Model programı ile elde edilememiştir. Fakat ulaşılan lokal katlanmaların tamamının DNA tek zincir kırıklarının algılanması ve tamirinde görev alıyor olması, N-terminal domainin görevinin DNA hasar algılama, DNA bağlanma ve tamiri olabileceğini ortaya koymaktadır.

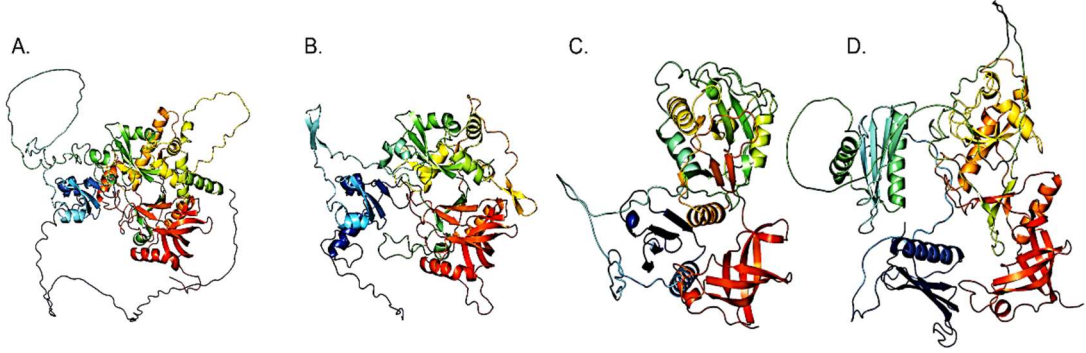
Kristalografi ve AlfaFold'dan gelen in-siliko bulgular birleştirildiğinde, TtLigII enziminin bütünsel yapısının tahmini modeli Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. *TtLig2*’nin Swiss Model’den elde edilen lokal katlanmalarının Alpha Fold ile elde edilen tahmini katlanma üzerine örtüştürülmesi. A. Bölgesel katlanmaların Alpha Fold verisi üzerindeki yerleşimi. B. Tüm lokal katlanmalar ile merkezi birimi kapsayan 4d05.1A yapısının bir arada görünümü. AlfaFold iskeleti gri olarak, büyük ölçüde örtüşme sağlayan 4d05.1A yapısı kırmızı renkte gösterilmiştir.

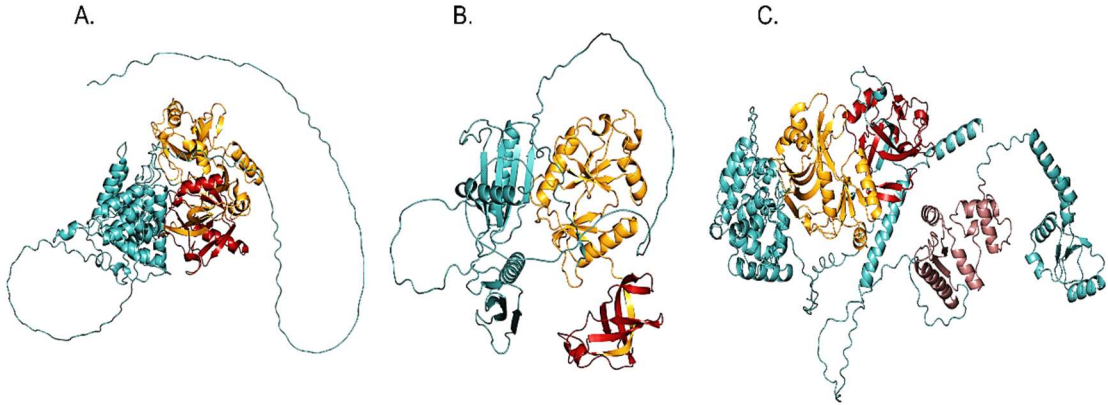
Swiss Model programı ile deneysel verilerden elde edilen tahmini lokal katlanma verileri ile AlfaFold ile elde edilen N terminal domain verileri uyumlu bir şekilde örtüşmektedir.

Ayrıca LigII alt ailesi üyelerinden bazı temsilcilerin de Alpha Fold ile tahmini yapıları modellenmiştir. Bunlardan ikisi kLig α ve β ; diğeri ise XP_0014602731 kodlu Paramecium LigII enzimidir (Şekil 3.5). Şekil 3.5’te mavi ve yeşil bölgeler görevi henüz tanımlanmamış N-terminal domaini, kırmızı ve turuncu bölgeler ise ligaz aktivitesini gerçekleştiren katalitik birim olan NTaseD ve OBD’yi göstermektedir. Özellikle kırmızı renkle gösterilen bölgelerde (OBD) katlanma benzerlikleri dikkat çekmektedir.



Şekil 3.5. Ligaz II alt ailesi üyelerinden 4'ünün AlphaFold program ile 3B yapı modellemesi. A. ve B. sırasıyla kLig- α ve - β , C. Paramecium Lig II, D. TtLig II.

Tetrahymena TtLigI, TtLigII ve TtLigIV için de yukarıdakine benzer bir analiz yapılmıştır (analizde transkripsiyonel olarak sessiz olan TtLigI üyesi (XP_001011861.1) kullanılmamıştır) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Tetrahymena thermophila DNA Ligazlarının 3B yapı modellerinin karşılaştırılması. A; TtLig I, B; TtLig II, ve C; TtLig IV.

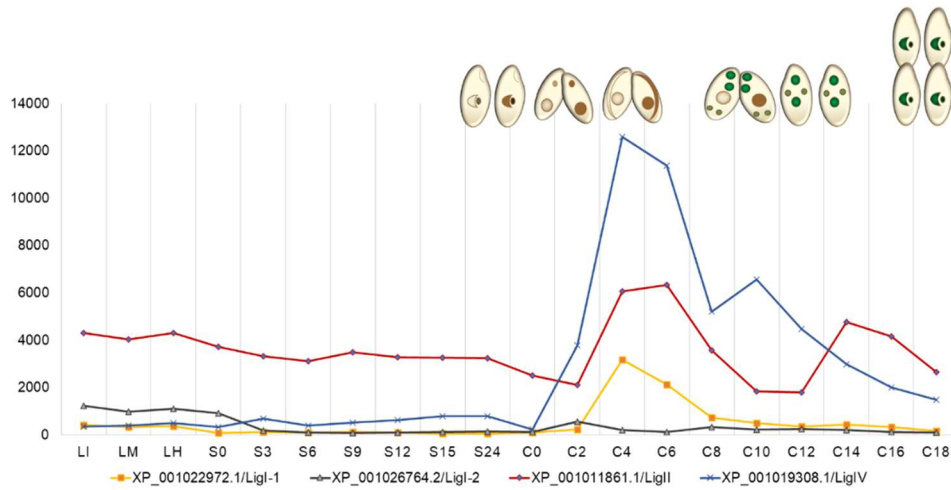
Şekil 3.6’da turuncu bölge tüm ATP bağımlı DNA ligazlar için ortak olan NTaseD, kırmızı bölge ise Ligaz I ve IV için ortak fakat Ligaz II için farklı kökenden gelen OBD’yi gösterir. Şekil 3.6-C’deki pembe bölge ise Ligaz IV ailesi için spesifik BRCT ile LigIV domainini işaret eder.

LigIII üyelerinde görülmekte olup, her alt aile renksiz bloklarla gösterilen spesifik motifler de içermektedir.

3.1.3. *Tetrahymena thermophila* DNA Ligazlarının vejetatif büyüme, açlık ve konjugasyon boyunca mRNA ifade değişimi

Tetrahymena'nın yaşam döngüsünde DNA ligazların görev alabileceği en belirgin süreç konjugasyondur. Mayoz'un yanı sıra kromozom kırıklarının oluşması, IES eliminasyonu, endoreplikasyon gibi DNA ligasyonunu gerektiren pek çok olay konjugasyon esnasında gerçekleşir. Konjugasyon süresince elde edilen transkriptomun Ref-Seq bilgileri *Tetrahymena* Functional Genom Database'de mevcuttur. Bu verilerin bir araya getirilmesiyle Şekil 3.8'deki grafik elde edilmiştir.

Şekil 3.8'deki mavi çizgiyle gösterilen eğri TtLigIV, sarı ve gri ile gösterilen eğriler TtLigI ve kırmızı ile gösterilen ise TtLigII'nin mRNA değişimine aittir. Grafikte yatay eksen konjugasyon sürecini saatsel olarak gösterirken, en üstte bu saatlerde meydana gelmesi beklenen biyolojik olay resmedilmiştir. Vejetatif evrede düşük, orta ve yüksek yoğunluktaki hücre yoğunluğu sırasıyla L1, LM ve LH ile temsil edilirken; S ile gösterilen bölge açlık sürecini, C ile gösterilenler ise konjugasyon sürecini saat olarak vermektedir. Örnek olarak C10, konjugasyonun 10. saatindeki hücrelerin mRNA seviyesini vermektedir.



Şekil 3.8. Vejetatif, Açlık ve Konjugasyon boyunca *Tetrahymena* ligazlarının mRNA ekspresyon seviyelerinde değişimler.

Şekil 3.8'deki mRNA ifade grafiğinde yaşam evreleri sırayla incelendiğinde vejetatif ve açlık evrelerinde en yüksek ifade seviyesinin sadece TtLigII'ye ait olduğu görülecektir. Konjugasyon evresinde dikkati üç keskin yükseliş çeker; bunlardan ilki

MİK'te mayoz ve mayozla ilgili olayların meydana geldiği 4. saattir (C4). Çift zincir kırıklarının oluştuğu ve ardından MİK genomunun replike olduğu bu evrede TtLig1-2 dışındaki tüm Tetrahymena ligazlarının mRNA seviyelerinde, en yüksek seviyenin TtLigIV'e ait olduğu, yaklaşık 3 saat süren dramatik bir artış gözlenir. Yeni MAK'ların gelişmeye başladığı 10. saat civarında sadece TtLigIV'ün seviyesi ilki kadar dramatik olmamakla birlikte ikinci kez artmaktadır. Üçüncü yükseliş grafiği konjugasyonun 14. saatinde meydana gelmekte ve sadece TtLigII'nin seviyesi ikinci kez yükseliş trendi çizmektedir. mRNA seviyelerinde görülen tüm bu artış azalış hareketliliği konjugasyonda tüm ligazların seferber edildiği yoğun bir genom düzenlenmesi olduğuna ve daha da önemlisi açlık şartlarındaki Tetrahymena'nın genomunun korunmasında TtLigII'nin birincil olarak görev üstlendiğine işaret eder. mRNA seviyelerinde görülen tüm bu artış azalış hareketliliği, konjugasyonda tüm ligazların seferber edildiği yoğun bir genom düzenlenmesi olduğuna ve daha da önemlisi vejetatif bölünme ve açlık şartlarında genomun bütünlüğünü koruma görevini asli olarak TtLigII'nin gerçekleştiriyor olabileceğini ortaya çıkartmıştır.

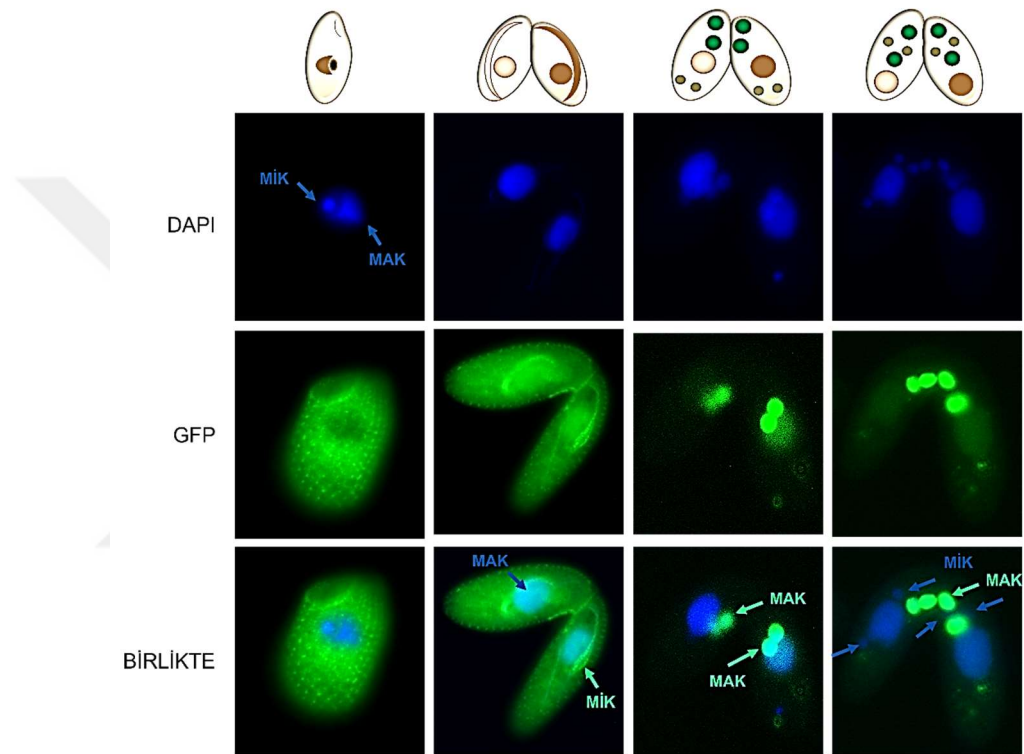
3.2. Deneysel Bulgular

Filogenetik, motif, domain, 3B modelleme ve mRNA analizleri ile görevi hakkında ilk ipuçları elde edilen TtLigII enziminin deneysel karakterizasyonu amacıyla rekombinant protein üretimine dayanan 2 temel yaklaşım benimsenmiştir: TtLigII-sfGFP füzyon enziminin hücre içi lokalizasyonu ile enzimin görev yerinin tanımlanması ve TtLigII-10xHis üretimi-saflaştırılması ile in-vitro ligaz aktivitesinin belirlenmesi.

3.2.1 *T. thermophila* Lig II alt ailesi üyesi TtLig II'nin konjugasyon boyunca hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi

C-terminaline sfGFP takısı eklenen TtLigII enziminin üretilmesi amacıyla TtLigII-sfGFP füzyon yapısı SOEbyPCR metodu ile elde edildikten sonra yüksek kopyalı rDNA orijinli ve kadmiyum ile indüklenebilir MTT promotoruna sahip pIGF vektörüne klonlandıktan sonra konjugatif Tetrahymena hücrelerine, biyolistik silahla transforme edilmiştir. Antibiyotik seçilimi sonrasında tek hücre klonları elde edilmiş, bunlardan CdCl₂ indükleme sonrası ışığa gösteren klonlar TtLigII-cGFP ismiyle stoklanmıştır. Bu hatlar konjugasyon ve stres deneylerinde lokalizasyon teyidi için kullanılmıştır (Malone vd., 2005).

TtLigII'nin konjugasyon esnasında hücre içi lokalizasyonunun araştırılması için TtLigII-cGFP hücre hatları gece boyu 0,25 µg/ml CdCl₂ ile indüklenip, ertesi gün yıkandıktan sonra yabancı ırk *Tetrahymena thermophila* Cu428 ile konjugasyona alınmıştır. Konjugasyon süresince belirli aralıklarla hücre örneği alınarak fiks edilmiştir. Örnek toplanması tamamlandıktan sonra 20 ng/ml DAPI ile boyanan hücreler floresan mikroskopta incelenerek, Şekil 3.9 verilerine ulaşılmıştır (Kataoka ve Mochizuki, 2015).



Şekil 3.9. Konjugasyon sırasında C-terminal GFP takılı LigII'nin hücre içindeki lokalizasyonu.

Şekil 3.9'da üstte konjugasyon esnasında hücrenin geçirdiği nükleer olaylar çizilmiştir; alttaki panelde füzyon proteinin farklı saatlerdeki hücre içi lokalizasyonun floresan mikroskop görüntüleri görülmektedir. Buna göre vejetatif hücrelerde TtLigII-sfGFP sadece sil köklerine lokalize olurken, konjugasyonun 3. saat civarında meydana gelen mayoz esnasında uzayan MİK kromozomları ile az da olsa sil köklerinde lokalize olmaktadır. Ayrıca makroçekirdek'in koyu mavi ile yeşil tonlarının karışımı olan turkuaz rengi alması ise TtLigII'nin 3. saat civarında makroçekirdekte de bulunabileceğine işaret etmektedir. TtLigII-sfGFP'nin MİK'teki lokalizasyon yeri konjugasyon süresince korunmakta olup, 7. saat civarında haploit çekirdeklerin birleşimi ile fertilizasyonu sonrasında oluşan 2 diploid MİK'te de görevine devam ettiği anlaşılmaktadır Şekilde 3. kolonda konjugasyonun "4 MİK" evresinde MAK'ta da kısa süre lokalize olduğu

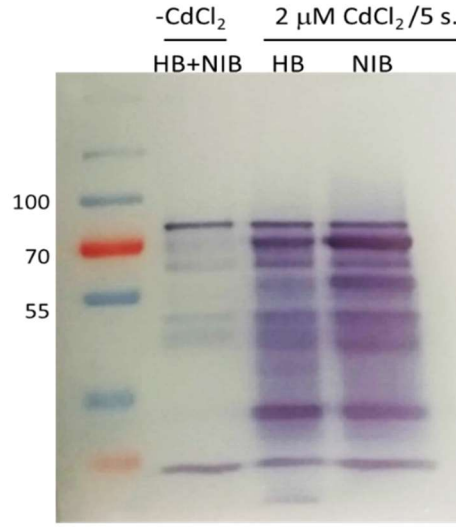
görülmekte olup, son panelde ise konjugasyonun 8-14. saatleri ve sonrasına denk gelen “2 MAK-2 MİK” safhasında sadece gelişmekte olan yeni makronükleuslarda lokalize olduğu belirlenmiştir.

3.2.2 TtLigII’nin *Tetrahymena thermophila*’da homolog ifade sistemi ile rekombinant üretimi, afinitik saflaştırılması ve ligaz aktivite tayini

Araştırmanın bu bölümünde C-terminalinde 10xHis takısı taşıyan TtLigII’nin üretilmesi amacıyla pIGF-TtLigII-His vektörü yapılandırılmış ve konjugatif *Tetrahymena* hücrelerine transforme edilmiştir. Antibiyotik seçilimi ve tek hücre klonlarının oluşturulmasının ardından elde edilen TtLigII-cHis hatları çalışmanın rekombinant üretim ve saflaştırma aşamalarında kullanılmak üzere stoklanmıştır.

3.2.2.1. Uygun tamponun belirlenmesi

Rekombinant TtLig II-10xHis proteininin saflaştırılmasında kullanılacak tamponun belirlenmesi için Hipotonik Sitoplazmik Liziz Tamponu, HB, (10mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl₂ ve **10mM KCl**, %0,05 NP40, %25 (v/v) Gliserol) ile Nükleer liziz tamponu, NLB, (20mM HEPES, pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, **0.42M NaCl**, **0.2mM EDTA**, %0.05 NP40, %25 (v/v) Gliserol) karşılaştırmalı test edilmiştir (Şekil 3.8). *T. thermophila* TtLigII-cHis hücreleri CdCl₂ ile indüklenip peletlenmiş ve pelete 5 katı hacimde adı geçen liziz tamponları eklenerek hücreler iyice çözüldükten sonra buzda 15 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda 18-20G enjektör ile 10 kez al-ver yapıldıktan sonra 30 dk buzda inkübe edilmiştir. Süre sonunda önceden soğutulmuş santrifüjde 15 dk-13000 rpm’de santrifüj edilerek elde edilen izolatlar Şekil 3.10’da incelenmiştir. TtLigII-10xHis proteini 70 kDa’da beklenmektedir.

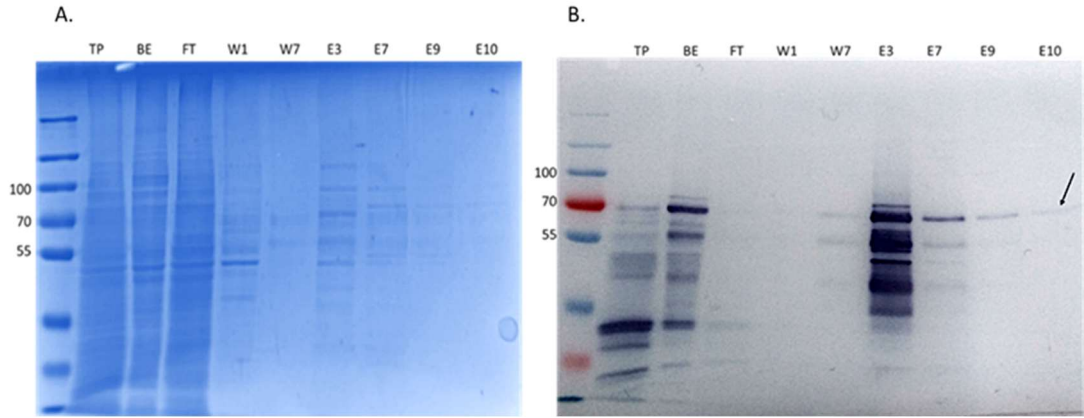


Şekil 3.10. *TtLigII-10xHis*'in hipotonik ve nükleer liziz tamponu ile izolasyon denemesinin anHis antikoruna ile western blot analizi. Negatif kontrol olarak indüklenmemiş (-CdCl₂) hücre peleti kullanılmıştır. *TtLigII-10xHis* proteini 70 kDa'da beklenmektedir.

Şekil 3.10'da NIB kuyusunda 70 kDa'luk protein bandı HB'ye göre neredeyse 2 katı fazla bulunduğundan izolasyon çalışmalarında NLB tamponunun kullanılmasının daha uygun olduğuna karar verilmiştir.

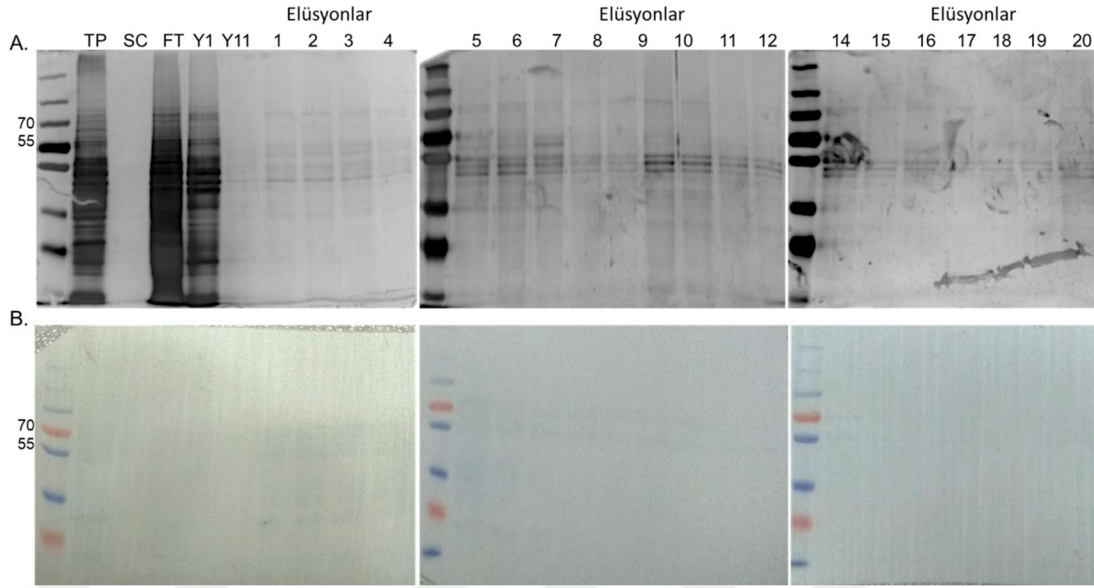
3.2.2.2. *T. thermophila* TtLigII-cHis hücrelerinin flask ve biyorektörde üretilmesi, indüksiyonu ve TtLigII-10xHis'in saflaştırılması

Flask ve etüv şartlarında gerçekleştirilen ilk çalışmada hücre kültürü ve indüklemeye aşamaları, gece boyu büyütülen hücrelerin 2 mM CdCl₂ ile 5 saat indüklenmesi, santrifüjle peletlenmesi, pelet hacimlerinin belirlendikten sonra izolasyonuna kadar -86°C'de saklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Liziz ve saflaştırma metot bölümünde belirtildiği şekilde yürütülmüş, liziz tamponundaki EDTA ultrafiltrasyon metoduyla tampon değiştirilerek uzaklaştırılmıştır. Saflaştırmada 260 nm'de yüksek absorbans veren elüentler jelle yüklenerek Comassie boyama ve Western Blot çalışmalarında kullanılmıştır (Şekil 3.11). Şekil 3.11'de ok ile işaret edilen protein bandı rekombinant olarak üretilen ve afinitik olarak saflaştırılan 70 kDa'luk TtLigII-10xHis proteinini göstermektedir. Şekil 3.11'de görülen Western Blot analizleri sonucunda saflığın en yüksek olduğu 7-11 elüentlerinin in vitro aktivite çalışmalarında kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 3.11. *TtLigII-10xHis* rekombinant proteininin izolasyon ve afinitik saflaştırılması. A. NanoDrop ölçümlerine göre pozitif olan elüentlerle birlikte (E3, E7, E9, E10) toplam protein (TP), tampon değişimi (BE), Ni-NTA'ya bağlanmayan faz (FT) ile ilk ve son yıkama örneklerinin (W1-W7) SDS-PAGE analizi; Comassie boyama görüntüsü. B. Anti-His antikoru ile western blot analizi. Ok: saflaştırılmış 70 kDa'luk *TtLigII-10xHis* rekombinant proteinin işaret etmektedir.

TtLigII-10xHis enziminin yüksek konsantrasyon ve verimde elde edilmesi amacıyla, detayları metot bölümünde verilen biyoreaktör şartlarında büyütülen *TtLigII-cHis* hücreleri 6 saat indüklendikten sonra, yukarıda anlatılan şekilde protein izolasyonu ve afinitik saflaştırma aşamalarına alınmıştır. Bu deneyde öncekinden farklı olarak liziz esnasında ortama salınan genomik DNA'nın parçalanması için DNaz enzimi eklenmiş, böylece aktivite çalışmaları esnasında *TtLigII*'nin katalitik domainini meşgul ederek aktivite kaybının önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Sonrasında DNaz'ın *in vitro* ligaz aktivitesi esnasında substrat DNA'ları parçalayarak aktivite kaybına neden olmaması için Stirred Cell ile ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır. Stirred-cell sonrasında Ni-NTA saflaştırması için gerekli olan tampon değiştirme ise ultrafiltrasyon metodu ile gerçekleştirilmiş, bu esnada rekombinant proteinin konsantrasyonu da sağlanmıştır. Elde edilen proteinler gümüş boyama ile görüntülenmiş, tüm elüentler Western Blot analizine alınmıştır (Şekil 3.12).



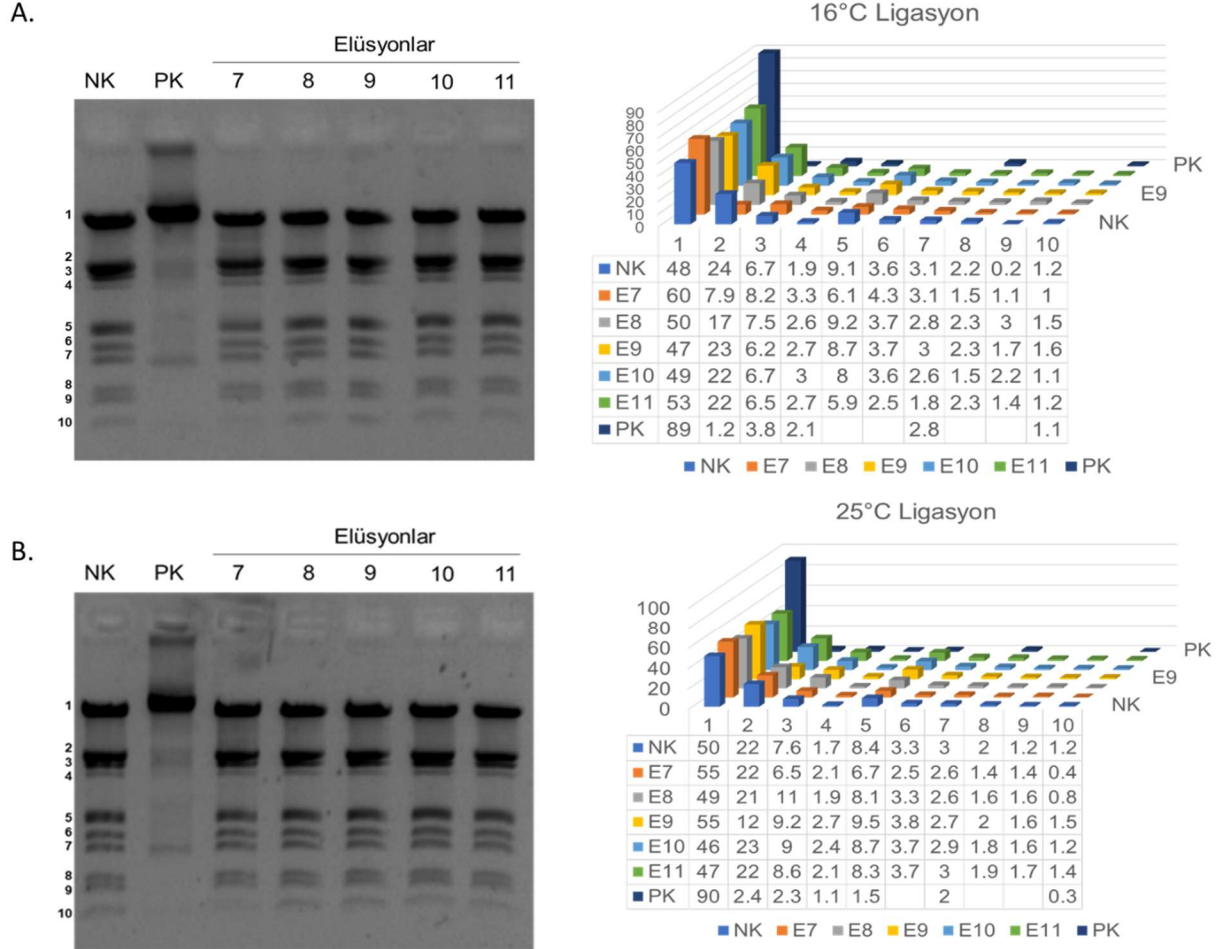
Şekil 3.12. Biyoreaktör kültür hücrelerinden protein ekstratının izolasyonu ve TtLigII-10xHis'in afinitik saflaştırılması. A. Gümüş boyama, B. Western Blot. TP: Toplam protein ekstratı, FT: Ni-NTA kolonuna bağlanmayan proteinler, Y1 ve Y11: kolon yıkamasının ilki ve sonuncusu,

Şekil 3.12'de Western Blot analizinde görülen elüsyonlar 70 kDa ve 55 kDa'da görülen bantlara göre 1-6. ile 7-14. elüsyonları şeklinde iki grup olarak bir araya getirilmiştir; bu elüentler ligaz enzimi saklama tamponunda 1 gece diyaliz edildikten sonra *in vitro* ligaz aktivite çalışmalarında kullanılmışlardır.

3.2.2.3. TtLigII-10xHis enziminin *in-vitro* ligaz aktivite analizi

Flaskta kültüre edilmiş hücrelerden afinitik saflaştırılan TtLigII-10xHis proteinleri (Şekil 3.11) *in vitro* ligaz aktivite reaksiyonunda enzim olarak kullanılmıştır. Tek zincir kırıklarını taklit eden yapışkan uçlu substrat olarak λ faj genom DNA'sının EcoRI/HindIII ile parçalanmış ve saflaştırılmış parçalarından oluşan DNA marker kullanılmıştır (λ EcoRI/HindIII, Thermo SM091).

Pozitif kontrol olarak ticari T4 Ligaz enzimi kullanılmıştır. Agaroz jele yüklenen reaksiyon ürünleri hem kalitatif olarak hem de batların yoğunlukları ölçülmek suretiyle kantitatif olarak aktivite değişimleri belirlenmeye çalışılmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. *T4LigII-10xHis*'in λ faj *EcoRI/HindIII* ile parçalanmış DNA parçalarını ligasyon analizi. A ve B sırayla 16°C ve 25°C'de 16 saat ligasyon sonuçları. PK. Pozitif kontrol (NEB T4 Ligaz), NK. Negatif kontrol (Elüsyon tamponu).

Şekil 3.13'de sol tarafta bulunan agaroz jel elektroforez görüntüsü ve sağda ise jeldeki bantların absorbans değerlerinin bulunduğu grafik görülmektedir. Reaksiyona göre tıpkı pozitif kontrolde görüldüğü gibi alttaki bantların ligasyonla birleşerek 1. bant hattında yoğunluğunun artması ve buna bağlı olarak absorbans grafiğinde bu banda ait 90 birimlik yoğunluk seviyesinde veya 49 birimlik negatif kontrol değerinden daha yüksek olması beklenmektedir. Buna göre her iki sıcaklık denemesinde turuncu sütunlar (54,76 birim) ile belirtilmiş olan Elüsyon 7 ile sarı sütun (54,52 birim) ile temsil edilen Elüsyon 9'un 1 numaralı bantlarının absorbansı açık mavi (49.5 birim) ile gösterilmiş negatif kontrole göre yüksektir. Ayrıca Elüsyon 7 ile gerçekleştirilen reaksiyonun 10. DNA bandı oldukça azalmış görülmektedir. Bu aktivite verilerinin negatif olmasının ana nedeni

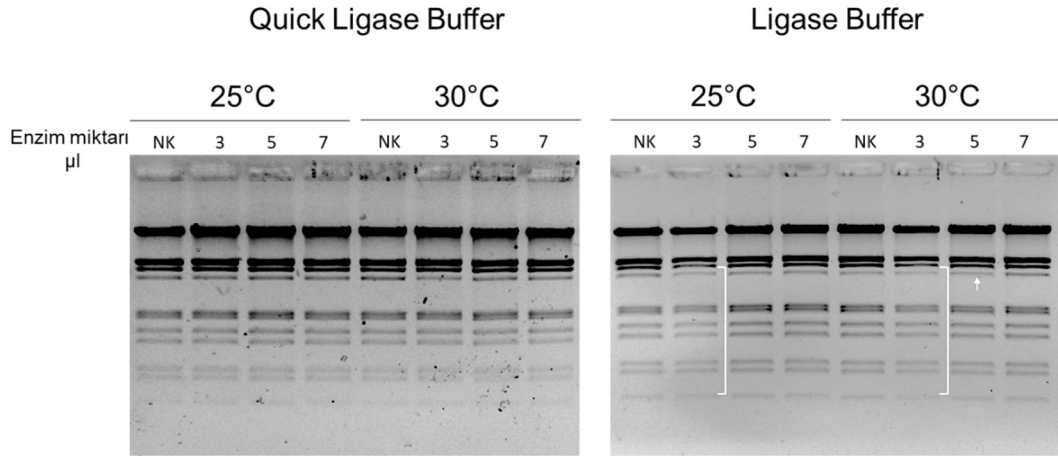
olasılıkla imidazol içeren elüentlerle yapılmış olmasıdır. İmidazol enzimler için oldukça güçlü inhibitördür. Bu nedenle 7-11. elüentler bir araya getirilerek imidazolü uzaklaştırmak için diyaliz edilmiş ve sonraki çalışmalarda tekrar kullanılmıştır.

Ayrıca pozitif kontrolün %100 aktivite göstermemiş olması nedeni ile reaksiyon tamponunda da iyileştirmeye ihtiyaç olmuştur; Bauer ve arkadaşlarının geliştirerek kullandığı Quick Ligation Buffer (QLB) sonraki aktivite çalışmalarına dahil edilmiştir (Tablo 3.3) (Bauer vd., 2017).

Tablo 3.1. Ligasyon reaksiyon tamponlarının karşılaştırılması. T4 Ligase Buffer içeriğinin QLB'den temel farkı DNA'yı yoğunlaştıran PEG 6000 içermemesidir.

İçerik	T4 Ligase Buffer	Quick Ligase Buffer
Tris-HCl	50 mM	66mM
MgCl ₂	10 mM	10 mM
ATP	1 mM	1 mM
DTT	10 mM	1 mM
PEG 6000	-	%6

In vitro ligaz reaksiyonlarında aktivite gösteren optimum enzim oranının belirlenmesi için saflaştırılan enzimden 3, 5 ve 7'şer µl kullanılmıştır. Ayrıca optimum aktivite şartlarının belirlenmesi için iki farklı tampon ile iki farklı sıcaklık sınanmıştır (Şekil 3.14). Bu reaksiyonlarda net bir aktivite bulgusuna erişilemediği için reaksiyonlarda daha yüksek enzim konsantrasyonuna ihtiyaç olduğu kanaatine varılmış, TtLigII enziminin tekrar üretilerek afinitik saflaştırılmasına karar verilmiştir.

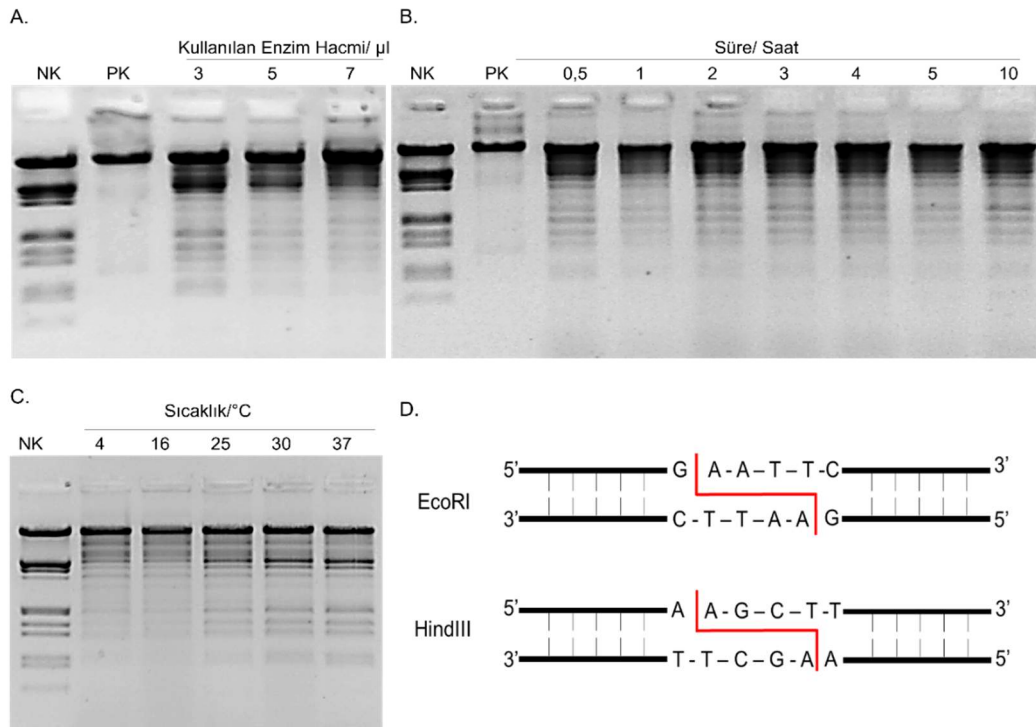


Şekil 3.14. QLB ve T4 ligaz tamponu LB ile 25 ve 30°C’lerde gerçekleşen ligasyon reaksiyonları NK: 95°C’de 15 dk kaynatılarak inaktif duruma getirilmiş deney grubu enzimi.

Aktivitenin daha iyi şartlarda çalışması için enzimin yüksek konantrasyonda ve aktivite sonuçlarını yanıltmayacak şekilde DNA’dan arındırılmış şekilde üretilmesi amacıyla daha büyük kültür hacmi ile tekrar edilen üretim ve saflaştırma bulguları Şekil 3.12’de görülebilir. Bu kez elde edilen elüentler bir araya getirilerek aktivite çalışması öncesi diyaliz ile tampon değişimine alınmış ve miktarı ölçülerek konsantrasyonu 30 mg/ml olarak belirlenmiştir. Bu enzim ekstratı ile 200 ng EcoRI/HindIII faj genom DNA substratı (Şekil 3.14-D) kullanılarak *in vitro* ligaz reaksiyonları gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.14).

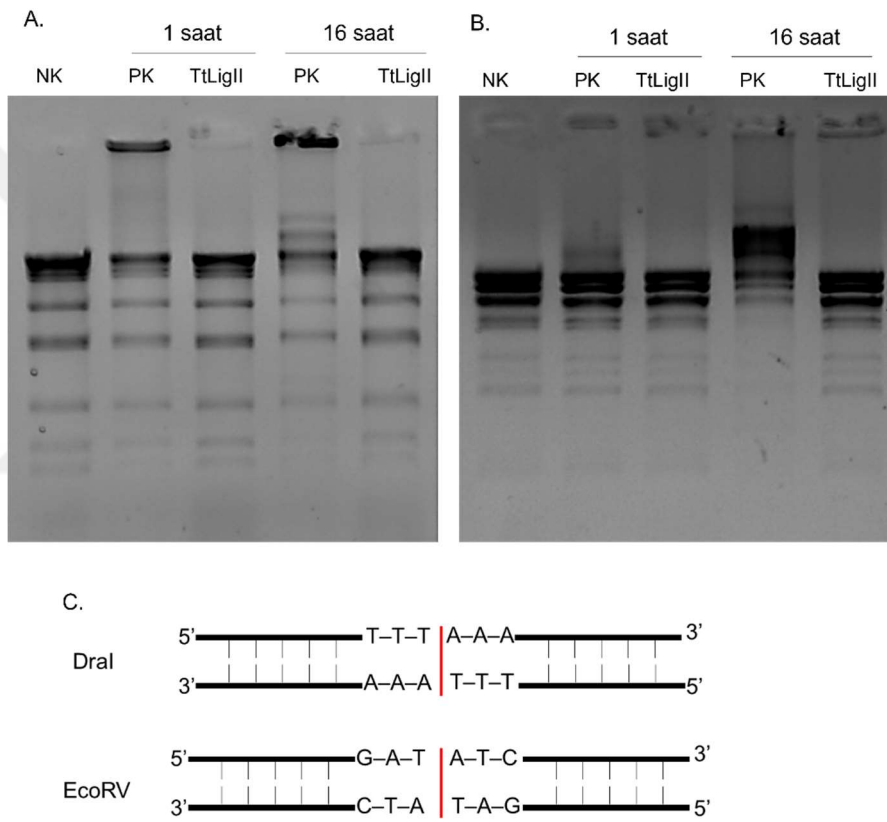
Şekil 3.14-A’da görülen ligaz reaksiyonu 10 µl hacimde kurulmuş olup 25°C’de 16 saat süreyle, deney grubu enziminin 3, 5 ve 7 µl hacimde kullanılmasıyla aktivite gösteren optimum enzim miktarı belirlenmeye çalışılmıştır. Şekil 3.14-B’de optimum aktivite süresinin belirlenmesi amacıyla, 200 ng substrat, optimum enzim hacmi olan 7 µl TtLigII enzimi ve 25°C sıcaklıkta süreye bağlı aktivite değişimi analiz edilmiştir. Şekil 3.14-C’de ise substrat miktarı 300 ng’a çıkartılarak, 7 µl TtLigII’nin optimum olarak belirlenmiş 1 saatlik reaksiyon süresinde aktivite göstermesi için en uygun sıcaklığın belirlenmesi amaçlanmıştır. Reaksiyonlara süre sonunda 1 µl Proteinaz K (20 mg/ml) ve yükleme boyası eklenerek 37°C’de 30 dk inkübe edildikten sonra %1’lik agaroz jelde 90V’da 50 dakika elektroforez edilmiştir. Pozitif kontrol (PK) reaksiyonunda ticari T4 ligaz enzimi bulunmaktadır ve Şekil 3.14-A’da PK kuyusunda görüldüğü üzere tüm küçük bantların birleşerek büyük DNA bandına dönüşmüş olması reaksiyon şartlarının deney için uygun olduğunu ifade eder. Negatif kontrol (NK) ligaz reaksiyonunda enzim yerine 5 µl saklama

tamponu kullanılmıştır. NK'de beklendiği gibi hiçbir DNA bandı ligasyona uğramamıştır. Deney grupları olan 3, 5 ve 7' de ise enzim miktarı en yüksek olan 5 ve 7 μ l hacimli gruplarda alttaki küçük fragmentlerin bir araya gelerek üstteki iki büyük DNA bandını oluşturduğu görülmektedir. Miktarla bağlı ilk reaksiyon sonucunda sonraki çalışmalarda deney grubu enzim hacminin 7 μ l olarak kullanılmasına karar verilmiş, süreye bağlı aktivite değişiminin belirlenmesi için bu 25°C'de 30 dk, 1-10. saatlerdeki ürün oluşumu analiz edilmiştir (Şekil 3.15 B). Buna göre 16. Saatte görülen total aktivitenin esasen ilk 1 saatte oluştuğu görülmüş, sonraki çalışmalar için reaksiyon süresi 1 saat olarak seçilmiştir. Bu substrat ile yapılan son optimizasyon çalışması sıcaklığa bağlı 1 saatlik aktivite değişimi olup, 3.15.C'de görüldüğü üzere yapışkan uçlu DNA fragmentlerinin ligasyonunda TtLigII için en uygun sıcaklık 4°C'dir. Böylece rekombinant üretilip afinitik saflaştırılan TtLigII-10xHis enziminin ATP bağımlı DNA ligaz aktivitesine sahip olduğu deneylerle ispat edilmiştir.



Şekil 3.15. TtLigII-10xHis'in T4 Ligasyon tamponundaki ligasyon verimliliği. A. Farklı hacimlerdeki enzimin aktivitesi. B. 7 μ l enzim ve 200 ng substrat ile süreye bağlı optimizasyon. C. 7 μ l enzim, 300 ng substrat ve 1 saatlik reaksiyonun farklı sıcaklıklardaki verimi. D. EcoRI ve HindIII ile kesim sonucu oluşan DNA fragmentlerinin yapışkan uçları

Benzer bir aktivite çalışması λ DNA'sının DraI ve EcoRV enzimiyle kesilmesiyle oluşturulan küt uçlu DNA fragmentlerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir, bu küt uçlu DNA parçalarının ligasyon reaksiyonu bulguları Şekil 3.15'te görülmektedir. Ligasyon reaksiyonu daha önce belirlenen 7 μ l enzim ve 16°C sıcaklık ile 1 ve 16 saat süreler ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. *TtLigII-10xHis'in T4 Ligasyon tamponundaki ligasyon aktivitesi sonucu ürünlerin oluşma verimliliği. A. DraI ile üretilen DNA fragment substratlarının in vitro ligasyon analizi, C. ve D 7 μ l enzim, 300 ng substrat ve 1 saatlik reaksiyonun farklı sıcaklıklardaki verimi. E. DraI ve EcoRV ile kesim sonucu oluşan DNA fragmentlerinin küt uçları.*

TtLigII enziminin çalışılan bu şartlarda küt uçlu DNA fragmentlerini birleştirmekte tek zincir kırıklarını mimik eden şartlardaki gibi etkin olamadığı bulunmuştur. Küt uçlu DNA fragmentlerinin birleştirilmesinde pozitif kontrol olarak kullanılan T4 ligazın da etkinliği düşüktür.

4. SONUÇ, TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. Sonuç

Bu tez çalışması kapsamında yürütülen *T. thermophila* DNA Ligaz enzimlerinden TtLigII'nin *in silico*, *in vivo* ve *in vitro* karakterizasyon çalışmaları 3 ana sonuç altında özetlenebilmektedir: i) Afinitik saflaştırılan rekombinant TtLigII-10xHis enzimi ile kurulan *in vitro* ligasyon reaksiyonları TtLigII enziminin DNA tek zincir kırıklarının fosfodiester bağlarını oluşturduğunu göstermiştir. ii) TtLigII-GFP füzyon proteinini yüksek miktarda üreten (overekspres) rekombinant hücre hatlarıyla mikroskopi çalışmaları, füzyon enzimin aç hücreler ile konjugatif hücrelerde mitokondri, MİK ve yeni gelişmekte olan MAK'a lokalize olduğunu göstermiştir. Bu veriler TtLigII'nin mRNA ifade analizleri ile bir araya getirilerek değerlendirildiğinde; enzimin konjugasyonun mayoz safhasında, MAK gelişiminde, vejetatif hücrelerin ise MİK mitozu ve MAK'ın bölünmesi ile mitokondrilerin bölünmesi esnasında görev üstlenebileceği ortaya koymuştur. iii) Bu deneysel verilerle desteklenen filogenetik analizler ise, ökaryotik ATP bağımlı DNA Ligaz ailesi altında "Ligaz II alt ailesi" oluşturulması ile sonuçlanmıştır.

Ligaz II alt ailesi üyelerinin kökeni ile ilgili olarak yapılan değerlendirmeler neticesinde LigII geninin, prokaryot ve virüs ligazları ile yakın filogenetik ilişkiye sahip olan ökaryotik tekhücreliler (protistler), funguslar ile yumuşakçaların (mollusklar) atasına horizontal gen transferi ile virüslerden geçmiş olabileceği yeni bir hipotez olarak sunulmuştur.

Özetle bu tez çalışması ile yeni bir Ligaz enzim alt ailesi tanımlanarak "Ligaz II enzim alt ailesi" ismi verilmiş, bu isimle adlandırılan ilk üye olan TtLigII'nin ilk deneysel karakterizasyon çalışmaları yürütülmüş ve tekhücreliler, funguslar ile mollusklarda LigI ve LigIV'ün yanında LigII ligazların da çekirdek ve mitokondri genomunda tamir ve replikasyon görevlerini üstlendiği sonucuna varılmıştır.

4.2. Tartışma

Biyoinformatik veriler protist, fungus ve molluska gibi bazı omurgasız ökaryotik organizmalarda dağılım gösteren TtLigII ve ortologlarının bitkiler, böcekler ve omurgalı ökaryotlarda bulunmadığını göstermiştir. Filogenetik analizler LigII'lerin LigE gibi

bakteri ligazları ile ortolog olabileceğini ve virüs ligazları ile olan benzerlik ilişkisi ise bakterilerden virüs aracılığı ile LigII'lerin protist, fungus ve molluska gibi bazı omurgasız ökaryotlara horizontal gen transferi ile aktarıldığını işaret etmektedir. *In vitro* ligaz reaksiyonundan elde edilen TtLigII aktivite verilerine göre çift zincirli DNA'larda bulunan fosfodiester bağ çentiklerini tamir edebildiği üzerine veriler, aşağıda LigII'lerin daha kapsamlı değerlendirmesi ile sonuçlanmıştır.

4.2.1. Rekombinant TtLigII enzimi ligaz aktivitesine sahiptir

Filogenetik analizler ile ATP bağımlı DNA ligaz enzimi olduğu öne sürülen TtLigII'nin rekombinant formunun ligaz enzim aktivitesine sahip olduğu *in-vitro* analizleri ile teyit edilmiştir. Buna göre TtLigII λ DNA'sının EcoRI ile kesilmesiyle oluşturulan yapışkan uçlu fragmentlerin hibridizasyonundan sonra oluşan 5' A-G 3' nükleotitleri arasında, HindIII ile oluşturulmuş fragmentlerin uçlarda hibridizasyonundan sonra oluşan 5' A-A 3' nükleotitlerinin arasında eksik olan fosfodiester bağlarının oluşturulmasını katalizleyebilmiştir.

Çift zincir kırıklarını taklit eden küt uçlu fragmentlerin birleştirilmesi çalışmalarında hem TtLigII'nin hem de pozitif kontrol olarak kullanılan T4 Ligaz'ın etkinliği düşük çıkmıştır. Bauer ve arkadaşlarının (2017) rekombinant ligaz enzimlerinin etkinliklerini araştırdıkları çalışmada da PBCV ve T4 Ligaz'ın çift zincir kırıklarını birleştirme etkinliği sırayla %8 ve %40 civarında bulunmuş olduğundan bu sonuç şaşırtıcı değildir. Ancak NTaseD ve OBD dışında domain taşımayan PBCV Ligaz'ın N-terminaline T4 Ligazın NTD dizisi, insan LigIII'ünün çinko parmak motifi ya da *Sulfolobus solfataricus*'un çift zincir DNA'ya bağlanma proteinin N-terminal bölgesi eklendiğinde küt uçlu DNA'yı birleştirme etkinliğinin sırayla %22, %29 ve %44'e arttığı gözlenmiştir (Bauer vd., 2017). Bahsi geçen NTD TtLigII'de doğal olarak var olduğundan küt uçlu DNA'nın birleştirilmesinde sonuç alınamaması enzimin konsantrasyonu ve saflığının düşüklüğü ile de ilgili olabileceğinden, eldeki bulgular küt uçlu DNA fragmentlerini birleştirme etkinliği üzerine çıkarımda bulunmak için henüz yeterli değildir.

Böylece *Tetrahymena thermophila* genomunda var olduğu belirlenen 4 ligaz geninden herhangi bir ligaz enzim alt ailesi ile kategorize edilmemiş, TGD kaydı Ocak 2023 itibariyle "DNA Ligaz domaini taşıyan protein" olarak tanımlanan enzimin bir ATP bağımlı DNA Ligaz ortoloğu olduğu bu çalışma ile kesinleştirilmiştir. TtLigII'nin

böylece *T. thermophila*'da görevi ile temsil ettiği alt ailenin canlılar dünyasında dağılımı ve önemi aşağıda açıklanmaya çalışılmıştır.

4.2.2. PFAM ve filogenetik analiz bulguları literatür ile uyum içindedir

PFAM analizi DNA Ligazlar'ın katalitik aktivite gösteren minimal yapısının NTaseD ve OBD olarak bilinen iki domainden oluştuğunu teyit etmiştir. NAD ve ATP bağımlı Ligazlarda NTD iki PFAM kodu ile temsil edilirken OBD ise 3 farklı kodla temsil edilmektedir (Tablo 4.1). PFAM kodlarının üyeler içindeki dağılımı ile bu çalışmada sunulan filogenetik ağaç topolojisi örtüşmektedir. Filogenetik ağaçta NAD bağımlı DNA Ligaz üyeleri beklenildiği gibi dış grup olarak konumlanmış olup ATP bağımlı DNA ligazlar ise OBD'lerinin ait olduğu PFAM ailesine göre iki temel grupta dallanma göstermiştir (Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan DNA Ligaz üyelerinin PFAM analizleri. Bu analiz ile katalitik merkezlerini oluşturan temel protein ailelerinin korunmuş şekilde farklılık gösterdiği görülür.

Ligaz Grupları	NTD için PFAM kodu	OBD için PFAM kodu
1) NAD bağımlı ligazlar		
• Lig A	PF01653.21	PF03120.19
2) ATP bağımlı ligazlar		
Arke Ligazları		
• Lig I		
Bakteri ligazları		
• Lig B		
• Lig C		
• Lig D		
Protostome, Echinoderm ve Omurgalı Ökaryotik Ligazları	PF01068.24	PF04679.18
• Lig I		
• Lig III		
• Lig IV		
Bitki Ökaryotik Ligazları		
• Lig I		
• Lig IV		
Viral DNA Ligazlar		
• Viral ligazlar		
Bakteri Ligazları		
• Lig E		
Omurgasız Ökaryotik Ligazlar (Tek Hücreli, Rotifer, Mollusk ve Fungus)	PF01068.24	PF14743.9
• Lig II (bu çalışma ile eklenmiştir)		
• kDNA Ligazlar		

4.2.3. Tip 1 Katalitik Birimine sahip LigI, LigIII ve LigIV DNA ligazları arke ligazlarından köken alır

Tip 1 Katalitik Birime sahip enzimler ökaryotik LigI, III, IV, arke ligazları ile bakteriyel ATP bağımlı DNA ligazları olan Lig B, Lig C ve Lig D'dir (Tablo 4.1). Bu üyelerin filogenetik ağaç dağılımlarına bakıldığında 3 durum söz konusudur: i) Bu üyeler Tip 2 Katalitik Birim taşıyan üyelerden ayrılarak Tip 1 Katalitik Birim grubunu oluşturmuştur. ii) Tip 1 Katalitik Birim ana dalı tüm ökaryotlarda bulunan LigI ve IV ile omurgalılarda bulunan Ligaz III alt dallarına ayrılmıştır. iii) T3 ve T7 virüsleri, arkeler ve ATP bağımlı bakteri (Lig B, C ve D) ligazları ise Tip 1 Katalitik Birim taşıyan ana dalın köküne yerleşmiştir.

Literatürde doğrudan ökaryotik ligazların evrimsel geçmişine açıklık getirmeyi hedefleyen bir yayın bulunmamasıyla birlikte, ilk filogenetik görüş Yutin ve Koonin'in (2009) NCLDV virüs DNA ligazlarının evrimsel ilişkilerini açıklamaya çalıştıkları makalelerinde Ligaz III'lerin Ligaz IV'lerden köken aldığına dair hipotezleridir (Yutin ve Koonin, 2009). Simsek ve Jasin (2011) ise elde ettikleri veriler ışığında Ligaz III'lerin atasal bir gen olduğunu ve metazoan evrimi sonrasında omurgasız canlılardan kaybedildiğini öne sürmüşlerdir (Simsek ve Jasin, 2011). Tüm ökaryotik ligazların filogenetik ilişkisi hakkında yapılan en kapsamlı çalışma ise Williamson ve Leiros'un geniş kapsamlı PFAM çalışmaları ile bakteri ligazlarının ilişkilerini açıklamaya çalıştıkları yayınlarıdır: Yaptıkları geniş kapsamlı PFAM analizlerinde ATP bağımlı DNA ligazların OBD'lerine göre iki ana ligaz grubu olarak kategorize olduğunu; ardından yaptıkları "dizisel benzerlik ağı" (sequence similarity network- SSN) analizleriyle de Ligaz I'lerin replikatif arke ve bakteriyel ligaz B'ler ile; Ligaz III ve IV'lerin ise sırasıyla bakteriyel BER tamirinde görev alan bakteriyel Lig C'ler ve NHEJ'de görev alan Lig D'ler ile yakın gruplar oluşturduğunu göstermişlerdir (Williamson vd., 2016; Williamson ve Leiros, 2019). Bu ilişkiyel analiz, arke ligazlarının hem farklılaşarak Lig C ve Lig D'yi meydana getirdiği öne sürülen bakteriyel LigB'nin hem de ökaryotik ligazların atası olabileceği şeklinde açıklanmıştır. Buna göre arke ligazları hem LigI'lerin hem de LigIII ve LigIV'lerin ortak atasına doğrudan transfer edilmiş olabilirse de LigIII ve LigIV'lerin sırasıyla LigC ve LigD'den horizontal gen transferiyle de ökaryotlara aktarılmış olması da olasıdır. Bu literatür verileri, üyelerin yapısal ve görevsel karakterleriyle birlikte değerlendirildiğinde, bu çalışmadaki

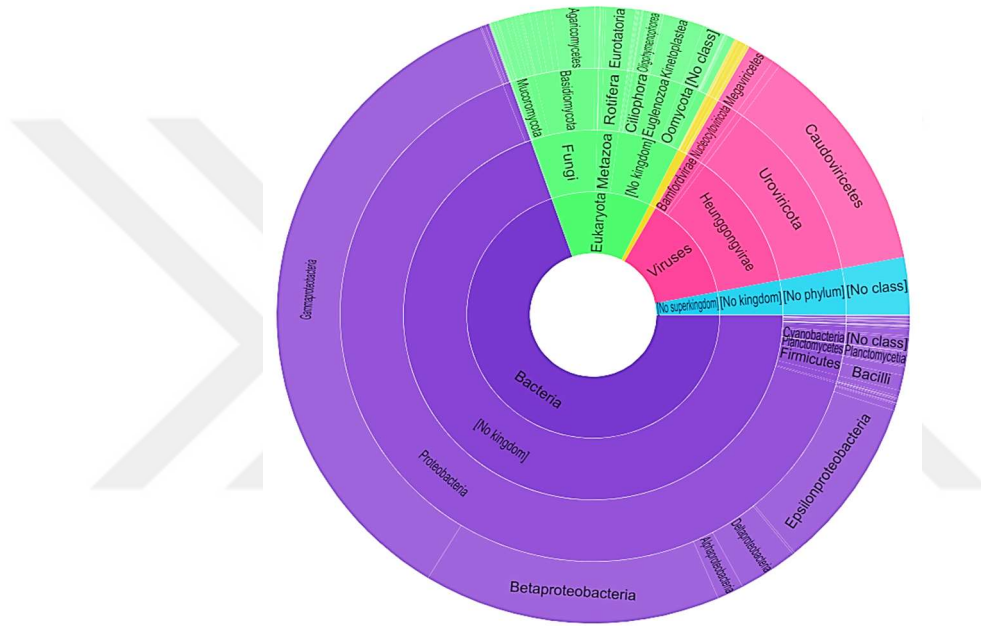
filogenetik ağacın yukarıda izah edilen LigI alt dalı ile LigIII ve LigIV alt dallarının ilişkili yapısı daha büyük anlam kazanmaktadır.

Filogenetik ağacın bu ana dalında litetürdeki durumu belirsiz olan tek grup ise Ligaz I'lere yakın dallanma göstermiş olan ve sadece bitkilerde dağılım gösteren Ligaz VI'lardır. LigVI'ların yapısal kompozisyonlarına bakıldığında N-terminallerinde DRMBL (DNA repair metallo-beta-lactamase) domaini bulunduğu görülür. DRMBL korunmuş 5 farklı motif içerir ve bu katlanmayı taşıyan enzimler DNA ya da RNA'yı metabolize etmekte olup, β -CASP çatısı altında toplanmışlardır (Callebaut vd., 2002). DNA metabolizmasında rol oynayan β -CASP üyelerinin DSB'nin tamirinde rol oynadığı belirlenmiş olduğundan, bitkisel LigVI'nın görevinin NHEJ bağlantılı olduğu öne sürülmüştür. Fakat bu hipotez mutasyon ve karakterizasyon çalışmalarıyla test edildiğinde DSB tamirinde Ligaz VI'nın değil Ligaz IV'ün rol oynadığı, Ligaz VI'nın ise tohumlarda oksidatif stres sonucu oluşan DNA hasarlarının tamirinde görev aldığına dair bulgular bildirilmiştir. Bu çalışmada sunulan filogenetik ağaçta LigVI'ların oksidatif strese hasar gören DNA'nın tamirinde görev alan Lig I'lere yakın filogenetik yerleşimi bu açıdan tutarlıdır (Bonatto vd., 2004; Waterworth vd., 2010). Bu değerlendirmeler ışığında, LigVI'ların görev zamanı tohum gelişimiyle sınırlı olsa da görev itibari ile Ligaz I alt aile üyesi olduğu kabul edilebilir bulunmuştur.

4.2.4. Tip 2 Katalitik Birim taşıyan ligazlar viral kökenlidir

PFAM ve filogenetik ağaç analiz sonuçları LigII'ler açısından değerlendirildiğinde, ilk göze çarpan LigII'lerin dağılım gösterdiği organizmalardır. Bu organizmal dağılıma göre Katalitik Birim 2 ile karakterize LigII enzimleri, Alveolata, Ameoboa, Oomycete, Filasterea ve Metazoa grubu ökaryotik taksonlarda dağılım göstermektedir ancak ağaçta değerlendirilen ligaz üyeleri arasında LigII'ye dahil bir bitki ve maya üyesi bulunamamıştır. Filogenetik ağaç analizinde kullanılmak üzere üyeler seçilirken TtLigII'nin bulucu olarak kullanıldığı BLAST analizi maya gruplarıyla sınırlandırıldığında elde edilen tek üye olan *Ogataea haglerorum*'a ait (NCBI erişim numarası: KAG7697268.1) maya ligazı, PFAM analizlerine göre Tip 1 Katalitik Birime sahip olup, filogenetik ağaçta da LigIV'lerle birlikte yerleşim göstermiştir (Şekil 3.2). Buna ek olarak mayalarda LigII grubu ligazların bulunup bulunmadığı ayrıca PFAM veri tabanında “Katalitik Birim 2” bulunduran organizmaların taranması ile de test edilmiştir (Şekil 4.1). Şekilde “Katalitik Birim 2” domain organizasyonuna sahip organizmaların

dağılım grafiği görülmektedir; grafikte yeşil renkle gösterilen dilim ökaryotik grupları, mor ile temsil edilen dilimler bakterileri ve pembe ile temsil edilenler ise virüs gruplarını ifade etmektedir. Ökaryotik dilimde yer alan organizmal gruplara bakıldığında Basidiomycota ve Mucoromycota grupları ile temsil edilen Fungi, Rotifera grubu ile temsil edilen Metazoa ve Oomycota, Euglenozoa, Ciliophora grubu organizmalar olduğu görülmekte 2023 Şubat ayı GenBankası veritabanında bulunan türlerin genom analizleri ve protein verisi ile sınırlı olmak üzere maya ve bitkilerin LigII grubu ligaz enzimleri taşımadığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.1. PFAM veri tabanında “Katalitik Birim 2” taşıyan organizmaların genel gruplaşma haritası; yeşil ile gösterilmiş ökaryotik grupları temsil eden dilimde fungi, metazoa ve tek hücreli organizmalar dağılım göstermekte olup, dağılımın yaygın görüldüğü en baskın taksonun morla temsil edilen bakteri grupları olduğu görülmektedir.

PFAM ve filogenetik ağaç analizlerinin sunduğu en önemli verilerden biri ise Ligaz II üyeleri ile Lig E’ler arasında bulunan atasal ilişkidir. Williamson ve Leiros’un SSN dağılımıyla ortaya koyduğu üzere, LigE’ler diğer bakteri ligazlarından daha sonra, virüs ligazlarından köken alarak evrimleşmiştir ve tip 2 katalitik birim taşıyan ökaryotik ligazlar da (LigII’ler) LigE’lerle birlikte diğer tüm ligaz gruplarından ayrı olarak gruplanmıştır (Williamson ve Leiros, 2020) .

Yapısal homoloji gösteren LigII ve LigE’lerin görevsel özelliklerine bakıldığında, bakteriyel Lig E’lerin biyolojik görevinin hücre dışı ortamdan gelen genetik materyalin hücre içine alınmadan önce halkasal hale getirmek olabileceği ileri sürülmüştür (Williamson vd., 2016). Bu hipotetik görev, Lig E’lerin filogenetik ağaçta birlikte

yerleşim gösterdiği kDNA Ligaz'ların deneysel olarak tanımlanmış hücre içi görevine de benzemektedir. kDNA ligazlar, Protista'nın Euglenozoa alt şubesinin altında yer alan Kinetoplastida sınıfındaki organizmaların mitokondrilerinde görev alırlar. Bu hücrelerin mitokondri içinde farklılaşan genomuna "kinetoplast" adı verilir ve kinetoplastlar büyük halkasal genom DNA'sı ile iç içe geçmiş çok sayıda küçük halkasal yapıların özel bir genetik paketinden oluşur. Bu genom yapıları replike olduktan sonra ortaya çıkan linear genom kopyalarından büyük olanı kLig α ile, küçük olanı ise kLig β ile ligasyonu ile halkasal yapıya kavuşturulmaktadır (Downey vd., 2005; Sinha vd., 2004; Sinha vd., 2005). LigE ile kDNA ligazlarının filogenetik ilişkisi ile doğrusal DNA'yı halkasal DNA'ya dönüştürme görev benzerlikleri birlikte değerlendirildiğinde, TtLigII ligazının da doğrusal DNA'ları halkasal hale getirerek genom savunmasına katkıda bulunabileceği, bu tez çalışmasının ileri sürdüğü bir hipoteze dönüşmüştür. kDNA ligazların bakteriyel konakçılarda rekombinant üretimleri sırasında meydana gelen inklüzyon yapılar ise bu hipoteze indirekt olarak dayanak noktası oluşturmaktadır (Downey vd., 2005; Sinha vd., 2004). Inklüzyon yapılan üretilen rekombinant enzimin konakçı tarafından katlanamaması ya da toksik olması durumunda çözünürlüğünün konakçı tarafından düşürülerek paketlenmesiyle oluşur; DNA'yı metabolize eden enzimler de heterolog rekombinant üretim sistemleri açısından toksik olarak kabul edilmektedir (Slouka vd., 2019). Rekombinant T3, T4, T7, I/III/IV ve PBCV Ligazları gibi pek çok DNA Ligaz enzimi *E. coli*'de üretilmişken, yapısal olarak çok da farklı olmayan kDNA ligazları inklüzyon yapı oluşturmıştır (Bauer vd., 2017; Wilson vd., 2013). Fakat T3, T4, T7, I/III/IV ve PBCV Ligazları doğrusal DNA üzerinde çalışırken kDNA ligazlar halkasal DNA'da görev alırlar; bu açıdan bakıldığında *E. coli*'nin halkasal genomu kLig'ler açısından son derece uygun bir substrat olabilir. Aynı şekilde Lig E'nin *E. coli*'de rekombinant üretiminde toksisiteyi düşüren TEV proteaz takısının tercih edilmesi, LigE ile kDNA ligaz gruplarının sadece filogenetik olarak değil aynı zamanda görev-yapı itibarıyla da ilişkili olduğu bulgusunu güçlendirmiştir (Williamson vd., 2018; Williamson ve Pedersen, 2014). Bu literatür değerlendirmesini ise bu tez çalışması kapsamında Lig E ve kDNA Ligazlarla filogenetik ilişkisi belirlenen *T. thermophila* Ligaz II enziminin *E. coli*'de alternatif yaklaşımlı tüm rekombinant üretim denemeleri de enzimatik toksisitesi nedeniyle *E. coli*'nin ölümüyle sonulanmıştır. Sonuç olarak; *T. thermophila* Ligaz II enziminin de tıpkı lineer DNA'yı halkasal hale getiren ve mitokondride lokalize olan kLig'ler gibi, *T. thermophila*'nın IES eliminasyonunda oluşan lineer IES parçalarını

halkasal hale getirebileceği ve mitokondride görev alabileceği öngörüsü, TtLigII'nin yapışan uçlu DNA fragmentlerini birleştirebilmesi ve TtLigII-GFP füzyon proteinin somatik hücrelerin sil köklerindeki lokalizasyonu bulgularıyla da desteklenerek, ilave analizler için sağlam dayanaklar oluşturmuştur (Saveliev ve Cox, 2001; Lin vd., 2012).

4.2.5. Omurgasızlarda kaybedilen atasal LigIII yerine LigII görev yapıyor olabilir mi?

Ökaryotik ligazlardan Ligaz III'ler hakkında yaygın olarak bilinen literatür bilgisi sadece omurgalı ökaryotlarla kısıtlı olan bir dağılım gösterdikleri şeklindedir. Yutin ve Koonin (2009), Ligaz III ortologlarının bazı böcekler, amipler ve choanoflagellata gruplarında da bulunduğu değinerek, funguslardan itibaren tüm hayvanlar alemini kapsayan unikontların evrimi sırasında Ligaz IV'ün duplikasyonu ile meydana gelmiş ve funguslar ile diğer pek çok hayvan grubunda bağımsız olarak kaybedilmiş olabileceğinden bahsetmişlerdir (Yutin ve Koonin, 2009). Bu hipotez bu tez çalışmasının sunduğu verilerle birlikte değerlendirildiğine, genel ağaç topolojisi ve PFAM analizlerine göre Ligaz III'lerin genetik kaynağının LigIV'ler değil, ATP bağımlı DNA Ligazlar için atasal grup olan NAD bağımlı bir DNA Ligaz olabileceği de düşünülebilir. Çünkü NAD bağımlı ligazlar ile Ligaz III ve IV'lerin domain organizasyonları incelendiğinde NTaseD ve OBD dışındaki aksesuar yapılardan BRCT domaininin üçünde de var olduğu görülecektir. Ligaz IV iki BRCT domaini taşımakta olup, ilkinin PFAM kodu NAD bağımlı DNA Ligazlardaki BRCT ile aynıdır: PF00533.26. Ligaz IV'ün diğer BRCT domaini ise Ligaz III'lerdeki tek BRCT domaini ile aynı protein ailesine aittir: PF16589.5. BRCT domain homologileri LigIII'lerin LigIV'ler ile; LigIV'lerin de NAD bağımlı ligazlar ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Chen ve Yu bu domain ilişkisini deneysel olarak test etmiş ve insan Ligaz IV'ün kofaktör olarak NAD'ı kullanabildiğini; BRCT domainindeki NAD'ın interaksiyon gösterdiği aminoasitler inaktif edildiğinde ise ortamda NAD olsa bile enzimin enzimatik aktivite gösteremediğini bildirilmiştir (Chen ve Yu, 2019). Zhao ve arkadaşları ise Chen ve Yu'nun çalışmasında reaksiyon ortamında NAD'ı ATP'ye dönüştüren bir enzim kontaminasyonu bulunabileceğini ileri sürmelerine karşın mutant BRCT domaini taşıyan Ligaz IV'ün aktivite göstermemesine değinmemişlerdir (Chen ve Yu, 2019; Zhao vd., 2020). Sonuç olarak, Yutin ve Koonin'in biyoinformatik çalışmalara dayanan hipotezi, Chen ve Yu'nun komplementasyon deneylerinin sonuçları ve bu tezle ortaya koyulan filogenetik verilere göre LigIII'lerin evrimsel gelişim senaryosu iki basamakta gerçekleşmiş olabilir; 1) Ligaz IV'ler atasal

NAD bağımlı ligA'lerden türevlenmiş ve zaman içinde Lig A'ların pek çoğunda var olan zf-PARP ve zf-CCHH motiflerini kaybetmiştir ve 2) Ligaz III'lerin Ligaz IV'lerden evrimleşmiştir (Yutin ve Koonin, 2009; Chen and Yu, 2019).

Yutin ve Koonin ile Zhao ve ark.'daşlarının hipotezleri tek hücreli, fungus ve bitki ökaryotik türlerinde LigIII'lerin yokluğunun veya kaybının enzimatik olarak nasıl telafi edildiğini açıklamamaktadır. Bunu açıklamak için Brunet ve arkadaşları'nın atasal LigIII'ün bulunmasına yönelik yürüttükleri çalışmalarında Δ LigIII fare embriyolarında PBCV ligaz ya da NAD bağımlı *E. coli* Lig A enzimi varlığında herhangi bir mitokondriyal anomali görülmediğini bildirmiştir (Brunet vd., 2011). Simsek ve Jasin ise daha geniş kapsamlı araştırmalarında Ligaz III'ün en yaygın temsil edildiği atasal grubun metazoa olduğunu tespit etmiş ve dolayısıyla Ligaz III'lerin atadan var olan bir karakterde olduğunu, canlılar dünyasında metazoa grubuna kadar genomda korunduğunu, bu aşamadan sonra omurgalılarda korunmaya devam edilirken, omurgasızlarda grupsal bloklar halinde kaybedildiğini ya da farklılaştığını ileri sürmüşler; bu savlarını da Brunet ve arkadaşlarının komplementasyon çalışmalarıyla desteklemişlerdir (Brunet vd., 2011; Simsek ve Jasin, 2011). Arakawa ve Iliakis ise bahsi geçen komplementasyon çalışmalarının başarısını, kromatin yapısıyla paketlenmeyen, replikasyon ve tamiri PCNA bağımlı olmayan mitokondri DNA'sının her ligaz enzimi için uygun bir substrat olabileceği ile açıklamıştır (Arakawa ve Iliakis, 2015).

Ligaz III'lerin evrimi hakkındaki sınırlı sayıdaki açıklamalar birlikte değerlendirildiğinde; ne köken olarak LigIV'lerin duplikasyonunu öne süren Yutin ve Koonin, ne de atasal LigIII'lerin ikincil olarak kaybedildiği hipotezini öneren Simsek ve Jasin, yaşamsal olarak elzem olan LigIII taşımayan omurgasızlardaki mitokondriyal DNA'nın replikasyon ve tamiri hakkında kapsayıcı bilgi verebilmiştir (Simsek ve Jasin, 2011, Yutin ve Koonin, 2009). Bu tez verileri ise "Ökaryotik Ligaz II Enzim Alt Ailesini" Ligaz III bulundurmayan tek hücreli, fungus ve pek çok metazoa grubu omurgasızların mitokondriyal DNA'sının tamirinde görev alması muhtemel kapsayıcı ve ikna edici bir çözüm olarak sunmaktadır.

LigIII'lerin evrimsel sınırı bu veriler temelinde tekrar özetlendiğinde, LigIII'ler Yutin ve Koonin'e göre en erken bazı Choanoflagellata üyelerinde görülürken, funguslarda bulunmamaktadır; Simsek ve Jasin ise sınırı metazoa olarak çizmiştir (Simsek and Jasin, 2011; Yutin and Koonin, 2009). LigII'lerin evrimsel üst sınırı ise

Williamson ve Leiros'a göre (LigE'lerle gruplaşan ökaryotik gruplar olarak zikredilmiştir) funguslardır (Williamson vd., 2016). Bu çalışma tüm bu bilgileri daha kapsamlı ele alarak birleştirmiş ve LigII'lerin bakterilerden bazı metazoanlara kadar dağılım gösteriyor olduğunu netleştirmiştir. Bu gruptaki kDNA Ligaz'ların mtDNA'nın replikasyon ve tamirinde görev aldığı bildirilmiş olması ile değerlendirildiğinde varılan sonuç, Ligaz III genlerinin Simsek ve Jasin'in öne sürdüğü gibi protista ve fungusların ökaryot atasında var olduğunu ve bu tezle ortaya koyulduğu üzere horizontal gen transferi ile sonradan kazanılan Ligaz II ile görevsel rekabeti kaybederek zamanla bu grup canlıların erken ataların genomlarından silindiğini destekler mahiyettedir (Simsek ve Jasin, 2011).

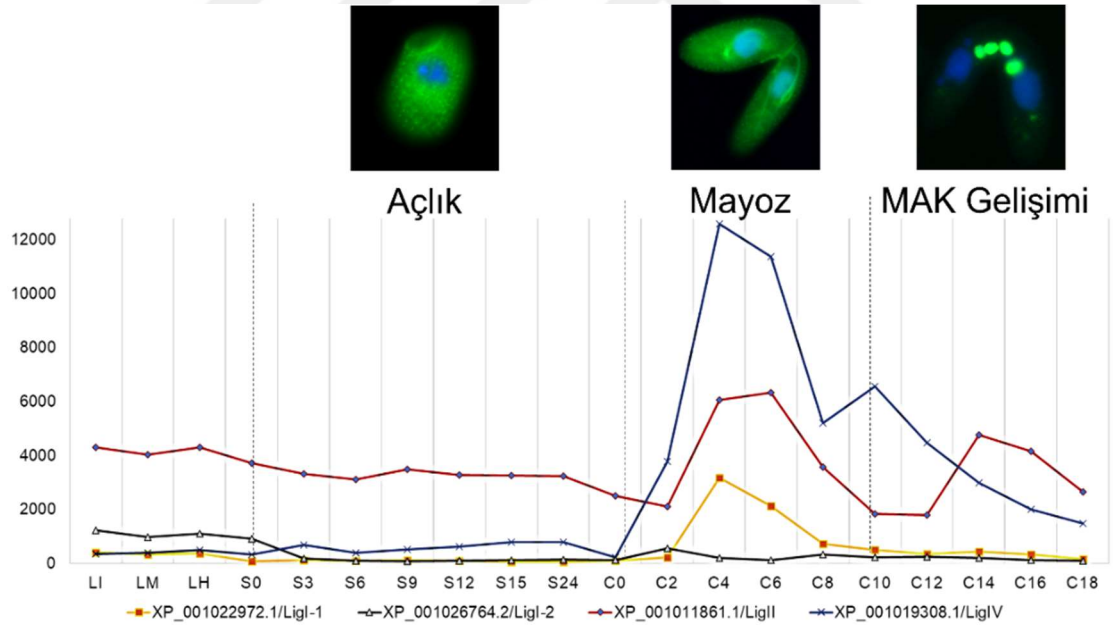
4.2.6. TtLigII'nin görev yeri mitokondri ile çekirdektir

Bir enzimin hücre içi görev yeri ile yaşamsal olaylarda hangi zamanda diliminde görev yaptığının belirlenmesi o enzimin biyolojik görevinin anlaşılması için elzemdir. Bunun için en uygun metot doğal promotor kontrolündeki genin çevresel şartlara cevabının mikroskopik ve moleküler tanı metotları ile takip edilmesidir. Ayrıca mRNA ifade analizleri de bu çalışma bulgularını destekleyici ikincil verilerin toplanmasında kullanılmaktadır.

Şekil 4.2.'de *T. thermophila*'ya ait DNA Ligaz enzimlerinin vejetatif evre, açlık koşulları ile konjugatif evredeki mRNA ekspresyon değişimleri ve TtLigII'nin bu evrelerdeki hücre içi lokalizasyon görüntüleri bir arada gösterilmiştir. Grafikte bölünen ve bölünmeyen (aç) vejetatif hücrelerde TtLigII mRNA seviyesinin diğer 3 ligaz mRNA'sına göre oldukça yüksek olduğu ve bu evrede TtLigII-sfGFP'nin aç hücrelerin sil hatlarında lokalize olduğu görülmektedir. *T. thermophila*'nın sil hatlarında, tubulin gibi sillerin yapısını oluşturan yapısal proteinler, sinyal iletiminde görev alan kinazlar ya da sil hatlarında lokalize olduğu bilinen mitokondrilerde görev alan enzimler bulunmaktadır (Jiang vd., 2019; Włoga vd., 2008). Bu çalışmada ligasyon aktivitesi ile DNA ligaz olduğu belirlenen ve dolayısı ile yapısal ya da kinaz grubu bir protein olmayan TtLigII'nin, sil hatlarındaki lokalizasyonu ancak mitokondride lokalize olması ile açıklanabilir. Açlık koşullarındaki mRNA ekspresyon seviyesi ve hücre içi lokalizasyon yeri birlikte ele alındığında, bu evrede tamir açısından birincil görevli enzimin TtLigIIp olması öngörülmektedir. Literatüre göre bölünmeyen memeli hücrelerinde NER ve BER tamirinin son aşaması olan ligasyonda birincil görev Ligaz III enzimlerindir (Iyama ve

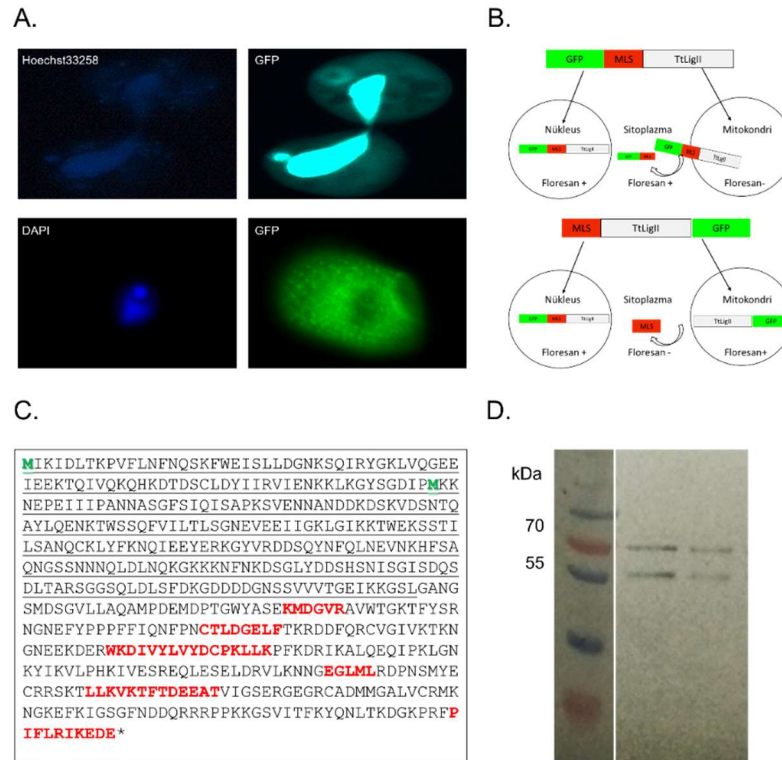
Wilson, 2013). Buradan hareketle, somatik ve açlık evresindeki *T. thermophila*'nın DNA tamir olaylarında TtLigII'nin asli rolünün Ligaz III'lerle görevsel benzerlik gösterdiği düşünülebilir.

Ligaz III'lerin 4 izoformunun bulunduğu giriş bölümünde değinilmişti. Özetle; Ligaz III enziminin üretilmesi esnasında translasyon makinasının başlangıç kodon tercihi Ligaz III'ün çekirdekte ya da mitokondride lokalize olmasında belirleyici olmaktadır; buna göre aynı mRNA dizisinden mitokondriyal ve/veya nüklear Ligaz III'ler üretilmektedir (Ellenberger ve Tomkinson, 2008). Bitki Ligaz I'leri ile mayalardaki Ligaz I ortoloğu cdc9 da benzer şekilde translasyon başlangıç kodonuna göre çekirdekte ya da mitokondride lokalize olmaktadır (Sunderland vd., 2006; Timson vd., 2000; Willer vd., 1999). Konjugasyonun TtLigII'nin mayoz evresinde MİK'te, MAK gelişimi evresindeyse gelişmekte olan MAK'larda lokalize olduğu görülecektir (Şekil 4.2). Bu veriler TtLigII'nin de omurgalı Ligaz III'leri ya da bitki ve maya Ligaz I'leri gibi çekirdek ve mitokondride lokalize olan iki izoformu bulunduğu sonucuna işaret etmektedir.



Şekil 4.2. *T. thermophila* DNA Ligaz enzimlerinin konjugasyon süresince ekspresyon seviyelerinin hücresel olaylarla ilişkisi.

TtLigII'nin iki izoformu olduğu ihtimalini güçlendiren bir diğer veri ise N- ve C-terminal GFP takılı TtLigII'nin overekspres sistemlerdeki lokalizasyonunun mikroskopik görüntülerinden gelmektedir. Şekil 4.3.A'da üstte N-terminal sfGFP takılı LigII'nin nükleusta, altta ise C-terminal sfGFP takılı TtLigII enziminin ise sil hatlarındaki granüler dağılımı görülmektedir. Omurgalı Ligaz III'lerin mitokondriyal izoformlarının üretilmesi ensasında, ilk BAŞLA kodonundan başlayan translasyonla üretilen proteinde mitokondriyal lokalizasyon sinyali "MLS" korunduğu için enzim mitokondriye lokalize olmakta ve enzim mitokondriye ulaştıktan sonra MLS kesilerek uzaklaştırılmaktadır (Arakawa ve Iliakis, 2015). Böyle bir durum TtLigII için de söz konusu ise N-terminal takılı enzim mitokondriye lokalize olsa bile, MLS'nin uzaklaştırılması sırasında N-terminalindeki GFP takısı da uzaklaştırılacağından mitokondriyal bir sinyal elde etmek mümkün olmayacaktır. Diğer yandan takı C-terminale alındığında floresan ışına somatik hücrenin MAK ya da MİK'inden değil, mitokondri olabileceği düşünülen yapılardan gelmektedir (Şekil 4.3.B).



Şekil 4.3. TtLigII enziminin vejetatif hücrelerdeki lokalizasyon paterni. A. N- ve C terminalinde sfGFP takısı bulunan overekspres TtLigII enziminin hücre içi lokalizasyonu. B. TtLigII'nin MLS taşıyor olma ihtimalinin mikroskop görüntüleri temel alınarak şematik açıklanması. C. TtLigII enziminin aminoasit dizisi üzerinde 6 korunmuş Ligaz motif (kırmızı), N-terminal domain (altı çizili) ve olası başlangıç kodonları (koyu renkli ve numaralandırılmış) gösterilmiştir. D. Safleştirilmiş TtLigII-c10xHis enziminin Anti-His antikoru ile Western Blot analizi.

TtLigII mRNA'sının translasyonunda BAŞLA kodonu tercihine bağı olarak iki izoformu üretiliyorsa; ilk kodondan başlayan translasyon ile 66 kDa büyüklüğünde ve ikinci kodondan başlayan translasyon ile 53 kDa büyüklüğünde bir ürün oluşturması beklenmelidir (Şekil 4.3.C). TtLigII-10xHis enziminin üretilmesi ve saflaştırılması sonrası yapılan Western Blot çalışmalarında her iki büyüklükte de ürün olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.D).

Literatürden yola çıkılarak sunulan bu veriler TtLigII'nin mitokondri ve çekirdekte lokalize olan iki izoformu olabileceği hipoteziyle ilgili önemli deliller sunmakla birlikte, somatik ve açlık evresindeki hücrelerde TtLigII'nin lokalizasyonunun mitkotracker varlığında analiz edilmesi bu hipotezin teyit edilmesini sağlayacaktır.

4.2.7. TtLigII Konjugasyonda Tek ve Çift Zincir Kırıklarını Tamir Edebilir

T. thermophila ligazlarının konjugasyon süresince mRNA grafiği ve TtLigII'nin lokalizasyon paterni incelendiğinde (Şekil 4.2) konjugasyonun 4. saatinde TtLig I, II ve IV'ün aynı anda pik yaptığı görülmektedir; bu safhada uzayan MİK'lerde homolog rekombinasyon ile parça değişimi olduğundan Ligaz IV'ün ekspresyonunun burada artış göstermesi beklenen bir durumdur. Hemen ardından gerçekleşen Mayoz öncesinde ise genomik içerik DNA replikasyonu ile iki katına çıkmaktadır; DNA replikasyonunda Okazaki parçalarının ligaz enzimi ile birleştirilmesi için Ligaz I'in artışı da beklenen bir durumdur. Konjugasyonun bu aşamasında mRNA seviyesinde artış gösteren Ligaz II'nin protein seviyesinde MİK'te lokalize olması, görev yerlerinden birinin burası olduğu anlamına gelebilir. TtLigII'nin asli görevinin yukarıda hipotezlendiği gibi NER ve BER tamiri olduğu düşünüldüğünden, MİK'te lokalizasyonun anlamı gelecek nesil hücrelerine aktarılacak genetik materyalin hasarsız olması seferberliğine katkıda bulunduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

T. thermophila konjugasyonunda Ligaz IV ve Ligaz II'nin mRNA ifadeleri sırasıyla 10. ve 14. saatlerde iki kez daha artmaktadır. Bu yeni makroçekirdekte programlı DNA düzenlenmesinin gerçekleştiği zaman aralığıdır. Programlı DNA düzenlenmesi üç olayı kapsar: 1. genomdaki 200 CBS bölgesinden kromozomların kırılmasıyla mini kromozomların oluşması ve uçlarına telomer eklenmesi, 2. Minikromozomların endoreplikasyonla sayılarının artması, 3. IES dizilerinin eliminasyonu ve bunlara ek olarak eşey tipinin belirlenmesi (Yao vd., 2015).

Konjugasyonun 10. saatinde yeni MAK genomun işlenmesi esnasında IES eliminasyonu gerçekleşiyor olsa da hazırlıkların Mayoz öncesinde başladığı bilinmektedir: Noto ve Mochizuki'nin ortaya koyduğu mekanistiğe göre Mayoz öncesi MİK genomundaki IES dizilerinden üretilen dsRNA'lar parental/eski MAK'a göç ederler ve Dcl1 tarafından burada tek zincirli hale getirilirler (small RNA veya sRNA). Eski MAK genomunda homoloğu bulunan sRNA'lar parçalanarak yok edilirken, diğer sRNA'lar oluşan yeni MAK'a göç ederler. Kromatin faktörleri ile bir araya gelerek scnRNA adını alan bu yapılar yeni MAK'ı tarayarak homolog hedef IES dizilerinin kesilip çıkarılmasını sağlar ve çıkartılan bu doğrusal IES dizileri halkasal hale getirilirken, IES'in çıkmasıyla genomda meydana gelen serbest uçlar da uç uca birleştirilir (Mochizuki, 2012; Noto ve Mochizuki, 2017; Noto ve Mochizuki, 2018). Bu IES eliminasyon sisteminin korunmasına getirilen temel açıklama, organizmanın bu mekanizmayla arşivlediği IES dizileri sayesinde kendi genomunu transpozonlardan koruyor olabileceği yönündedir (Allen ve Nowacki, 2020; Cheng vd., 2016; Feng vd., 2017; Vogt ve Mochizuki, 2014).

IES eliminasyon mekanistiği pek çok açıdan deşifre edilebilmiş olsa da Tetrahymena açısından iki bilinmezlik barındırmaktadır: Birincisi, halkasal hale getirilen IES dizilerinin Paramecium ve Oxytricha'da ikincil scnRNA üretiminde rol aldığı bildirilmiştir ancak Tetrahymena'da halkasal IES elementlerinin varlığı kesin bilinmesine karşın görevleri belirlenememiştir (Rzeszutek vd., 2020). İkinci husus ise bu tez çalışmanın konusu ile ilgilidir: Paramecium genomunda IES çıkartılması sonrasında genomda kalan serbest dsDNA uçlarının Ligaz IV ile birleştirildiği raporlanmasına karşın Tetrahymena'da hangi DNA ligazın bu görevi gerçekleştirdiği henüz bilinmemektedir (Allen ve Nowacki, 2020; Hamilton vd., 2016; Kapusta vd., 2011).

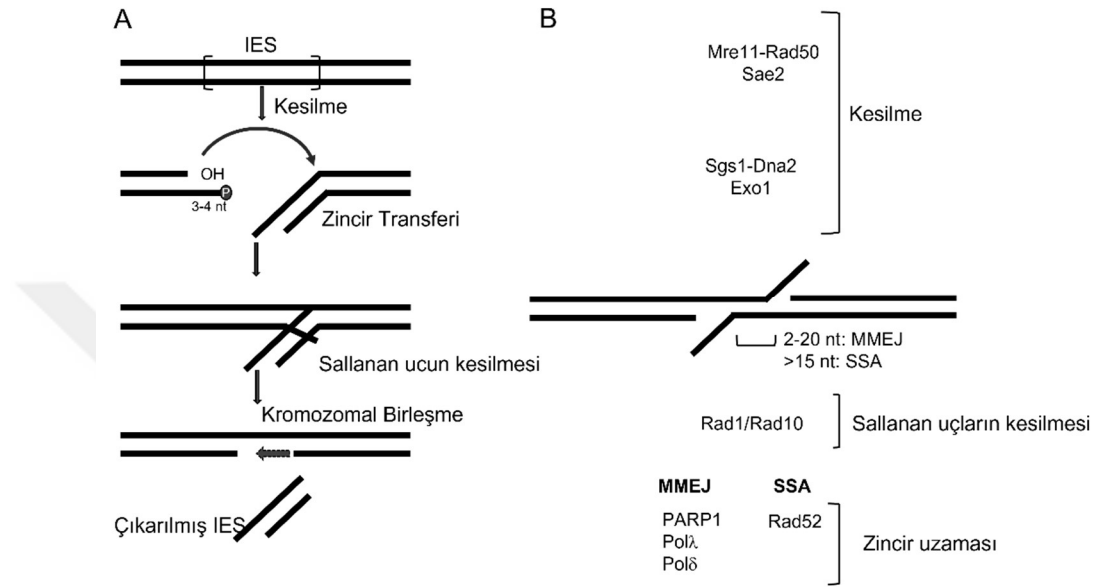
Lin ve arkadaşları *T. thermophila* IES dizilerinin çıkartılmasında Ku proteinlerinin rolünü araştırdıkları çalışmalarında, homokaryon Δ Ku80 hücrelerinin konjugasyonunun "iki MAK iki MİK" aşamasında durduğunu ve minikromozomlara telomer ekleme faaliyetinin gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Bu evredeki hücrelerle yürütülen IES çalışmalarında doğrusal IES'e rastlamamış olmalarını IES'lerin kesilmemiş olmasıyla açıklamışlar fakat gelişimleri bu safhada duran hücrelerin 22. saat itibarıyla halkasal IES'lere ait sinyal vermeye başladıklarını bildirmişlerdir. Bu veriler Ku80'lerin heterokromatin oluşumu için elzem olduğu, IES'ler çıkarıldıktan sonra serbest kalan

genom uçlarının Ku80'lerle birlikte Ligaz IV bağımlı olarak birleştirildiği şeklinde yorumlanmıştır (Lin vd., 2012). Her ne kadar *Paramecium*'da IES eliminasyonu sonrası genom DNA'sının Ku80-Ligaz IV kompleksi ile birleştirildiği deneysel olarak raporlanmış olsa da Lin ve arkadaşları *Tetrahymena*'da Δ Ku80 hücrelerinde 22 saat sonra gecikmeli de olsa halkasal IES gördüklerini bildirmişlerdir (Kapusta vd., 2011; Rzeszutek vd., 2020). Lin ve Yao, Δ Ku80 hücre hatlarını eşey tipi belirlenmesinde tekrar kullandığı çalışmada ise tüm eşey genlerinden oluşan genetik setten bir eşey tipinin seçilerek diğerlerinin elimine edildiği “yeniden düzenlenme” esnasında Ku80'nin ve dolayısıyla TtLigIV'ün elzem olduğunu göstermişlerdir (Lin ve Yao, 2020). Bu çalışmalar Ku80'in eşey tipinin belirlenmesi için elzem olduğunu; IES eliminasyonunda ise NHEJ mekanizmasının bloklandığı şartlarda Ku80 bağımsız, alternatif bir mekanizmanın aktive olabileceği ya da LigIV dışında başka bir DNA ligazın Ku80 olmaksızın IES eliminasyonunda görev alabileceği hipotezini ortaya koymaktadır.

IES'lerin eliminasyonu safhasında oluşan DNA uçlarını inceleyen Saveliev ve Cox, IES'in iki ucunun genomdan eş zamanlı olarak kesilmediğini belirlemişlerdir (Saveliev ve Cox, 2001). Önerdikleri IES eliminasyon mekanizmasına göre IES'in uçlardan biri kesildikten sonra genomda oluşan serbest DNA uçlarındaki 3'OH içeren adenin nükleotidi, nükleofilik bir atak ile IES-genom sınırına saldırarak IES'in bu zincirini serbest bırakmaktadır. Böylece çift zincirli DNA genomunun bir zinciri tamir olurken karşı zincir Saveliev ve Cox'un açıklayamadığı bir şekilde kesilmekte, IES genomdan uzaklaşırken geride bıraktığı genomda bütün, diğeri kesikli iki zincir kalmaktadır. Saveliyev ve Cox genom DNA'sının bu aşamadan sonra hangi enzimlerle ve nasıl tamir edildiği hakkında bir hipotez sunmamışlardır (Saveliev ve Cox, 2001).

Saveliyev ve Cox'ın çizdikleri mekanizmada nükleofilik atak sonrası meydana gelen DNA yapısı; MMEJ (Microhomology-mediated end joining) ya da SSA (single strand annealing) mekanizmaları için uygun bir substrata benzemektedir (Verma ve Greenberg, 2016). MMEJ ve SSA, homolog olmayan uçların Ku80-Ligaz IV'e bağlı olmaksızın alternatif bir yolla tamirini mümkün kılmaktadır (Decottignies, 2013). Tamir sırasında genomdan tıpkı Saveliev ve Cox'un çizdiği mekanizmaya benzer bir yolla bir parça çıkartılır ve genomun serbest ucunun Ligaz I ya da Ligaz III ile birleştirilmesiyle tamir tamamlanır (Şekil 4.4). MMEJ'nin, gen repertuvarında Ligaz IV bulunmayan *Trypanosoma brucei*'de NHEJ tamirine alternatif yolak olabileceği ve daha

da önemlisi bu yolda rol alabilecek ligaz enzim adayının kDNA Ligaz grubundan bir enzim olabileceği önceki çalışmalarda önerilmiştir (Burton vd., 2007). Tetrahymena’da IES’lerin çıkarılması sonrası genomun birleştirilmesi sırasında, TtLigIV bağımlı mekanizmanın çalışmadığı şartlarda devreye girebilecek alternatif bir mekanizmada TtLigII’nin rol oynayabileceği hipotezi bu çalışma ile ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.4. IES eliminasyonunda oluşan DNA substratları ile Ku80/LigazIV bağımsız mekanizmalarının karşılaştırılması. A. Saveliev ve Cox’un konjugasyon esnasında Ku80/LigazIV mekanizması ile çizdikleri IES eliminasyonu senaryosu, B. MMEJ ve SSA’nın tercih ettiği DNA substratı ile bu reaksiyon sırasında işlev gören enzim ve faktörler.

Saveliev ve Cox’un konjugasyon esnasında meydana geldiğini belirledikleri DNA substratlarının analizi ile çizdikleri IES eliminasyonu senaryosu Şekil 4.4-A’da görüldüğü gibidir. Şekil 4.4-B’de ise MMEJ ve SSA’nın tercih ettiği DNA substratı ile bu reaksiyon sırasında işlev gören enzim ve faktörler görülmektedir (Sinha vd., 2016). Bu süreçte DNA’nın kesilmesi sonrasında diğer organizmalarda görev alan MMEJ enzimi DNA polimeraz θ ve SSA faktörü Rad50 Tetrahymena’da bulunmamakla birlikte, listede görülen diğer faktör ve enzimler konjugasyon süresince LigIV ve LigII’nin mRNA patternine benzer şekilde aktiftir. Yukarıda sunulan bilgiler birlikte değerlendirildiğinde, IES eliminasyonunda serbest genom uçlarının birleştirilmesinde hangi ligaz enziminin görev aldığı henüz bilinmemekle birlikte, çıkartılan doğrusal IES elementini halkasal hale getiren enzimin Ligaz IV olmadığı söylenebilir (Lin ve Yao, 2020). Filogenetik ağaçta TtLigII’nin ilişkili olduğu LigE’ler ve kDNA’ların görevleri ile TtLigII mRNA ekspresyonunun artış yaptığı ikinci safhada meydana gelen IES eliminasyonu (14. saat)

birlikte değerlendirildiğinde; TtLigII'nin bu doğrusal IES parçalarını halkasal hale getirebilecek en olası aday olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

Konjugasyon süresince TtLigII'nin lokalize olduğu hücre içi konumlar incelendiğinde; TtLigII'nin profaz I evresinde mayotik MİK'te ve mayoz sonrası pronükleer seçim esnasında haploit mayotik üründe lokalize olduğu bulunmuştur. Bu çekirdeklerde mayoz esnasında ve sonrasında yoğun şekilde çift zincir kırılması ve akabinde tamir olaylarının gerçekleştiği bilinmektedir. Örneğin bir serin tireonin protein kinaz olan DNA-PKcs, NHEJ yolağında çift zincir kırıklarını birleştirir. Tetrahymena DNA-PKcs homologunun da mayoz esnasında haploit MİK'lere lokalize olduğu bilinmektedir. Bir başka DNA tamir enzimi olan RAD51 de Tetrahymena mayozunda yeni çekirdeği oluşturacak olan haploit çekirdekte lokalize olmaktadır. DNA tamirinin işaretçisi olan histon H2AX fosforilasyonunun Tetrahymena çekirdek gelişimi esnasında mayotik çekirdeklerde ve sonrasında yeni çekirdekte lokalize olduğu rapor edilmiştir (Akematsu vd., 2017). DNA tamirinde görev aldığı bilinen bu üç proteinin lokalizasyon örüntüleri ile TtLigII'nin lokalizasyon davranışının neredeyse birebir aynı olması, TtLigII'nin de Tetrahymena mayozu esnasında meydana gelen DNA kırıklarının tamirinde görev alabileceğini ima eder.

Konjugasyonun başından itibaren MİK ve eski MAK ile yeni MAK'ta lokalize olan TtLigII'nin yeni MAK'ta endoreplikasyonda meydana gelen kesikli zincirin birleştirilmesinde de rol alabileceği ayrı bir ihtimaldir zira bu safhada görev alması beklenen Ligaz I'in mRNA ifadesi çok düşük kalmaktadır.

4.3. Öneriler

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalar ile TtLigII enziminin karakterizasyonu hakkında önemli bilgiler elde edilmiş, bu bilgiler ışığında yeni ve önemli hipotezler sunulmuştur. Bu tezin ortaya koyduğu önemli hipotezlerin sınanması, aktivite çalışmaları ile substrat çeşitliliği hakkındaki bilgilerin derinleştirilmesi ve ilgili genin knock-out edildiği hücrelerin karakterizasyonu ile hücre içinde katıldığı biyolojik mekanizmaların aydınlığa kavuşturulması sonucunda sağlanabilecektir. Böylece *T. thermophila*'da TtLigII hakkında daha kapsamlı bilgiler literatüre kazandırılırken, LigII alt ailesine ait bir enzimin de tanımlanması sağlanmış olacaktır.

TtLigII ve TtLigIV açısından tek ve çift knockout/knockdown hatların geliştirilmesi ile konjugasyon esnasındaki mutant fenotipler incelenerek, bu tezin Tartışma bölümünde sunulan MAK gelişiminde genom ve IES'lerin birleştirilmesinde TtLigII'nin görev alabileceği hipotezinin sınanması kıymetli verilerle sonuçlanacaktır.

LigII grubu enzimlerin Ligaz III'lerin omurgasızlardaki muadili olup olmadığı, TtLigII lokalizasyon ve TtLigII knock-out hatlarının NER ve BER mekanizmalarının aktive edildiği şartlarda kullanıldığı analizler yapılmasıyla sınanabilir.



KAYNAKÇA

- Abmayr, S. M., Yao, T., Parmely, T., & Workman, J. L. (2006). Preparation of Nuclear and Cytoplasmic Extracts from Mammalian Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, C. 75. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1201s75>
- Allen, S. E., & Nowacki, M. (2020, July 10). Roles of Noncoding RNAs in Ciliate Genome Architecture. *Journal of Molecular Biology*, C. 432, ss. 4186-4198. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.12.042>
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sønderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., ... Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnology*, 37(4), 420-423. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0036-z>
- Arakawa, H., & Iliakis, G. (2015, June 23). Alternative okazaki fragment ligation pathway by dna ligase III. *Genes*, C. 6, ss. 385-398. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/genes6020385>
- Aslan E, Arslanyolu M. Identification of neutral and acidic deoxyribonuclease activities in *Tetrahymena thermophila* life stages. *Eur J Protistol*. 2015 Apr;51(2):173-85. doi: 10.1016/j.ejop.2015.02.004. Epub 2015 Feb 20. PMID: 25855143.
- Bauer, R. J., Zhelkovsky, A., Bilotti, K., Crowell, L. E., Evans, T. C., McReynolds, L. A., & Lohman, G. J. S. (2017). Comparative analysis of the end-joining activity of several DNA ligases. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190062>
- Bentley, D. J., Harrison, C., Ketchen, A.-M., Redhead, N. J., Samuel, K., Waterfall, M., ... Melton, D. W. (2002). DNA ligase I null mouse cells show normal DNA repair activity but altered DNA replication and reduced genome stability. *Journal of Cell Science*, 115, 1551-1561. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.7.1551>
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999. PMID: 942051.
- Cassidy-Hanley, D. M. (2012). *Tetrahymena in the Laboratory: Strain Resources, Methods for Culture, Maintenance, and Storage*. İçinde *Methods in Cell Biology* (C. 109, ss. 237-276). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385967-9.00008-6>
- Chen, J., Tomkinson, A. E., Ramos, W., Mackey, Z. B., Danehower, S., Walter, C. A., ... Husain, I. (1995). Mammalian DNA Ligase III: Molecular Cloning, Chromosomal Localization, and Expression in Spermatocytes Undergoing Meiotic Recombination. İçinde *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (C. 15). Geliş tarihi gönderen <https://journals.asm.org/journal/mcb>
- Cherepanov, A. v., & de Vries, S. (2003). Kinetics and thermodynamics of nick sealing by T4 DNA ligase. *European Journal of Biochemistry*, 270(21), 4315-4325. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03824.x>

- Chevallet, M., Luche, S., & Rabilloud, T. (2006). Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature Protocols*, 1(4), 1852-1858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.288>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., ... Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic acids research*, 36(Web Server issue), 465-469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Downey, N., Hines, J. C., Sinha, K. M., Ray, D. S., & Ell, E. U. C. (2005). *Mitochondrial DNA Ligases of Trypanosoma brucei*. 4(4), 765-774. <https://doi.org/10.1128/EC.4.4.765>
- Ellenberger, T., & Tomkinson, A. E. (2008). Eukaryotic DNA ligases: Structural and functional insights. *Annual Review of Biochemistry*, C. 77, ss. 313-338. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061306.123941>
- Goosen, N. (2013). Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 341-344. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00491-6>
- Gratias, A., & Bétermier, M. (2003). Processing of Double-Strand Breaks Is Involved in the Precise Excision of Paramecium Internal Eliminated Sequences . *Molecular and Cellular Biology*, 23(20), 7152-7162. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.20.7152-7162.2003>
- Hamilton, E. P., Kapusta, A., Huvos, P. E., Bidwell, S. L., Zafar, N., Tang, H., ... Coyne, R. S. (2016). Structure of the germline genome of *Tetrahymena thermophila* and relationship to the massively rearranged somatic genome. *eLife*, 5(NOVEMBER2016). <https://doi.org/10.7554/eLife.19090.001>
- Han, L., Masani, S., Hsieh, C. lin, & Yu, K. (2014). DNA Ligase I Is Not Essential for Mammalian Cell Viability. *Cell Reports*, 7(2), 316-320. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.024>
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). *DNA Damage, Aging, and Cancer*. 1475-1485.
- Hu, J., Adar, S., Selby, C. P., Lieb, J. D., & Sancar, A. (2015). Genome-wide analysis of human global and transcription-coupled excision repair of UV damage at single-nucleotide resolution. *Genes and Development*, 29(9), 948-960. <https://doi.org/10.1101/gad.261271.115>
- Iyama, T., & Wilson, D. M. (2013). DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair*, 12(8), 620-636. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2013.04.015>
- Izumi, T., & Mellon, I. (2016). Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair. İçinde *Genome Stability: From Virus to Human Application* (ss. 275-302). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803309-8.00017-3>
- Jiang, Y. Y., Maier, W., Baumeister, R., Minevich, G., Joachimiak, E., Wloga, D., ... Gaertig, J. (2019). LF4/MOK and a CDK-related kinase regulate the number and

- length of cilia in *Tetrahymena*. *PLoS Genetics*, 15(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008099>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583-589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kapusta, A., Matsuda, A., Marmignon, A., Ku, M., Silve, A., Meyer, E., ... Bétermier, M. (2011). Highly precise and developmentally programmed genome assembly in paramecium requires ligase IV-dependent end joining. *PLoS Genetics*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002049>
- Kataoka, K., & Mochizuki, K. (2011). CHAPTER 10 PROGRAMMED DNA ELIMINATION IN TETRAHYMENA: A Small RNA-Mediated Genome Surveillance Mechanism. *RNA Infrastructure and Networks. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 722, 156-173. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0332-6_10
- Kataoka, K., & Mochizuki, K. (2015). Phosphorylation of an HP1-like Protein Regulates Heterochromatin Body Assembly for DNA Elimination. *Developmental Cell*, 35(6), 775-788. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.11.017>
- Kodama, K.-I., Barnes, D. E., & Lindahl, T. (1991). In vitro mutagenesis and functional expression in *Escherichia coli* of a cDNA encoding the catalytic domain of human DNA ligase I. İçinde *Nucleic Acids Research* (C. 19). Geliş tarihi gönderen <https://academic.oup.com/nar/article/19/22/6093/1015437>
- Krokan, H. E., & Bjoras, M. (2013). Chapter 06: Base Excision Repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 5(4).
- Kumamoto, S., Nishiyama, A., Chiba, Y., Miyashita, R., Konishi, C., Azuma, Y., & Nakanishi, M. (2021). HPF1-dependent PARP activation promotes LIG3-XRCC1-mediated backup pathway of Okazaki fragment ligation. *Nucleic Acids Research*, 49(9), 5003-5016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab269>
- Küçükoğlu, N. (2010). *Tetrahymena thermophila Ligaz Enzim Ailesi Üyelerinden Birinin Moleküler ve Biyoteknolojik Karakterizasyonu*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive tree of life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lin, C. Y. G., Lin, I. T., & Yao, M. C. (2016). Programmed Minichromosome Elimination as a Mechanism for Somatic Genome Reduction in *Tetrahymena thermophila*. *PLoS Genetics*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006403>
- Lin, I., Chao, J., & Yao, M. (2012). *An essential role for the DNA breakage-repair protein Ku80 in programmed DNA rearrangements in Tetrahymena thermophila*. 23, 2213-2225. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0952>

- Lin, I. T., & Yao, M. C. (2020). Selfing mutants link Ku proteins to mating type determination in *Tetrahymena*. *PLoS Biology*, 18(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.3000756>
- Loidl, J., & Mochizuki, K. (2009). *Tetrahymena* Meiotic Nuclear Reorganization Is Induced by a Checkpoint Kinase-dependent Response to DNA Damage. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 2428-2437. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Mackey, Z. B., Ramos, W., Levin, D. S., Christi, A. W., McCarrey, J. R., & Tomkinson, A. E. (1997). An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Molecular and Cellular Biology*, 17(2), 989-999. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/MCB.17.2.989>
- Malone, C. D., Anderson, A. M., Motl, J. A., Rexer, C. H., & Chalker, D. L. (2005). Germ Line Transcripts Are Processed by a Dicer-Like Protein That Is Essential for Developmentally Programmed Genome Rearrangements of *Tetrahymena thermophila*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(20), 9151-9164. <https://doi.org/10.1128/mcb.25.20.9151-9164.2005>
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679-682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Noto, T., & Mochizuki, K. (2017). Whats, hows and whys of programmed DNA elimination in *Tetrahymena*. *Open Biology*, 7(10). <https://doi.org/10.1098/rsob.170172>
- Pannunzio, N. R., Watanabe, G., & Lieber, M. R. (2018). Nonhomologous DNA end-joining for repair of DNA double-strand breaks. *Journal of Biological Chemistry*, C. 293, ss. 10512-10523. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM117.000374>
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., ... Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70-82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>
- Rossi, R., Montecucco, A., Ciarrocchi, G., & Biamonti, G. (1997). *Functional characterization of the T4 DNA ligase: a new insight into the mechanism of action* (C. 25). Oxford University Press. Geliş tarihi gönderen Oxford University Press website: <https://academic.oup.com/nar/article-abstract/25/11/2106/1094112>
- Rzeszutek, I., Maurer-Alcalá, X. X., & Nowacki, M. (2020). Programmed genome rearrangements in ciliates. *Cellular and Molecular Life Sciences*, C. 77, ss. 4615-4629. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03555-2>

- Sallmyr, A., Rashid, I., Bhandari, S. K., Naila, T., & Tomkinson, A. E. (2020). Human DNA ligases in replication and repair. *DNA Repair*, 93, 102908. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2020.102908>
- Saveliev, S. v., & Cox, M. M. (2001). *Product analysis illuminates the ® nal steps of IES deletion in Tetrahymena thermophila*. 20(12), 3251-3261.
- Schneider, C., Rasband, W., & Eliceiri, K. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671-675.
- Sekiguchi, J., & Shuman, S. (1997). Nick Sensing by Vaccinia Virus DNA Ligase Requires a 5 Phosphate at the Nick and Occupancy of the Adenylate Binding Site on the Enzyme. İçinde *JOURNAL OF VIROLOGY* (C. 71). Geliş tarihi gönderen <https://journals.asm.org/journal/jvi>
- Shi, K., Bohl, T. E., Park, J., Zasada, A., Malik, S., Banerjee, S., ... Aihara, H. (2018). T4 DNA ligase structure reveals a prototypical ATP-dependent ligase with a unique mode of sliding clamp interaction. *Nucleic Acids Research*, 46(19), 10474-10488. <https://doi.org/10.1093/nar/gky776>
- Shuman, S. (2009). DNA ligases: Progress and prospects. *Journal of Biological Chemistry*, C. 284, ss. 17365-17369. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900017200>
- Simsek, D., & Jasin, M. (2011). *DNA ligase III*. 4101. <https://doi.org/10.4161/cc.10.21.18094>
- Sinha, K. M., Hines, J. C., Downey, N., & Ray, D. S. (2004). *Mitochondrial DNA ligase in Crithidia fasciculata*. 2004(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.0305705101>
- Sinha, K. M., Hines, J. C., & Ray, D. S. (2006). *Cell Cycle-Dependent Localization and Properties of a Second Mitochondrial DNA Ligase in Crithidia fasciculata*. 5(1), 54-61. <https://doi.org/10.1128/EC.5.1.54>
- Sinha, S., Villareal, D., Shim, E. Y., & Lee, S. E. (2016). Risky Business: Microhomology-Mediated End Joining. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 788, 17-24. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.12.005>
- Slomiany, B. A., Kelly, M. M., & Kurtz, D. T. (2000). Extraction of nuclear proteins with increased DNA binding activity. *BioTechniques*, 28(5), 938-942. <https://doi.org/10.2144/00285st08>
- Sriskanda, V., & Shuman, S. (1998). Mutational analysis of Chlorella virus DNA ligase: catalytic roles of domain I and motif VI. İçinde *Nucleic Acids Research* (C. 26). Geliş tarihi gönderen <https://academic.oup.com/nar/article/26/20/4618/2902140>
- Subramanya, H. S., & Doherty, A. J. (1996). Crystal Structure of an ATP-Dependent DNA Ligase from Bacteriophage T7. İçinde *Cell* (C. 85).
- Sunderland, P. A., West, C. E., Waterworth, W. M., & Bray, C. M. (2006). An evolutionarily conserved translation initiation mechanism regulates nuclear or

- mitochondrial targeting of DNA ligase 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 47(3), 356-367. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02791.x>
- Timson, D. J., Singleton, M. R., & Wigley, D. B. (2000). DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutation Research - DNA Repair*, 460(3-4), 301-318. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00033-1](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00033-1)
- Tomkinson, A. E., Vijayakumar, S., Pascal, J. M., & Ellenberger, T. (2006, Şubat). DNA ligases: Structure, reaction mechanism, and function. *Chemical Reviews*, C. 106, ss. 687-699. <https://doi.org/10.1021/cr040498d>
- Unciuleac, M. C., Goldgur, Y., & Shuman, S. (2015). Structure and two-metal mechanism of a eukaryal nick-sealing RNA ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(45), 13868-13873. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516536112>
- Unciuleac, M. C., Goldgur, Y., & Shuman, S. (2017). Two-metal versus one-metal mechanisms of lysine adenylation by ATP-dependent and NAD⁺-dependent polynucleotide ligases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), 2592-2597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1619220114>
- Unciuleac, M. C., Goldgur, Y., & Shuman, S. (2019). Structures of ATP-bound DNA ligase D in a closed domain conformation reveal a network of amino acid and metal contacts to the ATP phosphates. *Journal of Biological Chemistry*, 294(13), 5094-5104. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007445>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439-D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Verma, P., & Greenberg, R. A. (2016). *Noncanonical views of homology-directed DNA repair*. <https://doi.org/10.1101/gad.280545>
- Vivona, J. B., & Kelman, Z. (2003, Temmuz 10). The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins. *FEBS Letters*, C. 546, ss. 167-172. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00622-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00622-7)
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., & Iliakis, G. (2005). *DNA Ligase III as a Candidate Component of Backup Pathways of Nonhomologous End Joining*. [https://doi.org/https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3055](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3055)
- Waterworth, W. M., Masnavi, G., Bhardwaj, R. M., Jiang, Q., Bray, C. M., & West, C. E. (2010). A plant DNA ligase is an important determinant of seed longevity. *Plant Journal*, 63(5), 848-860. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04285.x>
- Wilkinson, A., Day, J., & Bowater, R. (2001). Bacterial DNA ligases. *Molecular Microbiology*, 40(6), 1241-1248. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02479.x>

- Willer, M., Rainey, M., Pullen, T., & Stirling, C. J. (1999). The yeast CDC9 gene encodes both a nuclear and a mitochondrial form of DNA ligase I. *Current Biology*, 9(19), 1085-1095.
- Williamson, A., Grgic, M., & Leiros, H.-K. S. (2018). DNA binding with a minimal scaffold: structure-function analysis of Lig E DNA ligases. *Nucleic Acids Research*, 46(16), 8616-8629. <https://doi.org/10.1093/nar/gky622>
- Williamson, A., Hjerde, E., & Kahlke, T. (2016). Analysis of the distribution and evolution of the ATP-dependent DNA ligases of bacteria delineates a distinct phylogenetic group “Lig E”. *Molecular Microbiology*, 99(2), 274-290. <https://doi.org/10.1111/mmi.13229>
- Williamson, A., & Leiros, H. K. S. (2020). Structural insight into DNA joining: From conserved mechanisms to diverse scaffolds. *Nucleic Acids Research*, 48(15), 8225-8242. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa307>
- Williamson, A., & Leiros, H.-K. S. (2019). Structural intermediates of a DNA–ligase complex illuminate the role of the catalytic metal ion and mechanism of phosphodiester bond formation. *Nucleic Acids Research*, 47(14), 7147-7162. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz596>
- Williamson, A., Rothweiler, U., & Schröder Leiros, H. K. (2014). Enzyme-adenylate structure of a bacterial ATP-dependent DNA ligase with a minimized DNA-binding surface. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 70(11), 3043-3056. <https://doi.org/10.1107/S1399004714021099>
- Włoga, D., Strzyżewska-Jówko, I., Gaertig, J., & Jerka-Dziadosz, M. (2008). Septins stabilize mitochondria in *Tetrahymena thermophila*. *Eukaryotic Cell*, 7(8), 1373-1386. <https://doi.org/10.1128/EC.00085-08>
- Wunderlich, F., & Franke, W. W. (1968). Structure of macronuclear envelopes of *Tetrahymena pyriformis* in the stationary phase of growth. *The Journal of cell biology*, 38(2), 458-462. <https://doi.org/10.1083/jcb.38.2.458>
- Yao, M. chao, Chao, J. lan, & Cheng, C. yin. (2015). Programmed genome rearrangements in *Tetrahymena*. *Mobile DNA III*, 349-367. <https://doi.org/10.1128/9781555819217.ch16>
- Yao, M.-C., Chao, J.-L., & Cheng, C.-Y. (2014). Programmed Genome Rearrangements in *Tetrahymena*. *Microbiology Spectrum*, 2(6). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.mdna3-0012-2014>
- Yilmaz, G., & Arslanyolu, M. (2015). Efficient expression of codon-adapted affinity tagged super folder green fluorescent protein for synchronous protein localization and affinity purification studies in *Tetrahymena thermophila*. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0137-9>
- Yutin, N., & Koonin, E. v. (2009). Evolution of DNA ligases of Nucleo-Cytoplasmic Large DNA viruses of eukaryotes: A case of hidden complexity. *Biology Direct*, 4, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-4-5>

EKLER

EK-1: Çalışmada kullanılan ve kritik öneme sahip çeşitli gereçlerin listesi

MALZEMELER	KAYNAK	EK BİLGİ
Rekombinant DNA'lar		
pGEM-T Easy	Promega	A1360
pIGF-sfGFP	Yılmaz ve Arslanyolu, 2015	-
pIGF-LigII-sfGFP	Bu çalışma	-
pIGF-LigII-10xHis	Bu çalışma	-
<i>Tetrahymena thermophila</i> ırkları		
<i>T. thermophila</i> CU427.4, <i>chx1-1/chx1-1</i> (<i>CHX1</i> ; cy-s, VI)	Tetrahymena Stock Center	SD00715
<i>T. thermophila</i> B2086 II, <i>mat1-2/mat1-2</i> (<i>mat1-2</i> ; II)	Tetrahymena Stock Center	SD01625
<i>T. thermophila</i> CU428.2, <i>mpr1-1/mpr1-1</i> (<i>MPR1</i> ; mp-s, VII)	Tetrahymena Stock Center	SD00178
<i>T. thermophila</i> LigII-cGFP	Bu çalışma	-
<i>T. thermophila</i> LigII-nGFP	Bu çalışma	-
<i>T. thermophila</i> LigII-10xHis	Bu çalışma	-
Ticari Kitler		
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific	K0502
Nucleospin Plasmid Purification Kit	Machery-Nagel	REF 740499.50
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific	K0691
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific	K0701
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Machery-Nagel	740609.50
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega	A1120
Bakteriyel Irklar		
<i>E. coli</i> DH5α	Thermo Scientific	18265017
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Agilent	#200249
Rekombinant Enzimler		
Taq DNA Polimeraz	Thermo Scientific	EP0401
PrimeStar HF DNA Polymerase	Takara	R010B
Phusion DNA Polymerase	Thermo Scientific	F530S
T4 DNA Ligase	New England Biolab	M0202S
Apal	Thermo Scientific	ER1415
BamHI	Thermo Scientific	ER0051
SpeI	Thermo Scientific	ER1251
KpnI	Thermo Scientific	ER0521
NotI	Thermo Scientific	ER0591
XhoI	Thermo Scientific	ER0691
XmaI	Thermo Scientific	ER0171
PmeI	Thermo Scientific	ER1341
SacI	Thermo Scientific	ER1131
BbsI	Thermo Scientific	ER1011
BlpI	New England Biolab	R0585S
EcoRI	Thermo Scientific	ER0271
EcoRV	Thermo Scientific	ER0301
Proteinase K	Sigma Aldrich	P2308
Kimyasallar		
Paromomisin sülfat tuzu	Sigma Aldrich	P9297
Sikloheksamid	Serva	10700

Amfisilin	Wisent Bio	400-110
Kanamisin sülfat tuzu	Sigma Aldrich	K1377
Kadmiyum klorür	Sigma Aldrich	20899
Amfoterisin B	Capricorn Scientific	AMP-B
Pen-strep	Capricorn Scientific	PS-B
Kloramfenikol	Fluka	23275
Proteoz pepton	Sigma Aldrich	82420
Maya özütü	Condalab	1702
Glukoz	Sigma Aldrich	G7021
Tris Base	Sigma Aldrich	T6066
Borik Asit	Sigma Aldrich	B7901
%10 SDS solüsyonu	AppliChem	A0676
Sodyum Asetat	Sigma Aldrich	S2889
Etidyum Bromür	Sigma Aldrich	E7637
0.5 M EDTA solüsyonu	Sigma Aldrich	03690
Agaroz	Sigma Aldrich	A9539
2-propanol	Sigma Aldrich	33539
Etanol	Sigma Aldrich	24105-M
Gliserol	Sigma Aldrich	G5516
Rapture Disk, 900 psi	Bio-Rad	#1652328
0.6 µm Gold particles	Bio-Rad	#1652262
Stopping Screen	Bio-Rad	#1652336
Macrocarriers	Bio-Rad	#1652335
Hoechst 33258	Sigma Aldrich	861405
DAPI	Roche	10236276001
Triton-X 100	Bio shop	TRX777
Igepal	Sigma Aldrich	18896
VectaShield Antifade Mounting Medium	Vector Laboratories	H-1000-10
Protease Inhibitor Coctail-100x	Cell Signaling	#5871
Pierce 660 nm Protein Assay Reagent	Thermo Scientific	22660
DNA Marker	Thermo Scientific	SM0311
Protein Marker	Thermo Scientific	26619
Protein Marker	Bio-Helix	PM008-0500
PVDF membranı	Immobilon –F, Millipore	IPVH00010
BSA	Sigma Aldrich	A2153

Yazılım ve Programlar

ImageJ	(Schneider, Rasband, & Eliceiri, 2012)	https://imagej.nih.gov/ij/
Inkscape		https://inkscape.org/
ImageLab	Bio-Rad	https://www.bio-rad.com/
CellSens	Olympus	https://www.olympus-lifescience.com/
Mendeley	-	https://www.mendeley.com
DNA sequence Editor	-	http://www.biocourseware.com/iphone/dnaseqeditor/
Ligation calculator	-	http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html
Clustal Omega	-	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
SignalP 5.0	(Almagro Armenteros vd., 2019)	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0

EK-2: Çalışmada kullanılan cihazlar.



EK-3: Çalışmada kullanılan ligaz üyeleri ve NCBI ulaşım numaraları.

Ligaz I

At6 *Arabidopsis thaliana* NP_176845.2
Br6 *Brassica rapa* XP_009105224.1
Pp6 *Prunus persica* XP_020414775.1
Vv6 *Vitis vinifera* XP_002266168.2
Eh1 *Entamoeba histolytica* EMS17442.1
Zm1 *Zea mays* NP_001349149.1
Dm1 *Drosophila melanogaster* NP_611843.2
Ot1_1 *Oxytricha trifallax* Contig3890.0.0.g68
Ot1_2 *Oxytricha trifallax* Contig3967.0.g37
Ot1_3 *Oxytricha trifallax* Contig887.1.g61
Tt1_1 *Tetrahymena thermophila* XP_001022972.1
Tt1_2 *Tetrahymena thermophila* XP_001026764.2
Hs1 *Homo sapiens* NP_000225.1
Dr1 *Danio rerio* NP_001119860.1
Rn1 *Rattus norvegicus* NP_001019439.1
Im1 *Ichthyophthirius multifiliis* XP_004039275.1
Sl1 *Stylonychia lemnae* CDW90516.1
Sce1 *Saccharomyces cerevisiae* AJU60470.1
Kp1 *Komagataella phaffii* SCV12144.1

Ligaz II

TtAl2 *Tetrahymena thermophila* XP_001011861.1
OtAl2_1 *Oxytricha trifallax* Contig22262.0.g6
OtAl2_2 *Oxytricha trifallax* Contig17016.0.g67
ScAl2_1 *Stentor coeruleus* OMJ88319.1
SlAl2 *Stylonychia lemnae* CDW80774.1
SlAl2-2 *Stylonychia lemnae* CDW80162.1
PtAl2_1 *Paramecium tetraurelia* XP_001460273.1
PtAl2_2 *Paramecium tetraurelia* XP_001435874.1
ImAl2 *Ichthyophthirius multifiliis* XP_004037347.1
SmAl2 *Symbiodinium microadriaticum* CAE7441989.1

PolA12 *Perkinsus olseni* KAF4733636.1
LbK2 *Leishmania braziliensis* SYZ66794.1
IpK2 *Leptomonas pyrrhocoris* XP_015665331.1
TcK2a *Trypanosoma cruzi* EKG06613.1
CfK2a *Crithidia fasciculata* AAY22182.1
CfK2b *Crithidia fasciculata* AAQ88427.1
BsK2b *Bodo saltans* CUI15427.1
HrF2 *Haliotis rufescens* XP_048253450.1
AnF2 *Ascodesmis nigricans* TGZ83613.1
PeF2 *Peziza echinospora* KAI5807506.1
RiF2 *Rhizophagus irregularis* CAB5198509.1
CteF2 *Cladochytrium tenue* KAJ1539952.1
PaF2 *Polychytrium aggregatum* KAI9209021.1
MsnF2 *Morchella snyderi* KAI5844391.1
SpOo2 *Saprolegnia parasitica* XP_012212333.1
PiOo2 *Pythium insidiosum* GLD96892.1
CoFi2 *Capsaspora owczarzaki* XP_004364110.1
RsMe2 *Rotaria* sp. CAF2733490.1
RsoMe2 *Rotaria sordida* CAF1007746.1
AvMe2 *Adineta vaga* UJR31854.1
EcMe2 *Elysia chlorotica* RUS90466.1
GaeMe2 *Gigantopelta aegis* XP_041376559.1
AcaAm2 *Acanthamoeba castellanii* XP_004345979.1
McMe2 *Mytilus coruscus* CAC5396309.1

Ligaz III

Hs3 *Homo sapiens* CAA59230.1
Dr3 *Danio rerio* NP_001025345.2
Mm3 *Macaca mulatta* NP_001252899.1
Rn3 *Rattus norvegicus* NP_001380965.1
Am3 *Apis mellifera* XP_006570423.3
Dm3 *Drosophila melanogaster* NP_650187.2

Ligaz IV

Tt4 *Tetrahymena thermophila* XP_001019308.1
Im4 *Ichthyophthirius multifiliis* XP_004032181.1

Pt4 Paramecium tetraurelia CAI39048.1
Zm4 Zea mays ONM14161.1
Hs4 Homo sapiens NP_001091738.1
Rn4 Rattus norvegicus NP_001099565.1
Dr4 Danio rerio NP_001096593.1
Ot4 Oxytricha trifallax Contig17485.0.g101
Sc4 Stentor coeruleus OMJ85786.1
Sl4 Stylonychia lemnae CDW86767.1
OhY Ogataea haglerorum KAG7697268.1
Kp4 Komagataella phaffii CCA39424.1
Spa4 Saccharomyces pastorianus QID87989.1

Prokaryot ve Virüs Ligazları

AsE Aliivibrio salmonicida WP_012550062.1
BpE Burkholderia pseudomallei WP_111952420.1
PbE Planctomycetaceae bacterium OAI47765.1
LrE Limnoglobus roseus WP_149110449.1
BmE Blastopirellula marina WP_002650560.1
NmE Neisseria meningitidis CAM07680.1
BseE Bathymodiolus septemdiem BAS67037.1
MsE Methylophaga sp. PHR81162.1
RbE Rickettsiales bacterium MBB66575.1
HiE Haemophilus influenzae PRL66795.1
MbE Myxococcales bacterium MBL9009070.1
HspE Hyalangiium sp. WP_224363580.1 DNA ligase
CgE Cystobacter gracilis WP_224247487.1
VpV Vibrio phage YP_007675948.1
PDSDV Prokaryotic dsDNA virus sp. QDP53495.1
PBCV Paramecium bursaria Chlorella virus AGE54684.1
EvV Escherichia virus T4 AHY83901.1
EpV3 Enterobacteria phage T3 NP_523305.1
EpV7 Escherichia phage T7 ACY75838.1
MtB Mycobacterium tuberculosis ABQ74876.1
MsmC Mycolicibacterium smegmatis ABK75022.1
MtD Mycobacterium tuberculosis NP_215453.1

AaA Archaeoglobales archaeon RLI77523.1
GaA Geoglobus ahangari WP_048094233.1
TsA Thermococcus sp. WP_088882461.1
PfA Pyrococcus furiosus WP_011012782.1
HpN Helicobacter pylori WP_000597558.1
SsN Sulfurovum sp. CUV65274.1
HtN Hydrogenimonas thermophila WP_092911277.1
AcrN Aliarcobacter cryaerophilus QNM93068.1



EK-4: Çalışmada elde edilen ekspresyon vektörü pVLigII-10xHis vektörünün dizi analizi.

PmeI: GTTTAAAC

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

pVLig	ATTCTTAGCTACGTGATTCACGATTTATGCAATGATCCATATAAAATAATGTAAATAGTG	60
DiziAnalizipVLigII	-----ACATAAGGTGG	11

pVLig	TATATATATATATTCGTCTTTTTTATTCTTTTATATAATTTAAAAAATTAAAAAATTTA	120
DiziAnalizipVLigII	GATATATATATATTCGTCTTTTTTATTCTTTTATATAATTTAAAAAATTAAAAAATTTA	71

pVLig	ATAAAGCTCTAATAAAATAAATAATACTAACTTAAATA	180
DiziAnalizipVLigII	ATAAAGCTCTAATAAAATAAATAATACTAACTTAAATA	131

pVLig	ATTGATTTAACAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAAATCAATCAAAGTTTGGGAAATCAGC	240
DiziAnalizipVLigII	ATTGATTTAACAAAACCTGTATTTCTTAATTTTAAATCAATCAAAGTTTGGGAAATCAGC	191

pVLig	CTGCTTGATGGAAATAAATCTTAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTTAAAGTGAAGAGATT	300
DiziAnalizipVLigII	CTGCTTGATGGAAATAAATCTTAAATCAGATATGGAAAGTTGGTTTAAAGTGAAGAGATT	251

pVLig	GAAGAGAAAACCTTAAATTGTCCAAAAGTAGCACAAAGACACTGACTCTTGTTTAGATTAC	360
DiziAnalizipVLigII	GAAGAGAAAACCTTAAATTGTCCAAAAGTAGCACAAAGACACTGACTCTTGTTTAGATTAC	311

pVLig	ATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATATCCCATGAAA	420
DiziAnalizipVLigII	ATAATAAGAGTGATTGAAAACAAAAAATTGAAAGGATATAGCGGAGATATCCCATGAAA	371

pVLig	AAGAATGAGCCTTAAATCATCATTCCTGCAAAATACGCAAGTGGATTTTCAATTTAAATT	480
DiziAnalizipVLigII	AAGAATGAGCCTTAAATCATCATTCCTGCAAAATACGCAAGTGGATTTTCAATTTAAATT	431

pVLig	TCAGCACCTAAATCTGTTGAAAATAATGCTAACGATGATAAAGATTCCTAAAGTTGATTCA	540
DiziAnalizipVLigII	TCAGCACCTAAATCTGTTGAAAATAATGCTAACGATGATAAAGATTCCTAAAGTTGATTCA	491

pVLig	AATACTCAAGCGTATTTATAGGAAAACAAAACCTGGTCATCATAATTTGTAATTTAACT	600
DiziAnalizipVLigII	AATACTCAAGCGTATTTATAGGAAAACAAAACCTGGTCATCATAATTTGTAATTTAACT	551

pVLig	CTGCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATTATAGGCAAACTAGGAATAAAAAAGACATGGGAA	660
DiziAnalizipVLigII	CTGCTGGCAATGAAGTAGAAGAAATTATAGGCAAACTAGGAATAAAAAAGACATGGGAA	611

pVLig	AAAAGTTCTACAATATTAAGTGCAAACTAGTGTAATTTGATTTCAAAAATTAATTTAG	720
DiziAnalizipVLigII	AAAAGTTCTACAATATTAAGTGCAAACTAGTGTAATTTGATTTCAAAAATTAATTTAG	671

pVLig	GAATACGAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTTAGCTAAATGAA	780
DiziAnalizipVLigII	GAATACGAAAGAAAGGGATATGTGAGAGATGATAGTCAATATAATTTTAGCTAAATGAA	731

pVLig	GTTAATAAACACTTTTCAGCATAAAATGGATCTAGTAATAATAATTAGCTTGATCTCAAC	840
DiziAnalizipVLigII	GTTAATAAACACTTTTCAGCATAAAATGGATCTAGTAATAATAATTAGCTTGATCTCAAC	791

pVLig	TAGAAAGGCAAAAAGAAAAATTTTAAATAAGATTACGGGTTATACGACGATTACATTCA	900
DiziAnalizipVLigII	TAGAAAGGCAAAAAGAAAAATTTTAAATAAGATTACGGGTTATACGACGATTACATTCA	851

pVLig	AATATTTACAGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGCTGGTGGCTCTTAATTA	960
DiziAnalizipVLigII	AATATTTACAGTATCTCAGATTAGTCAGATTTAACTGCTAGGCTGGTGGCTCTTAATTA	911

pVLig	GATTTATCATTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTAATAGCTCAGTTGTTGTAAGTGA	1020
DiziAnalizipVLigII	GATTTATCATTCGACAAGGGTGATGATGATGATGGTTATAGCTCAGTTGTTGTAAGTGA	971

pVLig	GAAATTA AAAAGGTTCTTTAGTGCTAACGGAAGTATGGATTACAGGTGACTTTTAGCT	1080
DiziAnalizipVLigII	AAATTA AAAAGGTTCTTTAGTGCTAACGGAAGTATGGATTACAGGTGACTTTTAGCT	1027
	*** * *****	
pVLig	TAAGCAATGCCAGATGAAATGGATCCAACCTGGCTGGTATGCAAGTGAAAAATGGATGGA	1140
DiziAnalizipVLigII	TAAGCATGCCAGATGAATGATCAC--TGCTGCATGCAGTGAAA-----ATTGATGA	1076
	***** * * * * *	

pVlig	GTCAGAGCTGTTTGGACTGGAAAGACATTTTATTCTAGGAATGGTAACGAATTCTACCCCT	1200
DiziAnalizipVligII	GTTTCGAGCCTGTTGGACTGGAGACCTTTTATCTAGCATGTAC-----GAATCT	1124
	** **** ***** * * * * * * *	
pVlig	CCTCCATTTTTCATTTAAAAATTTCCCAAATTGCACTTTAGATGGGGAATTGTTTACAAAA	1260
DiziAnalizipVligII	ACTC----CTCATTTTCATATATTCCGAGTGAC---TGAATGGGGAACGCTTACCCAA	1175
	*** ***** * * * * * * ***** * * * *	
pVlig	AGAGATGATTTCTAGCGTTGTGTGGGTATTGTTAAGACAAAAAATGGAATGAAGAAAAA	1320
DiziAnalizipVligII	ACGCCAGT-----	1183
	* *	
pVlig	GATGAAAGGTGGAAAGATATTGTTTACTTAGTTTACGACTGTCCTAAATTATTAAACCC	1380
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	TTTAAAGATAGAATAAAAGCTTTACAAGAATAAATCCAAAACCTGGTAACAAGTACATT	1440
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	AAAGTTCTTCCACATAAGATAGTGGAGAGCAGAGAATAACTGAATCAGAGCTTGATAGA	1500
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	GTCTTAAAAATAATGGCGAAGGTTTGATGTTAAGAGATCCTAATTCATGTATGAATGC	1560
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	AGAAGATCAAAAACCTTCTTAAGGTAAAAACATTTACAGATGAAGAAGCTACAGTAATT	1620
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	GGGAGTGAAAGAGGTGAAGGAAGATGTGCAGATATGATGGGTGCTTTGGTATGCCGTATG	1680
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	AAAAATGGAAAAGAATTCAAAATAGGATCAGGATTCATGATGACTAAAGAAGAAGGCCA	1740
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	CCTAAAAAAGGAAGTGTGATAACATTCAAATACCAAAATCTTACCAAAGATGGTAAACCA	1800
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	AGATTCCTATTTTCTTGAGAATAAAAGAAGACGAAGGGCCCAACAAACAACCAACCAAA	1860
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	ACTTCTATTCATAAATTATACTAAACTATATGCTCATATATCATACAAAATATCATATTT	1920
DiziAnalizipVligII	-----	1183
pVlig	TTTAAATG 1928	
DiziAnalizipVligII	-----	1183

ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO. : 0000-0001-5309-4416

Ad Soyad : Nurçin KÜÇÜKOĞLU

Yabancı Dil : İngilizce, İbranice.

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2023, Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji-DOKTORA
- 2010, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Teknolojiler Anabilim Dalı, Biyoteknoloji-YÜKSEK LİSANS
- 2017, Anadolu Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü-LİSANS.

Yayınları ve/veya Bilimsel/Sanatsal Faaliyetleri:

- Erhan Aslan*, **Nurçin Küçükoğlu**, Muhittin Arslanyolu (2017). *A Comparative in-silico analysis of autophagy proteins in ciliates*. **PeerJ** 5:e2878

*Sorumlu yazar.

- **Nurçin Küçükoğlu** and Muhittin Arslanyolu. Newly identified ATP dependent DNA ligase subfamily II specifically distributed in eukaryotic invertebrate: TtLigII as a first member from Tetrahymena thermophila; Ciliate Molecular Biology Conference, 10 - 16 July 2015. Camerino, Italy.
- **Nurçin Küçükoğlu**, Muhittin Arslanyolu. Bioinformatical Characterization of Tetrahymena thermophila ATP Dependent DNA Ligase Enzyme Family; The International Congress on Bioinformatics and Biomics, 18 – 22 May, 2011. Kusadasi-Aydin, Turkey.
- M. T. Yildiz, **N. Küçükoğlu**, Z. Saltan, M. Arslanyolu. Search for efficiency of cationic lipids isolated from unicellular Tetrahymena thermophila for DNA-mediated transformation; XVI. National Biotechnology Congress, November 2010. Antalya, Turkey.
- M. Arslanyolu, M. T. Yildiz, **N. Küçükoğlu**. Biological (Natural) Transformation of unicellular Tetrahymena thermophila by naked plasmid DNA; XVI. National Biotechnology Congress, November 2010. Antalya, Turkey.
- **Nurçin Küçükoğlu**, Handan Açelya Akdamar, Muhittin Arslanyolu. Bioinformatical analysis of ATP Dependent DNA Ligases of Tetrahymena

thermophila and Cloning of DNA Ligase I; 19. National Biology Congress, June 2008. Trabzon, Turkey.

Mesleki yeterlilik

Rekombinant DNA Teknolojileri.

Protein biyokimyası.

E.coli, *Tetrahymena* ve *Pichia pastoris*'de rekombinant protein üretimi

Protein saflaştırması

Tetrahymena moleküler biyolojisi.

Genom manipölasyonu (knock-out, gen baskılama, gen etiketleme)

Tetrahymena transformasyonu

Floresan ve konfokal mikroskopi.

İnsan hücre kültürü.

Web tabanlı biyoinformatik.

Yurtdışı eğitim

2019: Almanya Nörodejeneratif Hastalıklar Enstitüsü'nde (DZNE) Erasmus stajı.

Dresden-Almanya. Danışman: Dr. Çağhan Kızıl

Araştırma Deneyimleri

- Omurgasızlarda yeni tanımlanmış ATP Bağımlı DNA Ligaz II alt-ailesini temsil eden ilk üye *Tetrahymena thermophila* TtLigII-1 enziminin rekombinant karakterizasyonu: homolog rekombinant enzim üretimi, kristalizasyonu ve hücre içi lokalizasyonunun belirlenmesi (TÜBİTAK-1001, Araştırmacı, 2012-2014)
- *Tetrahymena thermophila* Deoksiribonükleaz Enzim Aile Üyeleri DNAz I-2 ile DNAz II-1'in Rekombinant Protein Olarak Üretimi ve Enzimatik Karakterizasyonu (TÜBİTAK-1001, Araştırmacı, 2011-2012)
- Protein Üretim Konakçısı *Tetrahymena thermophila*'ya Katyonik Lipidler ile Plasmid DNA'sının Etkin Transfeksiyonu ve ATP Bağımlı TtDNA Ligaz I Homolog Proteininin Biyoteknolojik Üretimi (TÜBİTAK-1001, Bursiyer, 2007-2010).