



***CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*'DE
REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİLMESİ**

Öznur CAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Köksal PABUÇCU
2014
Her Hakkı Saklıdır**

T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII'DE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİLMESİ

Öznur CAN

TOKAT

2014

Her Hakkı Saklıdır

Doç. Dr. Köksal PABUÇCU danışmanlığında, Öznur CAN tarafından hazırlanan bu çalışma 12/08/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL

İmza:

Üye : Doç. Dr. Köksal PABUÇCU

İmza:

Üye : Yrd. Doç. Dr. Sinan EĞRİ

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

**Fen Bilimleri
Enstitü Müdürü**

04.09.2014

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Öznur CAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

CHLAMYDOMONAS REINHARDTII'DE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Öznur CAN

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Köksal PABUÇCU

Bu çalışmada, Chlorophyta'ya mensup bir alg türü olan *Chlamydomonas reinhardtii* CC-125 (yabani tip) suşunun elektroporasyon yöntemi ile transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Yeşil Floresans Proteini (GFP) kodlayan gen, pChlamy_ 3 vektörüne konstrükt edilerek, alg hücrelerinin nüklear genomuna transferi sağlanmıştır. Transgen entegrasyonu yapılmış ancak Yeşil Floresans Protein (GFP) birikimi gözlenememiştir.

2014, 56 sayfa

Anahtar kelimeler: *C. reinhardtii*, GFP , rekombinant protein, elektroporasyon

ABSTRACT

M. Sc.Thesis

THE RECOMBINANT PROTEIN PRODUCTION IN *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Öznur CAN

GaziosmanpasaUniversity
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Doç. Dr. Köksal PABUÇCU

In this study, transformation of the algae *Chlamydomonas reinhardtii* strain CC-125 (wild type), as a member of the division Chlorophyta, was performed by electroporation technique. Green Fluorescent Protein (GFP) encoding gene was constructed pChlamy_3 vector, and then transferred into the nuclear genom of algae cells. Although the entegration of transgene was achieved, accumulation of the recombinant GFP couldn't be observed.

2014, 56 pages

Keywords: *C. reinhardtii*, GFP, recombinant protein, electroporation

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesinde yardımlarını esirgemeyen, çalışmalarına yön veren ve laboratuvar imkanlarından bana her türlü yararlanma fırsatı sunan değerli danışmanlarım Sayın Doç. Dr. Köksal PABUÇCU ve Prof. Dr. İsa GÖKÇE'ye,

Laboratuvar çalışmaları süresince benden yardımlarını bir an olsun sakınmayan Arş. Gör. Hülya KUDUĞ'a,

Bu tez çalışmasını proje ile destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı'na,

Bana her konuda maddi manevi destek veren, her daim varlıklarını yanımda hissettiğim, ne yaparsam yapayım haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, beni koşulsuz seven kıymetli annem Aysel ERKEN, babam Adem ERKEN ve abim Nurullah ERKEN'e,

Sabır kelimesinin vücut bulduğunu düşündüğüm insan, hayat arkadaşım sevgili İlyas CAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Öznur CAN
Ağustos, 2014

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. TEMEL KAVRAMLAR	4
2.1. Yeşil Floresans Protein (Green Fluorescent Protein, GFP)	4
2.2. Model Organizma <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	8
2.2.1. Taksonomi ve biyolojisi	9
2.2.2. Büyüme koşulları	10
2.2.3. Yaşam döngüsü	10
2.2.4. Genetik yapısı	11
2.3. <i>C. reinhardtii</i> 'de Gen Aktarım Yöntemleri	12
2.3.1. Cam boncuk (Glass Beads)	14
2.3.2. Silikon karpitler (Silika iğneleri, SiC)	14
2.3.3. Mikrofırlatıcı partikül bombardımanı	14
2.3.4. Elektroporasyon	15
2.3.5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	16
2.4. Transformasyon Verimliliğini Etkileyen Faktörler.....	16
2.4.1. Kodon optimizasyonu	17
2.4.2. Promotör	17
2.4.3. Markör.....	17
2.4.4. Raportör genler	18
2.5. Protein Sekresyonu	19
2.6. <i>C. reinhardtii</i> 'de Rekombinant Çalışmalar	20
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Kullanılan cihazlar	25
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	26
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	27
3.2. Yöntem	29
3.2.1. PCR işlemleri için GFP genlerine ait primerlerin tasarımı	29
3.2.2. pChlamy_3 vektörünün, konak DH5 α ile çoğaltılması.....	31
3.2.3. Plazmit DNA saflaştırılması	32
3.2.4. PCR ile GFP DNA'sının amplifikasyonu	33
3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	34
3.2.6. Agaroz jel elektroforezi	35
3.2.7. Restriksiyon enzimleri ile kesim.....	35
3.2.8. DNA ligasyonu	37
3.2.9. Konstrukt pChlamy_3-GFP plazmitinin DH5 α hücrelerine transformasyonu ...	37
3.2.10. Plazmit DNA saflaştırılması	37
3.2.11. Plazmit DNA'ların PCR ile analizi.....	37

3.2.12. DNA dizileme	38
3.2.13. <i>C. reinhardtii</i> 'ye gen aktarımı	38
3.2.14. <i>C. reinhardtii</i> genomik DNA'sının izolasyonu	40
3.2.15. <i>C. reinhardtii</i> 'de GFP protein birikiminin SDS-PAGE ile belirlenmesi.....	41
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	42
4.1. GFP DNA Dizisinin PCR ile Amplifikasyonu	42
4.2. pChlamy_3 Vektörünün Konak DH5 α ile Çoğaltılması.....	42
4.3. Plazmit ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	43
4.4. pChlamy_3-GFP Plazmit DNA'larının Restriksiyon Enzimleri ile Analizi.....	43
4.5. Dizi Analizi Sonuçları.....	44
4.6. <i>C. reinhardtii</i> 'nin Katı ve Sıvı Besiyerlerinde Üretilmesi.....	46
4.7. Elektroporasyon	46
4.8. GFP Proteinin Ekspresyon Çalışmaları.....	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	56

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
%	Yüzde
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µmol	Mikromol
µM	Mikromolar
°C	Celcius
Kısaltmalar	Açıklamalar
A	Adenin
bç	baz çifti
ble	bleomycin
BSA	Sığır (Bovine) Serum Albümini
C	Cytosine
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
ddH ₂ O	Çift distile su (Double distilled water)
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleosittrifosfat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilen diamintetra asetik asit
FSB	Frozen Storage Buffer
G	Guanin
GFP	Green Fluorescent Protein
gr	Gram
kbp	Kilo baz çifti
LB	Luria-Bertani
ME	Merkaptoetanol
mg	Miligram

ml	Mililitre
mM	Milimolar
ms	Milisaniye
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nm	Nanometre
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PMSF	Fenil metil sülfonil florit
RNA	Ribonükleik Asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı (rotatoryperminute)
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDS PAGE	SDS poliakrilamid jel elektroforezi
T	Timin
TAE	Tris Asetik Asit EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilenetilendiamin
Tris	2-Amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
OD	Optik dansite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. <i>A. victoria</i> organizmasında GFP proteininin Aequirin tarafından uyarılarak yeşil renkli görünmesinin mekanizması.....	4
Şekil 2.2. Yeşil floresans proteininin DNA dizisi	5
Şekil 2.3. Yeşil floresans proteininin amino asit dizisi.....	5
Şekil 2.4. GFP'nin üç boyutlu yapısı, Kromoforun kimyasal yapısı	6
Şekil 2.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ' nin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	8
Şekil 2.6. <i>C. reinhardtii</i> ' nin yaşam döngüsü	11
Şekil 2.7. <i>C. reinhardtii</i> ' de protein sekresyon yolları	20
Şekil 3.1. pChlamy_3 vektörünün dairesel haritası	30
Şekil 3.2. pChlamy_3 vektörünün poli-linker bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi.....	30
Şekil 4.1. GFP KpnI sense ve GFP XbaI reverse primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü	42
Şekil 4.2. pChlamy_3 plazmitini içeren DH5 α bakteri kolonisi.....	43
Şekil 4.3. pChlamy_3-GFP plazmitinin restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 4.4. pChlamy_3 - GFP plazmitinin DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü	45
Şekil 4.5. <i>C. reinhardtii</i> ' nin katı ve sıvı kültürleri	46
Şekil 4.6. Transgenik <i>C. reinhardtii</i> kolonilerinin seçici besiyerindeki görüntüsü.....	47
Şekil 4.7. pChlamy_3-GFP entegrasyon doğrulama PCR'ının agaroz jel görüntüsü	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Transformasyonu gerçekleştirilen bazı alg türleri	13
Çizelge 2.2. Algal biyoteknolojide kullanılan bazı promotörler	17
Çizelge 2.3. Algal biyoteknolojide kullanılan bazı markörler	18
Çizelge 2.4. Algal biyoteknolojide en yaygın kullanılan raportör genler.....	19
Çizelge 2.5. <i>C. reinhardtii</i> ile gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik çalışmalar	21
Çizelge 3.1. GFP PCR ürününün restriksiyon enzim kesimi için gereken madde miktarları	36
Çizelge 3.2. pChlmy_3 vektörünün restriksiyon enzim kesimi için gereken madde miktarları	36
Çizelge 3.3. Ligasyon için gereken madde miktarları	37

1. GİRİŞ

Hızla gelişen ve nüfusu artan dünyanın, özellikle maliyeti ve elde edilebilirliği sınırlı olan kaynaklara ihtiyacına binaen, büyük çapta rekombinant protein üretimi giderek kaçınılmaz hale gelmektedir. Bu amaçla yeni biyoteknolojik uygulamalar kullanılarak, hedef genlerin izolasyonu, farklı biyolojik sistemlere aktarılması ve burada istenen düzeyde ekspresyonu sağlanabilmektedir (Sipahi, 1997). Günümüzde bilinen bakteri, maya, böcek kültürü, mantar, transgenik hayvan ve bitki, memeli hücre kültürü gibi biyolojik sistemler, tıp ve eczacılıktan, tarım ve endüstriye kadar birçok alanda gereksinimleri karşılamak üzere değerlendirilmektedir (Rasala ve ark., 2010). Farklı avantaj ve dezavantajlara sahip olmalarına rağmen tümünün ortak paydası, yeterli miktarda ve yüksek kaliteli protein üretebilmektir.

Prokaryotik ekspresyon sistemi olarak bakteriler, üretiminin ekonomik olması, hızlı bir şekilde çoğalabilmesi ve genetiğinin iyi aydınlatılmış olması nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Schimidt, 2004). Ancak bakteri proteinleri, yüksek organizma proteinlerinde olduğu şekilde işlenmemektedir. Translasyondan sonra kendilerine şeker grupları bağlanması anlamında glikozillenme mekanizması mevcut değildir. Ayrıca rekombinant proteini doğru olarak katlamayabilir. Eğer proteinler üçüncül yapısını doğru olarak almazsa genellikle çözünmezler. Dolayısıyla bakteri içinde inklüzyon cisimcikleri oluşur (Griesbeck ve ark., 2006). Bakteri DNA'sına sokulan yabancı genler bazen intronlar içerebilir. Ne yazık ki bu biyoreaktörde transkriptlerden intronları uzaklaştırmak için gerekli mekanizma yoktur. Diğer bir önemli problem de proteaz ve endotoksinlerin varlığı nedeniyle eksprese edilen rekombinant proteini saflaştırma işlemidir. Bazı durumlarda, bakteriyel kısım içermeyen rekombinant proteinler, konak tarafından kendi bünyesindeki proteazlarla parçalanabilir. Bakteriyel kısım içerenler ise parçalanmaz ama bu bakteriyel kısım endotoksin olmasından dolayı uzaklaştırılması gerekmektedir. Tüm bu değinilen sorunlar diğer organizmalarda alternatif ifade sistemlerinin geliştirilmesine yol açmıştır.

Günümüzde rekombinant protein üretimi için en çok kullanılan sistemlerden biri de mayalardır. Ekspresyon seviyeleri nispeten yüksektir. Dezavantajı ise proteinlere çok fazla şeker birimleri ekler, proteinler sıklıkla doğru glikozillenmez. Ayrıca maya, proteinleri büyüme ortamına salacak etkin bir sistemden yoksundur. Salınım

yokluğunda rekombinant proteinler hücre içinde tutulurlar. Bu nedenle saflaştırmak daha zordur (Potvin ve Zhang, 2010).

Böceklerin ya da böcek hücre hatlarının baculovirüs ile infekte edilmesiyle birçok rekombinant genin ekspresyonu sağlanabilmektedir. Virüs ile infekte edilen konakçı hücre eninde sonunda öldüğünden rekombinant genin ekspresyonu sürekli olarak yapılamamaktadır (Aydın, 2007).

Fungal sistemler fungal enzimlerin üretiminde genellikle iyi olmasına rağmen, doğasında var olan proteazlar ve teknik kısıtlanmalardan dolayı bu sistemin ekspresyon konağı olarak kullanımı sınırlıdır (Lauersen ve ark., 2013).

Memeli hücre kültüründe kontaminasyon riski fazladır. Transgenik hayvan ekspresyon sistemleri daha önce bahsedilen ekspresyon sistemlerine göre daha uzun bir üretim periyodu ve yüksek maliyet gerektirir buna karşılık ürün miktarı oldukça düşüktür (Specht ve ark., 2010). Transgenik bitkiler ucuz ve güvenli üretim için bir fırsattır. Daha çok farmasötik proteinlerin üretimi için tercih edilmektedir. Bitkilerdeki glikolizasyon şekli memelilerdekinden farklıdır. Rekombinant proteinlerin fonksiyonlarını ve hatta immunojenitelerini düşürür. Terapotik rekombinant protein üreten bitkilerin kültürleri tarımsal alan olarak problemdir. Transgenik polenlerle gen akışı risklidir. İlk transformasyon basamağından protein izole edilene kadar geçen süre oldukça fazladır (Griesbeck ve ark., 2006). Sonuç olarak, bitkilerden protein saflaştırılması zahmetlidir. Bu dezavantajlar ekonomik başarıyı yavaşlatmıştır.

Dünya çapında geniş uygulama alanı bulan, son zamanlarda önemli biyoteknoloji araçlarından birisi haline gelen mikroalgler bilim insanlarının ilgi odağı olmuştur. Besin zincirinin ilk halkasını oluşturan algler zengin protein, karbonhidrat, yağ, mineral ve vitamin içeriği sayesinde çok uzun yıllardan beri insanlar tarafından çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. İnsan gıdası, kozmetik, tıp, çevre kirliliğini önleme, hayvan yemi, gübre, biyodizel, biyohidrojen üretimi alanlarında da en çok tercih edilen organizmalardır (Altuner ve ark., 2002; Rosenberg ve ark., 2008; Pabuçcu, 2012; Pabuçcu ve Altuner, 2012).

Diğer biyoreaktör sistemlerinde olduğu gibi mikroalglerde de endüstri ve eczacılık uygulamalarında öneme sahip olan rekombinant proteinlerin üretimi için heterolog genlerin ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Bu zamana kadar, antikor, hormon

ve aşı gibi bazı memeli proteinleri alglerde ekonomik olarak uygulanabilir düzeyde ekspresyon yapılmıştır (Gong ve ark., 2011).

Diğer ifade sistemlerine kıyasla geniş ölçekli üretim için daha güvenli, kolay ve ucuzdur. Mikroalglerin bu gibi çeşitli üstünlükleri, onları rekombinant DNA teknolojisinin önemli bir çalışma konusu haline getirmiştir. Rekombinant protein üretiminde çoğu bilim insanının güçlü promotör, markör seçimleri, verimli gen aktarım yöntemlerinin geliştirilmesi, kompleks moleküler mekanizmaların anlaşılması gibi mikroalgleri daha etkili biyoreaktör haline getirme çabaları, gelecekte bunları daha da tercih edilir yapacaktır (Neupert ve ark., 2012).

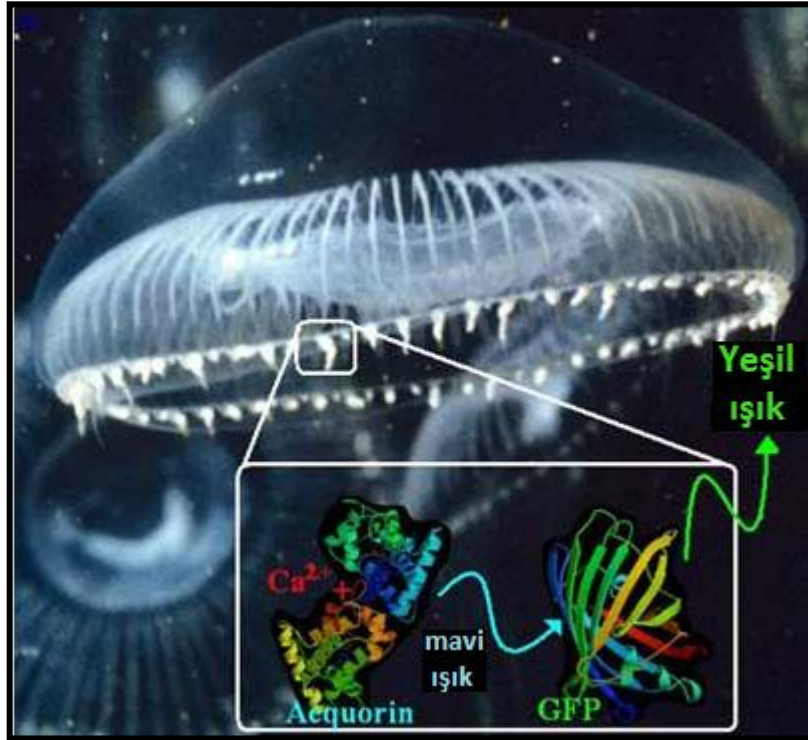
Ülkemiz rekombinant olarak üretilen çoğu terapötik aşı, hormon, endüstriyel enzimler yönünden dışa bağımlıdır (Balta, 2007). Bu mağduriyeti en aza indirmek için biyoteknolojik araştırmaların hız kazanması gerekmektedir. Bu bağlamda mikroalgler, yeni çalışılmaya başlanmış bir platform olmasına rağmen sahip olduğu niteliklerden ötürü daha caziptir.

Bu tez çalışmasında, biyoteknoloji ve moleküler biyolojide model hücre ya da protein fabrikası olarak nitelendirilen *Chlamydomonas reinhardtii* mikroalg türüne, elektroporasyon vasıtasıyla GFP (yeşil floresans proteinini) geninin transformasyonunun sağlanması ve sistemin optimize edilmesi amaçlanmıştır.

2. TEMEL KAVRAMLAR

2.1. Yeşil Floresans Protein (Green Fluorescent Protein, GFP)

Deniz Anası *Aequorea victoria* ve Deniz Menekşesi *Renilla reniformis* gibi biyoluminesens özellikteki birçok sölenter, GFP sayesinde yeşil ışık yayar. Bu protein, aequorin ya da lusiferaz gibi primer proteinlerden aldığı mavi ışığı, dalga boyu daha kısa olan ve daha uzak mesafelere ulaşan yeşil floresans ışığa dönüştürmektedir. Ca^{+2} iyonunun salınımı ile aequorin aktifleşir ve nihayetinde ışımaya meydana gelir (Şekil.2.1) (Kioz ve ark., 2004). Bununla ilgili çalışmalar 1960'lı yıllarda pasifik sahillerinde yaşayan ve mavi ışık yayan *Aequoria victoria* denizanasından GFP genin ilk olarak izole edilmesi ve klonlanması ile başlamıştır (Shimomura ve ark., 1962).



Şekil 2.1. *A. victoria* organizmasında GFP proteininin Aequorin tarafından uyarılarak yeşil renkli görünmesinin mekanizması.(Anonim, 2009)

Genelde ışık verme özelliği gösteren proteinler tek başlarına çalışmayıp, yardımcı bir molekül veya protein varlığına ihtiyaç duymaktadırlar. Yeşil floresans proteini ise başka bir proteine, moleküle veya kimyasal reaksiyona ihtiyaç duymadan etrafına floresans (yeşil) ışık verir (Serbest-Kobaner, 2006).

Aşağıda *A. victoria* organizmasından elde edilen yeşil floresans proteininin DNA dizisi gösterilmiştir (Şekil 2.2).

```
ATG gctagc aaaggagaag aacttttcac tggagttgtc ccaattcttg  
ttgaattaga tggatgatgtt aatgggcaca aattttctgt cagtggagag  
ggtgaaggtg atgctacata cggaaagctt acccttaa at tatttgcac  
tactggaaaa ctacctgttc catggccaac acttgtcact actttctctt  
atgggtgttca atgcttttcc cgttatccgg atcatatgaa acggcatgac  
tttttcaaga gtgccatgcc cgaaggttat gtacaggaac gcactatata  
tttcaaagat gacgggaact acaagacgcg tgctgaagtc aagtttgaag  
gtgataccct tgттаатсгt atcgagttaa aaggtattga ttttaaagaa  
gatggaaaca ttctcggaca caaactcgag tacaactata actcacacaa  
tgtatacatc acggcagaca aacaaaagaa tggaatcaaa gctaacttca  
aaattcgcca caacattgaa gatggatccg ttcaactagc agaccattat  
caacaaaata ctccaattgg cgatggccct gtccttttac cagacaacca  
ttacctgtcg acacaatctg ccctttcgaa agatcccaac gaaaagcgtg  
accacatggt ccttcttgag tttgtaactg ctgctgggat tacacatggc  
atggatgagc tctacaaaTA ATGA
```

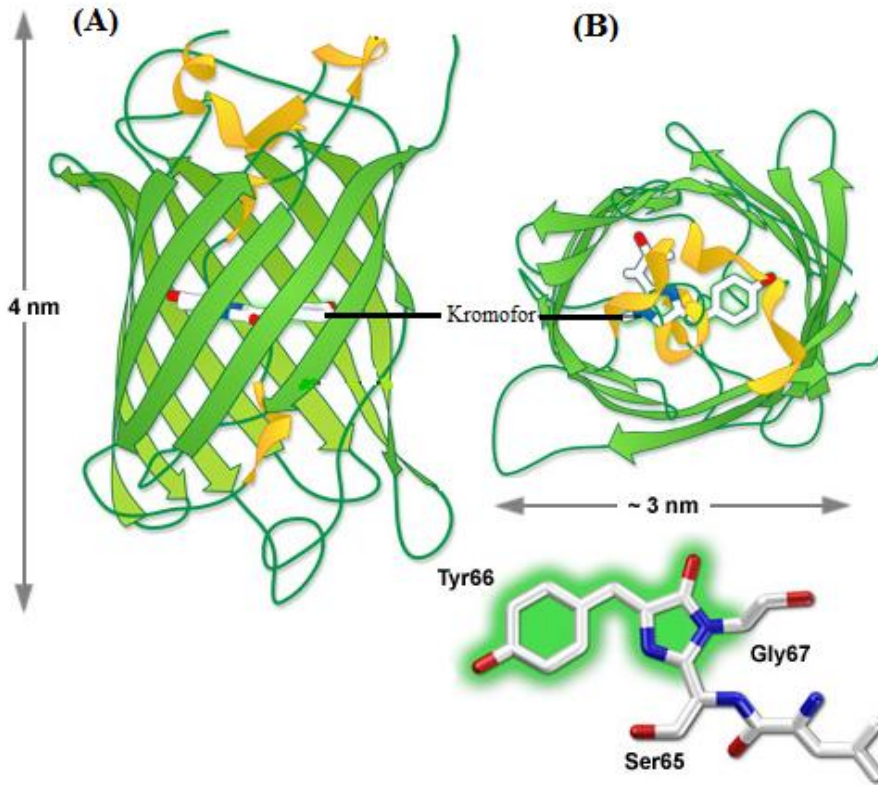
Şekil 2.2. Yeşil floresans proteininin DNA dizisi (Prasher ve ark., 1992)

Yeşil floresans proteini 238 aminoasit molekülünden meydana gelmektedir. GFP proteininin tek harfli amino asit simgeleriyle gösterilen dizini aşağıdaki gibidir (Şekil 2.3).

```
MASKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICT  
TGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIS  
FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN  
VYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH  
YLSTQSALS KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK
```

Şekil 2.3. Yeşil floresans proteininin amino asit dizisi (Prasher ve ark., 1992)

Yang ve ark. (1996), farklı bir protein katlanma özelliği gösteren yabancı tip *A. victoria* GFP'sinin kristal yapısını ortaya çıkarmışlardır (Şekil 2.4a). Bu yapı beta-fiçisi olarak adlandırılmıştır. Proteinin dışındaki 11 adet beta ipliği çok sıkı bir silindir oluşturmuştur. Üç boyutlu silindir yapı, yaklaşık 3 nm çapında ve 4 nm uzunluğundadır. Silindirin ortasındaki molekülün ışık vermesini sağlayan kromofor grubu çok özel bir şekilde dış etkenlere karşı korunmaya alınmıştır. Kromoforun, Ser-Tyr-Gly (serin, tirozin, glisin) dizisinden meydana geldiği belirlenmiştir (Şekil 2.4b) (Karaboz ve ark., 2004).



GFP'nin üç boyutlu yapısının çıkarılması ile ışığa yapan bu proteinler üzerinde bilimsel çalışmalar artmıştır. Günümüzde GFP ile füzyon yapılmış ilgili proteinlerin *in vivo* olarak yerleri, fonksiyonları, ekspresyonları belirlenebilmektedir. Daha etkili bir ekspresyon elde edebilmek amacı ile çeşitli araştırmacılar tarafından yabancı tip GFP'nin farklı mutantları oluşturulabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinde GFP geninin raportör gen olarak kullanılmaya başlanması ilk olarak model organizmalar olan *E. coli* bakterisi ve *Caenorhabditis elegans* nematodunda gösterilmiştir (Chalfie ve ark., 1994). Bugüne kadar GFP geni; bakteriler, mayalar, cıvık mantarlar, bitkiler,algler, *Drosophila*, zebra balığı ve memeli hücrelerinde eksprese edilmiştir (Karaboz ve ark., 2004). Alglerdeki ilk çalışmalar ise model organizma *Chlamydomonas reinhardtii*' de 1999 yılında Fuhrmann ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

C. reinhardtii alg türünde GFP ile ilgili yapılan bazı çalışmalar;

Araştırmacılar verimli bir ekspresyon gerçekleştirmek amacıyla *C. reinhardtii* nüklear genomunun yüksek G-C baz içeriğine uyumlu, kodon optimizasyonu gerçekleştirilmiş sentetik cGFP üretmişlerdir. GFP raportör gen olarak kullanılmak üzere zeocin bağlayıcı protein olan “ble” geni ile füzyon edilmiş ve bu da rekombinant proteinin görüntülenmesine imkan vermiştir (Fuhrmann ve ark., 1999).

Araştırmacılar hücre iskeleti proteini çalışmalarında, proteinlerin lokalizasyonunu in vivo gözlemleyebilmek için GFP kullanmışlardır (Ruiz-Binder ve ark., 2002; Schoppmeier ve ark., 2005).

Franklin ve ark., (2002) raportör gen olarak sentetik GFPct kasedini oluşturmuşlardır. rbcL5'- ve 3'-UTR'lerin kontrolü altında bu kasedin, kloroplastta rekombinant protein birikimini, optimize edilmemiş GFP eşliğinde ekspresyonu yapılan yabancı protein birikimine kıyasla 80 kat arttırdığını göstermişlerdir.

Zhangli ve ark. (2008) *C. reinhardtii*'de eksojenlerin ekspresyon seviyesini arttırmak için, yüksek verimli vektör oluşturmuşlardır. HSP70A-RBCS2 olarak adlandırılan kimerik promotörlerin kontrolü altında GFP geninin cam boncuk yöntemi ile transformasyonu sonucu nüklear genomda ekspresyonu sağlanmıştır.

2.2. Model Organizma *Chlamydomonas reinhardtii*



Şekil 2.5. *C. reinhardtii*'nin ışık mikroskopundaki görüntüsü (Anonim, 2014b)

C. reinhardtii, genetik, organellerin biyogenezi, fotosentez, flagella birleşmesi ve fonksiyonu, çiftleşme reaksiyonları ve gametogenez, hücre duvarı sentezi, fototaksi, sirkadiyen ritmi ve karbon, nitrojen ve sülfür metabolizması gibi hücre ve moleküler biyolojinin çeşitli çalışma konularının aydınlatılmasında kullanılmıştır (Şekil 2.5). Bu alg türü aşağıda belirtilen uygun özellikleri sayesinde güçlü bir model organizma olarak ortaya çıkmaktadır (Rochaix, 1995). Bu özellikler;

- generasyon süresinin kısa olması,
- laboratuvar koşullarında kültürü yapılmasının kolay ve ucuz olması,
- ökaryotik hücre tipinde ve mikroskobik olması,
- fototrofik, miksotrofik hem de heterotrofik olarak büyümesi,
- haploit kromozomlu olması,
- çok sayıda farklı mutant suş izolasyonunun yapılabilmesi,
- eksojen DNA'nın, nükleer, kloroplast, mitokondri genomlarının üçüne de transfer edilebilmesi,
- toksik olmaması ve virüs, prion gibi insan patojenleri içermemesi,
- klasik genetik analizlerine uyumluluğu,
- erişilebilir EST tabanına sahip olması şeklinde sıralanabilir (Shimogawara ve ark., 1997; Tural, 2005).

2.2.1. Taksonomi ve biyolojisi

Chlamydomonas cinsine ait 600'ün üzerinde tür tanımlanmış olsa da Harris (2009), açıkça *C. reinhardtii*' nin diğer türlerin arasında tek olduğuna dikkat çekmiştir. *C. reinhardtii*' nin sistematigi " www.algabase.org " veri tabanında, 02.07.2014 tarihindeki sistematik kategorizasyonuna göre aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

Domain: Eukaryota

Alem: Plantae

Şube: Chlorophyta

Sınıf: Chlorophyceae

Takım: Chlamydomonales

Aile: Chlamydomonadaceae

Cins: Chlamydomonas Ehrenberg

Tür: *Chlamydomonas reinhardtii* P.A.Dangeard (Guiry ve ark., 2014).

Chlorophyceae sınıfının temsilcisi *C. reinhardtii* yeşil algler içinde en iyi incelenmiş tek hücreli ökaryotik organizmadır. *C. reinhardtii* yabani tip suşu (137c) bilimsel amaçlarla ilk olarak Gilbert M. Smith tarafından 1945'te Amherst, Massachusetts yakınlarında topraktan izole edilmiştir (Harris, 2009).

C. reinhardtii, tipik olarak oval şekilli olup 10µm boyunda ve 3µm genişliğindedir. Hücre hacminin yaklaşık % 40'ını kaplayan büyük ve kadeh şeklinde olan tek bir kloroplasta sahiptir (Rochaix, 1995). Kloroplast hem klorofil a hem de klorofil b içerir. Karbondioksit fiksasyonu kloroplastın içinde yer alan pirenoid halkalarında gerçekleşir (Harris, 2009). Pirenoid, fiksasyondan sorumlu olan RUBISCO enzimini içerir. Pirenoidin varlığı, fotosentetik aktivite açısından gereklidir. Buna ek olarak depo ürünü olan nişasta sentezinde de rol oynar. Kloroplastın içinde ışığa duyarlı ve fototaksid görev alan göz noktası (stigma) vardır (Sineshchekov ve Govorunova, 2001).

Organizmada, yüksek bitkilerin olgun hücrelerinde görülen büyük merkezi bir koful bulunmaz. Kamçıların kaidesinin yakınındaki iki küçük kontraktıl koful ardışık ve ritmik olarak görev yapar. Osmotik regülasyondan sorumludurlar (Komsic-Buchmann ve ark., 2012).

Yüksek bitkilerden farklı olarak hayvanlar aleminde görülen hareketten ve çiftleşmeden sorumlu eşit uzunlukta iki kamçısı mevcuttur. 10-12 µm uzunluğundaki bu kamçılar hücrenin anterior (uç) kısmında bulunur (Harris, 2009). Kamçılarını, adeta kurbağalama şeklinde yüzebilme, ışığı ve besinleri optimum düzeyde alabilmek için de kullanır (Plucinak, 2013).

Yedi tabakalı hücre duvarı hidroksipiroline zengin glikoproteinlerden oluşur ve selüloz içermez (Harris, 2009).

C. reinhardtii'nin kuru ağırlığının %48'ini protein, %17'sini karbonhidrat ve %21'ini yağlar oluşturmaktadır (Becker, 2007).

2.2.2. Büyüme koşulları

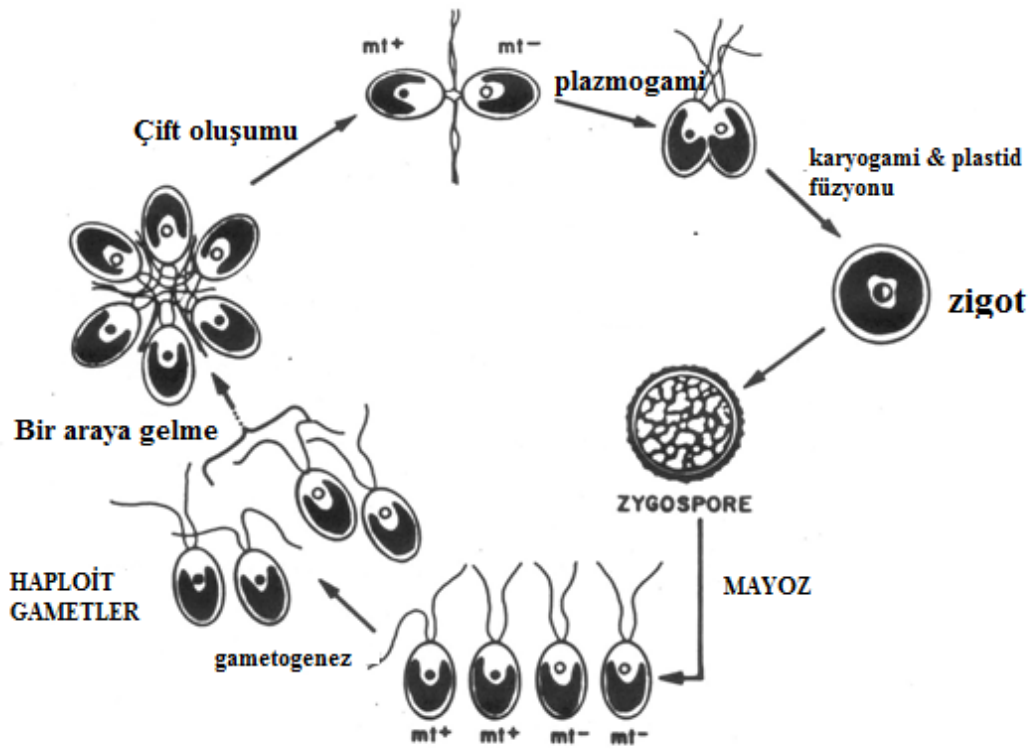
Yabani tip *C. reinhardtii* daha çok tatlı sularda ve toprakta yayılış gösterir. Laboratuvar koşullarında da steril katı veya sıvı besiyerinde kolayca yetişebilir (Mahan ve ark., 2005). En ideal besiyeri Tris Asetat Fosfattır. Bunun dışında ek vitamin veya kofaktör gerektirmeden büyüyebilir (Harris, 2009). Gelişimi için optimum sıcaklık 20°C - 36°C arasındadır. Yüksek bitkilerle kıyaslandığında 7-8 saat gibi çok kısa generasyon süresi vardır (Manuell ve Mayfield, 2006). Bu süre, devamlı aydınlatmalı ortamda ekstra hava ve CO₂ kabarcık (bubbling) desteği sağlanırsa daha da kısalabilir (Adams, 2011).

C. reinhardtii için potansiyel 3 farklı büyüme koşulu tanımlanmıştır. Bu yeşil alg türü fototrofik (tek karbon kaynağı CO₂ ve ışık) büyümenin dışında, içinde karbon kaynağı olarak sadece asetat bulunan ışıklı ortamda mikсотrofik ve karanlıkta heterotrofik (angiospermilerden farklı olarak Chlamydomonas'ta bulunan fotosentetik aparatın, ışık olmasa dahi klorofil sentezlemesi sayesinde) yaşayabilirler. Bu özelliği sayesinde fotosentetik aktivitesi olmayan çok sayıda mutantlar oluşturulabilmektedir (Davies ve Grossman, 1998).

2.2.3. Yaşam döngüsü

C. reinhardtii'nin yaşam döngüsünde haploit evre baskındır. Diploit olan tek evre yalnızca zigottur (Şekil 2.6). İdeal büyüme şartlarında alg, sadece mitozla çoğalır

ancak açlık, beslenme yetersizliği ve özellikle azot eksikliğinde eşeysel üreme hareketine geçer. Vejetatif hücreler, gamet haline farklılaşırlar. *C. reinhardtii*' de gametler artı ve eksi olmak üzere iki alt eşleşme tipindedir (Sager ve Granick, 1954). Zıt tipteki gametlerin karışımı, kamçıların etkileşimi gibi bir seri kompleks reaksiyon sonunda diploid zigot oluşumu ile gerçekleşir. Uygun çevresel koşullar geri geldiğinde oluşan zigot uyarılır ve mayoz geçirir. Bunun sonucunda iki (+) ve iki (-) eşleşme tipinde dört haploit hücre oluşur. Ardından bu hücreler vejetatif olarak büyümeye devam ederler (Rochaix, 1995).



Şekil 2.6. *C. reinhardtii*' nin yaşam döngüsü (Harris, 2009)

2.2.4. Genetik yapısı

Genetik yapısı iyi tanımlanmış *C. reinhardtii*, genom projesi yapılan ilk alg türüdür (Harris, 2009). Diğer fotosentetik ökaryotlar gibi *C. reinhardtii* tamamen sekanslanmış üç ayrı genetik sisteme sahiptir; nükleer, kloroplast, mitokondri (Rochaix, 1995). *C. reinhardtii* üç genomunda da transformasyon gerçekleştirilen tek fotosentetik organizmadır (Fuhrmann, 2002). Bunlar için özel transformasyon teknikleri geliştirilmiştir ve bunlar erişim ağına açılmıştır (Lefebvre ve Silflow, 1999). Buna ek

olarak hala Bu sistemlerdeki mutasyonlar melezlerde kolayca ayırt edilebilir, çünkü nükleer genler Mendel kurallarına göre ayrılır. Oysa kloroplast ve mitokondri genomları genellikle uniparental olarak iletilir. *C. reinhardtii* 'nin nükleer genom kompleksi 1.2 x 105 kbp olarak tahmin edilmektedir. Genetik harita 17 bağlantı grubuna yayılmış 148 lokusdan oluşmaktadır.

C. reinhardtii nükleer genom %64 GC içeriğine sahiptir. Bu yüzden kodon kullanımı, diğer yüksek yapılı bitkilerden büyük ölçüde farklıdır. Basit sekans dizilerini ve hareketli DNA parçalarını içerir.

Kloroplast, nükleer genomundan bağımsız olan otonom bir genetik sisteme sahiptir. Bu sistem genetik bilgiyi taşıyan DNA'yı ve tam bir protein sentezleme ünitesini içerir. Fotosentez ve genetik yapı ile ilgili genlerden sorumludur Ancak translasyon ünitesinin moleküler bileşenleri ortaklaşa olarak hem nükleer hem de kloroplastta bulunan genetik bilgiden kaynaklanır. Hücre ekspresyonu kloroplastta gerçekleşir. *C. reinhardtii* kloroplastı 204-kbp sirküler DNA içermektedir. Kloroplast DNA'sı diğer yüksek bitkilere nazaran daha büyüktür. Kloroplast DNA'sı A ve T bazları bakımından zengindir, bu yüzden DNA yoğunluğu nükleer DNA'dan daha düşüktür. Yaklaşık 100 gen içerir. Kloroplast genomu prokaryotik tipte olduğu için posttranslasyonel modifikasyonlar gibi kompleks mekanizmalardan yoksundur. Yapısındaki şaperonlar sayesinde yalnızca disülfid bağlarının oluşum basamağı gerçekleşebilmektedir. Kloroplastta birçok gen bir operonda transkribe edilir ve histon proteinleri içermez. Organel başına 80 kopya kpdNA'sı bulunur. Her birindeki DNA'nın uzunluğu 195 000 baz çiftidir. İlginç olarak *C. reinhardtii* kloroplast içinde bu çok kopyalı DNA molekülleri arasında genetik rekombinasyon görülmektedir (Mayfield ve ark., 2007).

C. reinhardtii mitokondrisi 15.8-kbp linear molekül içerir. Kloroplast genomu gibi birçok kopyası vardır. Replikasyonu nükleer DNA'sından sentezlenen enzimlere bağlıdır. Protein sentez işleminin ve hücre sel solunumun bileşenleri ortaklaşa nükleer ve mitokondriyal genlerinden medyana gelir (Hippler ve ark., 1998).

2.3. *C. reinhardtii*'de Gen Aktarım Yöntemleri

Nükleer, kloroplast ve mitokondri transformasyonları için geliştirilen yüksek verimli metodlar bu fotosentetik ökaryot organizmanın değerini büyük ölçüde

arttırmıştır. *C. reinhardtii* yeşil alg türüne gen aktarımında kullanılan bilindik tüm geleneksel metodların temeli, hücre zarında geçici olarak geçirgenliğe neden olmak ve canlı hücreye eksojen DNA moleküllerinin girmesini sağlamaktan ibarettir (Leon ve Fernandez, 2007; Gong ve ark., 2011). Çizelge 2.1. 'de farklı alg türlerinde kullanılan transformasyon yöntemleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Transformasyonu gerçekleştirilen bazı alg türleri (Griesbeck ve Kirchmayr, 2012)

TÜRLER	TRANSFOMASYON YÖNTEMLERİ	GENOM
YEŞİL ALG		
<i>C. reinhardtii</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
	Partikül Bombardımanı	Kloroplast
	Partikül Bombardımanı	Mitokondri
	Cam Boncuk (Glass Bead)	Nüklear
	Elektroporasyon	Nüklear
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Nüklear
<i>Dunaliella salina</i>	Elektroporasyon	Nüklear
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Polietilen Glikol	Nüklear
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Chlorella vulgaris</i>	Elektroporasyon	Nüklear
<i>Chlorella kesleri</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Haematococcus pluvalis</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Ostreococcus tauri</i>	Elektroporasyon	Nüklear
<i>Gonium pectorale</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Volvox carteri</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
DİATOM		
<i>Cyclotella cryptica</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Navicula saprophila</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Thalassiora weissflogii</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
<i>Chaetoceros sp.</i>	Partikül Bombardımanı	Nüklear
DİNOFLAGELLAT		
<i>Amphidinium</i>	Silikon Karpit Fiberleri	Nüklear
<i>Symbiodinium microadriaticum</i>	Silikon Karpit Fiberleri	Nüklear
KIRMIZI ALG		
<i>Cyanidioschyzon merolae</i>	Elektroporasyon	Nüklear
<i>Porphyridium spp.</i>	Partikül Bombardımanı	Kloroplast
EUGLENOFİT		
<i>Euglena gracilis</i>	Partikül Bombardımanı	Kloroplast

2.3. 1. Cam boncuk (Glass Beads)

C. reinhardtii transformasyonunda kullanılan ilk yöntemdir (Kindle, 1990). Maya transformasyonundan esinlenilerek basit ve verimli bir protokol geliştirilmiştir. Bu yöntem hücrelerin; eksojen DNA, cam boncuk ve PEG (polietilen glikol) varlığında vortekslenmesi esasına dayanır (Coll, 2006). Polimerik negatif yüklü olan PEG, DNA'yı protoplastların yüzeyinde çökeltilip endositozla alımını uyarır (Khan, 2010). Önemli nokta hücre duvarı uzaklaştırılmış mutant suş veya otolizin ile hücre duvarlarının degradasyonu gerçekleştirilmiş yabancı tip suş kullanmak gerekir (Potvin ve Zhang, 2010).

Boncukların çalkalanmasından sonra hücre canlılığındaki %25'lik düşüğe rağmen, nükleer transformasyonu verimliliği 10^3 transformant/ μg DNA olup *C. reinhardtii* kloroplastında transformasyon verimliliği 50 transformant/ μg DNA'dır (Kindle, 1990).

Bu yolla gen aktarımı ucuz ve kolaydır, verimli sonuçlar elde edilir. Nükleer genom transformasyonunda en çok tercih edilen yöntemdir (Leon ve Fernandez, 2007).

2.3. 2. Silikon karpitler (Silika iğneleri, SiC)

Hücreleri delmek için, cam boncuk yönteminde olduğu gibi benzer bir protokol uygulanır. Farklı olarak, cam boncuk yerine silikon karpitler kullanılır. Oldukça başarılı bir transformasyon yöntemidir. (Dunahay, 1993).

Bu yöntemin avantajlı yanı hücre duvarının uzaklaştırılmasına gerek olmamasıdır (Leon ve Fernandez, 2007). Hücre canlılığı nispeten korunur. Ancak düşük transformasyon verimliliği, yüksek maliyeti, temasının bazı sağlık sorunlarına yol açması, silikon karpitlerin kullanımını sınırlandırmıştır (Potvin ve Zhang, 2010).

2.3. 3. Mikrofırlatıcı partikül bombardmanı

Biyolistik (gen tabancası) olarak da bilinen bu metot DNA ile kaplanmış partiküllerin direkt olarak hücre içine aktarılmasını kapsar. Ateşleme mekanizmasından yararlanılarak yüksek derecede hızlandırılmış altın ya da tungsten (nötr) partiküller

aracılığıyla DNA hedef bölgelere sokulur. Helyum ya da azot gazı kullanılarak yüksek basınç ile hızlandırma sağlar. DNA'ların metal parçacıklara yapışması için CaCl_2 konsantrasyonu ya da spermidin kullanılmaktadır. Hücre içine girdikten sonra DNA'lar altın yada tungsten partüküllerinden ayrılırlar (Kikkert ve ark., 2005).

C. reinhardtii'de hem kloroplast (Boynton ve ark., 1988) hem de nüklear (Debuchy ve ark., 1989) genomuna gen aktarımında kullanılmasına rağmen çalışmalar, bu yöntemin kloroplast transformasyonunda kullanılmasının daha verimli olduğunu göstermektedir.

Genelde gen transferlerinde organizmaların hücre duvarı gen transferi işlemleri için engel niteliğindedir. Mikrofırlatıcı partikül bombardımanı ile hücre duvarını uzaklaştırmadan yabancı DNA'yı hücre içine aktarmak mümkündür. Silisli algler gibi hücre çeperi çok sağlam olan organizmalarda dahi uygulanabilir işlemdir (Apt ve ark., 1996).

2.3. 4. Elektroporasyon

İlk olarak Brown ve ark. (1991) tarafından kullanılan elektroporasyon işlemi, genlerin hücre içine sokulması, kısa zamanlı ve çok kuvvetli elektrik akımı uygulanarak hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması ile sağlanır. Yağ tabakalarını geçici olarak bozar ve membrandan geçişi kolaylaştırır. Yüksek verimli stabil transformantlar elde edilir. Hücre duvarının uzaklaştırılması elzem değildir (Leon ve Fernandez, 2007). Hücre duvarı inceltirilmiş mutant suşların yanı sıra hücre duvarı olan yabancı tip suşlarda da başarılı sonuçlar elde edilmiş bir yöntemdir (Yamano ve ark., 2013).

Transformasyon verimliliğine katkıda bulunan beş parametre test edilmiştir. Bunlar: sıcaklık, ozmolarite, elektrik koşulları (elektrik alan gücü, deşarj zaman sabiti) ve eksojen DNA'nın konsantrasyonu (Shimogawara ve ark., 1997). Bu parametreler optimize edildiği takdirde daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (Potvin ve Zhang, 2010).

2.3. 5. *Agrobacterium tumefaciens*

Toprakta doğal yaşayan çubuk şekilli gram negatif bakteri türü *Agrobacterium tumefaciens* pek çok dikotiledon bitki türünde “Kök Uru” hastalığına neden olan bir mikroorganizmadır. Yaralanmış dokudan organizmaya girerek tümör benzeri dokular oluşturur. Tümör oluşmasının nedeni olduğu Ti plazmitinin T-DNA bölgesinin bitki genomuna entegre etmesidir. Kök Uru hastalığına yol açma yeteneği bakteri hücresinde Ti (tümör uyarıcı) plazmitin varlığıyla ilişkilidir. Ti plazmitin dikkate değer bir özelliği enfeksiyondan sonra molekülün parçasının bitki DNA’sına entegre olmasıdır. Yeni oluşan bu parça T-DNA ‘dır (Kumar ve ark., 2004).

Agrobacterium temelli transformasyon, bitki hücreleri içine yabancı genlerin transformasyonu için *A. tumefaciens*’in genetik olarak modifikasyonunun Zambryski tarafından 1983’te ilk kez kullanımı rapor edildiğinden beri önemli derecede geliştirilmiştir. Vir sistem, T-DNA’yı sınırlandıran kısa yan tekrarlar arasındaki herhangi DNA’yı işler ve transfer eder ki bu da *Agrobacterium*’u verimli bir DNA aktarım metodu yapar (Potvin ve Zhang, 2010).

İlk olarak bu metod vasıtasıyla, *C. reinhardtii*’de, uidA (β -glucuronidase), GFP, ve hpt (hygromycin phosphotransferase) raportör genlerinin başarılı bir şekilde ekspresyonu sağlanmıştır. Cam boncuk ile çalkalama yöntemi ile karşılaştırıldığında 50 kat fazla transformant sayısı ile sonuçlanmıştır (Kumar ve ark., 2004).

2.4. Transformasyon Verimliliğini Etkileyen Faktörler

C. reinhardtii de yabancı genlerin ekspresyonları kolay olmamaktadır. Çünkü metilasyon yolu ile katılan genlerin susturulması, kodon uyumu, ektopik (anormal) etkenler, intron eksikliği veya diğer noncoding elemanları gibi engeller söz konusudur (Rochaix, 1995). Bunun yanı sıra uygun suş, promotör, raportör ve markör genlerin seçilmesi de ekspresyon düzeyini etkilemektedir (Hallman, 2007).

2.4.1. Kodon optimizasyonu

Diğer sistemlerde olduğu gibi, kodon optimizasyonu hem kloroplast hem nükleer rekombinant protein anlatımları için önemlidir. Biyoinformatik araçlarla nadir kodonlardan arındırma yapılabilmektedir. Wobble pozisiyonda nükleer genomda G veya C bazları tercih edilirken, kloroplast genomunda A veya T bazları tercih edilmektedir. Çalışmalarda GFP kullanılarak yapılan kodon optimizasyonu, GFP ile füzyon olan transgen protein birikimini nukleusta 5 kata kadar arttırırken (Fuhrmann ve ark., 1999), kloroplastta 80 katı kadar arttırabilmektedir (Franklin ve ark., 2002).

2.4.2. Promotör

Aktarılmak istenen genin organizmada ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici dizilerdir. Alglerde verimli transkripsiyon için kullanılan dört promotör vardır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Algal biyoteknolojide kullanılan bazı promotörler (Neupert ve ark., 2012)

Promotör	Gen Ürünü
RBCS2	Ribuloz -1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz küçük alt ünitesi
HSP70A/RBCS2	Isı şoku proteini A/ Ribuloz-1,5-bifosfat karboksilaz/oksijenaz küçük alt ünitesi
β - tub	β - tubulin
PsaD	Fotosistem I protein alt ünitesi

2.4.3. Markör

Vektörde seçicilik sağlayan “marker genler” bulunmaktadır. Bunlar, vektör taşıyan ve taşımayan konak hücreleri ayırmak için gereklidir. Genelde vektörlerde seçici gen olarak antibiyotikler kullanılmaktadır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Algal biyoteknolojide kullanılan bazı markörler (Neupert ve ark., 2012)

Markör Gen	Gen Ürünü	Seleksiyon Ajamı	Önerilen Konsantrasyon
<i>APHVIII</i>	Aminoglikozid 3'-fosfotransferaz	Paromomycin	10 µg/ml
<i>CRY1_1</i>	Ribozomal protein S14	Emetine	25 µg/ml
<i>BLE</i>	Zeocin-bağlayıcı protein	Zeocin	1.1 µg/ml
<i>APH7"</i>	Aminoglikozid fosfotransferaz 7"	Hygromycin	10 µg/ml
<i>ARG7</i>	Arjininosüksinat liyaz	Arjininsiz besiyeri	-
<i>NIT1</i>	Nitrat redüktaz	Nitrat içeren besiyeri	-

2.4.4. Raportör genler

Aktarılan genin konak organizmada ifade edilip edilmediğinin anlaşılmasına yardımcı olmak üzere kullanılan DNA parçalarıdır.

Transfer edilen belli genlerin konakta ifade edilip edilmedikleri çoğu zaman kolayca anlaşılammaktadır. Pek çok örnekte, aktarılan genin ürünü olan protein belirli koşullarda ve belirli hücre tiplerinde sentezlenmekte ve bu genlerin ürünleri her zaman kolaylıkla saptanabilecek bir enzimatik aktivite veya diğer fonksiyonel aktiviteler ile ilişkili olmayabilmektedir. Bu nedenle, gen aktarımı için kullanılan vektörlere ürününün kolaylıkla ayırt edilebileceği raportör genlerin yerleştirilmesi gerekebilmektedir (Serbest-Kobaner, 2006). Araştırmacılar tarafından kullanılmakta olan çeşitli raportör genler bulunmaktadır (Çizelge 2.4). Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı *E.coli* bakterisinden izole edilmiş olan, β -glukuronidaz enzimini kodlayan *gus* (*uidA*) genidir. "Gus" geninin ifadesi sonucu ürünler spektrofotometrik ve histokimyasal yöntemlerle belirlenebilmektedir. Ancak bu yöntem canlı hücre ve dokular için toksik ve tahrip edici olduğundan *in vivo* koşullarında gen ürününün fonksiyonlarını izlemede kullanılamamaktadır. Gözle gözlenilebilir ve sıklıkla kullanılan bir diğer raportör gen de Lusiferaz enzimini kodlayan, ateş böceğinden izole edilip klonlanan "luc" genidir. Lusiferin etkin maddesi, nakledilen organizmada fosforlu sarı ışık yansıtmaktadır. Fakat bu yöntem dışarıdan bir substrata (Lusiferin) ihtiyaç göstermektedir ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca ışığı yalnız çok düşük seviyelerde yaydığı için transgenik bitkilerin

seçiminde yaygın olarak kullanılmamaktadır. Son yıllarda 509 nm dalga boyunda yeşil parlak ışık veren yeşil floresans proteinini kodlayan (GFP) adlı raportör geni, gen transformasyonu çalışmalarında önemli bir yer kazanmıştır (Serbest-Kobaner, 2006).

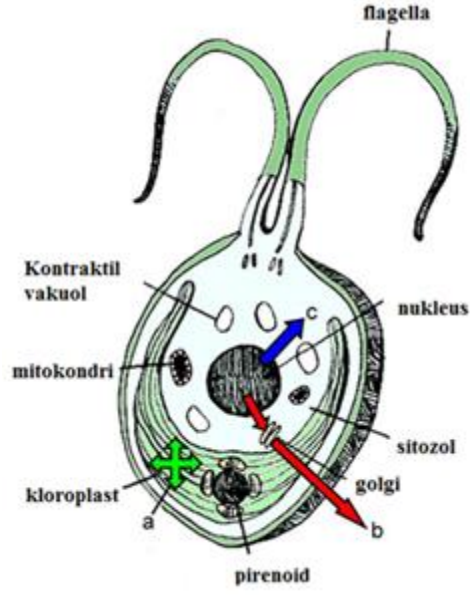
Çizelge 2.4. Algal biyoteknolojide en yaygın kullanılan raportör genler (Neupert ve ark.,2012)

Raportör Gen	Gen Ürünü	Tespit Yöntemi
GFP	Yeşil Floresans Proteini	Floresans Mikroskobu
YFP	Sarı Floresans Proteini	Floresans Mikroskobu
<i>R-Luc (Renilla reniformis</i> lusiferaz)	Lusiferaz	Lüminesans Detektörü
<i>G-Luc (Gaussia princeps</i> lusiferaz)	Lusiferaz	Lüminesans Detektörü

Transgen ifadesi seviyesi üzerine güçlü bir etkisi olmadığı için terminator bölgesi seçimi çok önemli değildir (Neupert ve ark., 2012).

2.5. Protein Sekresyonu

C. reinhardtii'de rekombinant proteinlerin hücrede birikim yerleri değişkenlik gösterebilir (Şekil 2.7). Kloroplast genomundan eksprese edilen protein, büyük ve tek olan kloroplastta birikir (Şekil 2.7a), posttranslasyonel modifikasyonlar ve sekresyon imkânsızdır. Nüklear genomundan eksprese edilen proteinler ise dış sinyal sekansı verilmezse sitozolde birikir (Şekil 2.7b). Eğer bir dış sinyal sekansı verilirse bu durumda protein, translokasyon ve işleme için endoplazmik retikuluma gönderilir. Daha sonra paketlenme ve hücre dışına salgılanmak için golgi aparatına transfer edilir (Şekil 2.7c). Kloroplastın aksine nüklearda üretilen rekombinant proteinler posttranslasyonel mekanizmalar sayesinde modifiye edilebilir (Specht ve ark., 2010).



Şekil 2.7. *C. reinhardtii*'de protein sekresyon yerleri (Specht ve ark., 2010)

2.6. *C. reinhardtii*'de Rekombinant Çalışmalar

C. reinhardtii ile ilgili yapılan çalışmalar Çizelge 2.5'te özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. *C. reinhardtii* ile gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik çalışmalar (Cadoret ve ark., 2012; Gregory ve ark., 2012; Rasala ve ark., 2012; Pourmir ve ark., 2013)

Eksprese Edilen Gen	Fonksiyonu	Uygulama Alanı	Aktarıldığı genom	Transformasyon tekniği	Ekspresyon Düzeyi
HSV8-1sc (Herpes Simpleks Virus)	Sinir hücrelerine yerleşen bu virüs, birçok insanda görülen uçuk sebebidir. Bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlarda etkin hale geçer. Uçuk virüsü, bulaşıcıdır.	Pasif bağışıklık için antikor. Eksprese edilen ilk memeli antikor	Kloroplast	Biyolistik	Tespit edilebilir
CTB-VP1 (Kolera Toksini B Alt Ünitesi- Ayak Ve Ağız Hastalığı Virüsü)	Önemli hastalık ajanı olan bu virüs hayvanlarının ağızlarında ve bacaklarında kabarcıklara neden olur. Çiftlik hayvanları arasında oldukça salgın bir hastalıktır.	Ayak ve ağız hastalığı virüsüne karşı aşı	Kloroplast	Biyolistik	%3 TSP
HSV8-scFv (Klasik Tek Zincir Antikor)	Sinir hücrelerine yerleşen bu virüs, birçok insanda görülen uçuk sebebidir. Bağışıklık sisteminin zayıfladığı durumlarda etkin hale geçer. Uçuk virüsü, bulaşıcıdır.	Farmakolojik, klasik tek zincir antikor	Kloroplast	Biyolistik	%0.5 TSP
hMT-2 (İnsan Metallothionin 2)	Metallothionin proteinleri (MT) sistein (Sis) amino asit içeriği yüksek, ağır metalleri bağlayabilen, düşük moleküler ağırlıklı, çeşitli hücre tiplerinde sentezlenen ve enzimatik işlevi olmayan proteinlerdir. Aynı zamanda anti radyasyon etkisine sahiptir.	Farmasötik, UV koruma	Kloroplast	Biyolistik	Tespit edilebilir

Çizelge 2.5. (Devam) *C. reinhardtii* ile gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik çalışmalar (Cadoret ve ark., 2012; Gregory ve ark., 2012; Rasala ve ark., 2012; Pourmir ve ark., 2013)

hTRAIL (Tümör Nekroz Faktör ile İlişkili Apoptozisi Uyarıcı Ligand)	TRAIL, kanser hücrelerinin yok olmasında etkilidir, fakat normal hücreler üzerine herhangi bir etkisi yoktur.	Farmasötik	Kloroplast	Biyolistik	~ %0.67 TSP
CSFV-E2 (Klasik Domuz Vebası - E2 Viral Protein)	Pestivirus cinsinden bir virüs bu hastalığa neden olur. Deri lezyonlarına ve ateş klinik belirtileridir.	Klasik domuz vebası virüsüne karşı aşı	Kloroplast	Biyolistik	~% 2TSP
hGAD65 (Diabetle İlişkili Glutamik Asit Dekarboksilaz)	Otoimmün (tip1) diabet olasılığının değerlendirilmesi, tip 1 ve tip 2 diabet arasında ayırıcı tanı yapılması ve bazı otoimmün nörolojik hastalıkların araştırılmasında ihtiyaç duyulur.	Tip 1 diyabet hastalığına karşı aşı	Kloroplast	Biyolistik	~%0.3 TSP
ARS2-crEpo-his6 (İnsan Eritroprotein ARS2 İle Birleştirilmiş)	Öncül kırmızı kan hücrelerinin olgunlaşması ve çoğalması	Anemi tedavisinde	Kloroplast	Biyolistik	100lg/1 culture
83K7C (Antrax Koruyucu Antijen 83'e Karşı İnsan Monoklonal Antikoru)	Şarbon hastalığı	Pasif bağışıklık için antikor	Kloroplast	Biyolistik	%0.01 dry algal biomass
IgG1 (Fare Ve İnsan Antikoru)	İnsanlarda ve farelerde bulunan immunoglobulin G alt sınıfı antikorudur. Kanda ve doku sıvısında bulunan ve vücudu patojenik enfeksiyonlara karşı koruyan antikor izotipidir. Hayvanlarda şarbonun etkilerini bloke eder.	Terapotik monoklonal antikor üretimi.	Kloroplast	Biyolistik	1 g kuru alg dokusunda 100 µg saflaştırılmış protein

Çizelge 2.5. (Devam) *C. reinhardtii* ile gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik çalışmalar (Cadoret ve ark., 2012; Gregory ve ark., 2012; Rasala ve ark., 2012; Pourmir ve ark., 2013)

VP28 (Beyaz Benek Sendromu Virüsü Protein 28)	Siyah kaplan karidesi beyaz benek sendromu virüsü enfeksiyonuna karşı anti serum olarak görev yapar.	Oral aşı	Kloroplast	Biyolistik	~%10.5 TSP
CTB-D2 (Kolera Toksini B)	<i>Vibrio cholerae</i> tarafından salınan, şiddetli ve sulu ishale neden olan protein kompleksi. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un D2 fibronektin bağlayıcı domainine füzyon yapılmıştır.	<i>Staphylococcus aureus</i> bakterisine karşı oral aşı	Kloroplast	Biyolistik	%0.7 TSP
10NF3, 14FN3 (Fibronektin)	10. ve 14. İnsan fibronektin domeni, potansiyel antikor taklitçisi.	Terapötik	Kloroplast	Biyolistik	14FN3:% 3 TSP 10FN3: Tespit edilebilir
M-SAA-Interferon β 1	Virüslere ve kontrolsüz hücre proliferasyonuna karşı etkilidir. (kansere)	Multipl skleroz MS hastalığı tedavisi	Kloroplast	Biyolistik	Tespit edilebilir
Proinsulin	Proinsülin, insülin hormonunun öncülü olarak pankreastan bir miktar salgınır ve insülin aktivitesine sahip değildir.	Tip 1 diyabet hastalık tedavisinde	Kloroplast	Biyolistik	Tespit edilebilir
VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)	Kan damarı farklılaşmasını uyarır (anjijogenez)	Akciğer amfizemi ve depresyon tedavisinde	Kloroplast	Biyolistik	%2 TSP
HMGB1 (Yüksek-Mobiliteli B1 Protein Grubu)	En önemli kromatin proteinleri arasında yer alır. Nükleozom, transkripsiyon faktörleri ve histonlar ile ilişkilidir.	Kanser adjuvanı	Kloroplast	Biyolistik	%2.5 TSP

Çizelge 2.5. (Devam) *C. reinhardtii* ile gerçekleştirilen bazı biyoteknolojik çalışmalar (Cadoret ve ark., 2012; Gregory ve ark., 2012; Rasala ve ark., 2012; Pourmir ve ark., 2013)

Pfs25 (<i>Plasmodium falciparum</i> yüzey proteini)	<i>Plasmodium</i> cinsi protozoa'nın enfeksiyonu ile meydana gelen sivrisinek kökenli hastalıktır.	Malarya yayılmasını inhibe eden antikor üretimi	Kloroplast	Biyolistik	0.5% TSP
Xylitol	Beş karbonlu şeker alkolü olup, besin ve şekerleme endüstrisinde yapay tatlandırıcı olarak kullanılır.	Sukroz kadar tatlı olduğu için diabet hastaları tarafından sukrozun yerine kullanılır.	Kloroplast	Biyolistik	0.05 Xylitol / g xylose
Ksilanaz 1	Bitki hücre duvarının önemli bileşenlerinden biri olup hemiselülözü, ksiloze dönüştüren lineer polisakarittir.	Kağıt hamuru ve kağıt yapımında kullanılır.	Kloroplast	Elektroporasyon	Tespit edilebilir

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışması için kullanılan cihaz ve kimyasallar Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikroalg Kültür Laboratuvarı ve Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Biyoteknoloji Araştırma Laboratuvarı imkanlarıyla gerçekleştirilmiştir.

Bu cihaz ve kimyasalların listeleri aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Kullanılan cihazlar

“ARÇELİK”MD500 Mikrodalga fırın,
“BIORAD” DNA Engine, PCR makinesi,
“BIORAD” Güç kaynağı (SDS ve agaroz için),
“BIOSAN” Bio TDB-100 Termostatlı Blok Isıtıcı,
“BIOSAN” CombiSpin FVL 2400N, Spin Cihazı,
“BIOSAN” ES 20, Çalkalayıcı İnkübatör,
“GEL LOGIC 200” Agaroz jel fotoğraf makinesi,
“HETTICH” Mikro 22R Santrifüj,
“HETTICH” -80 Dondurucu,
“HMC-HIRAYAMA veya HICLAVE HV-50L” Otoklav,
“VARIAN CARRY 50” UV/VIS Spektrofotometresi,
“MEMMERT” Etüv,
“SONICS (VCX130)” Sonikatör
“SYNGENE” SYTC/1422, UV Gösterici,
“UĞUR” Dikey Soğutucu +4°C,
“VELP SCIENTIFICA” ARE, Isıtıcı-Magnetik Karıştırıcı,
“VESTEL” GTP 455A, Buzdolabı,
“VISION” VS 30 000i, Yüksek Hızlı Santrifüj,
“VISION” Kar makinesi,
“VWR” Himac CT 15E, Santrifüj,
“VWR” Vorteks Cihazı,

“ZHICHENG” ZHWY-111C, alkalayıcı İnkübatör,
“SANYO” İklİmlendirme dolabı
“EPPENDORF EPORATOR”, Elektroporator,

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

LB Broth Base “Invitrogen- lennox L Broth Base”
Agar “BD BactoTM Agar”
KCl “Sigma”
CaCl₂.2H₂O “Carlo Erba”
KCH₃COO “Merck”
DMSO “Merck”
Ampisilin “Sigma Aldrich”
Trypton “BD- BactoTM”
NaCl “Tekkim”
Agaroz “Bioron”
Etidyum bromür “ICN”
Akrilamid “Amresco”
SDS “Serva”
APS“Biorad”
TEMED“Biorad”
Tris “Sigma Aldrich”
HCl “Merck”
MgCl₂ “Riedel de Haën”
MgSO₄.7H₂O “Riedel de Haën”
Etanol “Merck”
Metanol “Merck”
Plazmit DNA saflaştırma kiti “EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps”
PCR ürünleri temizleme kiti “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification ”
Taq DNA polimeraz “Qiagen”
KpnI “Promega”
XbaI “Takara”

ScaI “Takara”
Tampon Multicore “Promega”
BSA “Promega”
T4 DNA ligaz “Promega”
T4 DNA ligaz tamponu “Promega”
Komasi mavisi “Sigma Aldrich”
Şırınga filtresi “Sartorius / Minisart”
TAP “Invitrogen”
Hygromycin B “Invivo Gen”

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

- **LB çözeltisi (Luria-Bertani):** 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base 1 l suda çözüldü. Hazırlanan 1 l’lik çözelti 400’er ml olacak şekilde 2 tane stok şişesine alındı ve üzerine 6 g agar ilave edilip karıştırıldı, otoklavlandı. Kalan LB çözeltisi yaklaşık 4 ml olacak şekilde deney tüplerine konuldu ve ağız kısımları alüminyum folyo ile kapatıldı, otoklavlandı. 20 g LB (Luria-Bertani) Broth Base, 10 g maya ekstraktı, 10 g tripton, 5 g NaCl içeriğine sahiptir.
- **TAP-Agar çözeltisi:** 4 g Bactoagar 250 ml TAP (Tris-Acetate-Phosphate) içersinde çözüldü. Hazırlanan %1,5’luk çözelti otoklavlandı. Ardından petrilere döküldü.
- **FSB çözeltisi:** 7,4 g KCl, 7,5 g CaCl₂.2H₂O, 100g gliserol, 10 ml 1M (pH=7,5) KCH₃COO alınarak pH=6,2’ye ayarlandı ve hacim 1 l’ye tamamlandı. Otoklavlandı.
- **Ampisilin:** 1g ampisilin alınarak 10 ml steril suda çözüldü. Enjektöre alınarak; nitro-selüloz membrandan süzülerek 1 ml olacak şekilde ependorf tüplerine alındı ve dondurucuda saklandı.
- **Hygromycin:** 100 mg/ml solusyon 100 µl olacak şekilde ependorf tüplerine alındı ve dondurucuda saklandı.
- **Agaroz Elektroforez Jeli:** 1 g agaroz üzerine 100 ml 1x TAE tamponu eklendi ve mikrodalga fırında eritildikten sonra üzerine 5 µl etidyum bromür eklendi ve kasete döküldü.

➤ **SDS Elektroforez Jeli:**

Alt Tampon: 182 g Tris (1,5 M), 4 g SDS(%0,4) 1L distile suda çözülerek pH 8,8 olarak ayarlandı.

Üst Tampon: 60,5 g Tris (1,5 M),4 g SDS(%0,4) 1L distile suda çözülerek pH 6,6-6,8 olarak ayarlandı.

Yürütme jeli: 2,7 ml %40 akrilamid, 2,25 ml alt tampon, 4 ml su, 50 µl %10 APS ve 20 µl TEMED.

Yükleme jeli: 0,35 ml %40 akrilamid, 1 ml üst tampon, 2,55 ml su, 50 µl %10 APS ve 10 µl TEMED. Tüm maddeler katıldı ve en sona TEMED eklenip kasete döküldü. Yürütme jeli polimerleştikten sonra üzerine yükleme jeli döküldü ve polimerleşmesi beklendi.

Elektroforez Tamponu(1X): 3 g Tris, 14,4g Glisin, 1g SDS bileşikleri bir miktar distile suda çözülür ve son hacim 1 L olacak şekilde distile su eklenerek hazırlanır.

SDS Örnek Yüklem Tamponu (5X): 0,6 mL 1M Tris-HCl (pH 6,8), 5 mL Gliserol (%50), 2 mL %10'luk SDS, 0,5 mLβ-ME, 1 mL %1'lik Bromfenol mavisi ve 0,9 mL distile su karışımından meydana gelir.

SDS Jel boyama (Staining) Solüsyonu: 0,5 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450 mL metanol içerisinde çözülüp filtrekağıdından süzöldükten sonra, karışımın üzerine 100 mL asetik asit ve 450 ml distile su eklenerek hazırlanır.

SDS Jelden Boyayı Geri Alma (Destaining) Solüsyonu: 100 mL metanol, 100 mL asetik asit ve 800 mL distile su karışımından oluşur.

➤ **Amonyum Persülfat (APS- %10):**0,5g APS 5mL distile su içerisinde çözöläerek hazırlanır.

➤ **100mM Tris/HCl Tamponu (100mM NaCl pH:7.5):** 12,115 g tris alınarak bir miktar suda çözüldü. pH derişik HCl ile 7,5'e getirildi. 2.922 g NaCl (50 mmol) eklendi ve hacim su ile 1 l'ye tamamlandı.

3.2. Yöntem

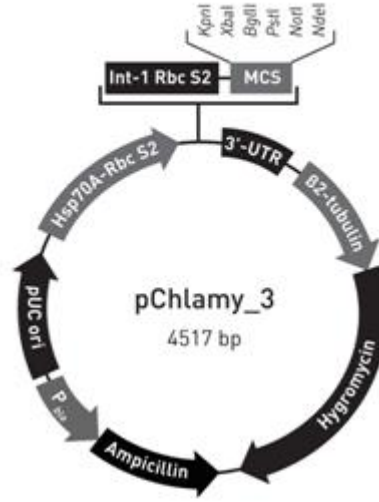
C. reinhardtii mikroalg türünün nükleer genomuna, elektroporasyon vasıtasıyla GFP (Yeşil Floresans Proteini) geninin transfer edilmesi hedeflenmiştir.

3.2.1. PCR işlemleri için GFP genlerine ait primerlerin tasarımı

Öncelikle klonlama işlemlerinde *C. reinhardtii* için geliştirilen ticari vektörlerden biri olan ve rekombinant protein üretimi için kullanılan pChlamy_3 (Şekil 3.1) vektörü seçildi.

pChlamy_3 vektörüne klonlamak üzere GFP proteinine ait DNA parçalarının çoğaltılması için PCR işleminde NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanından elde edilen proteine ait sekans dizilerinden yararlanarak GFP'e ait ileri ve geri 33-34 baz uzunluğundaki primerler şu şekilde dizayn edildi.

- İlk olarak GFP proteinine ait DNA sekansları ele alındı.
- pChlamy_3 vektörüne ait klonlama bölgesinde yer alan restriksiyon enzimleri tespit edildi (Şekil 3.2). Bu enzimlerin bizim klonlamak istediğimiz GFP proteinin DNA'sı içerisinde olup olmadığı <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> sitesinde bulunan "NEB cutter V2.0" programı kullanılarak araştırıldı ve benzersiz (unique) olan enzimlerden uygun olanları primer tasarımı için seçildi (Anonim, 2012).
- İleri ve geri primerleri için minimum 30-35 baz çifti (bç) GFP proteinin DNA'sından birebir olarak alındı ve bu diziye restriksiyon enzimlerinin dizileri ilave edildikten sonra 5' uçlarına fazladan 6 ya da 7 adet T eklenerek hem enzimin optimum kesmesi için gerekli olan DNA dizisi, enzimin tanıma bölgesi baz alınarak bir miktar uzatıldı, hem de bu sayede primerlerin erime sıcaklıkları düşürülerek optimize edildi.



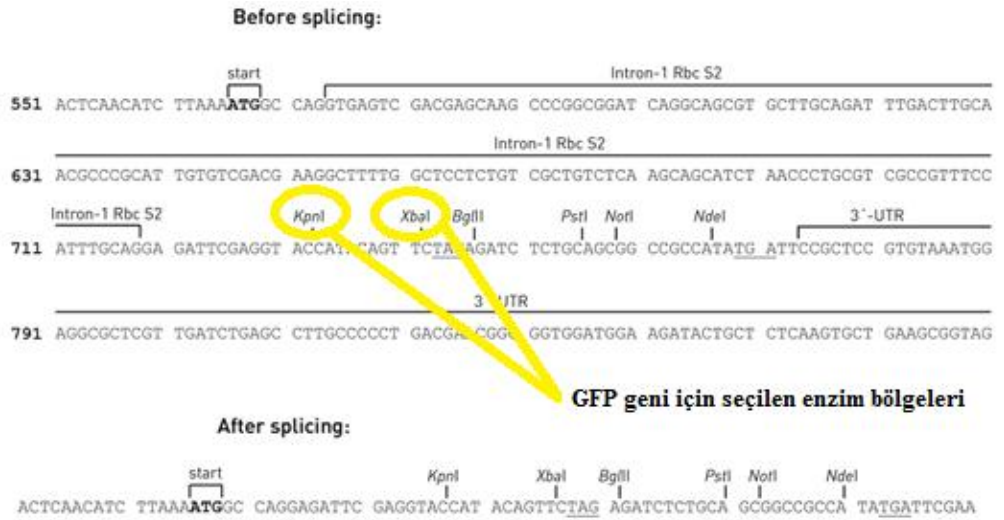
Features of pChlamy_3 Vector

4517 nucleotides

Hsp70A-Rbc S2 promoter:	70-565
Intron-1 Rbc S2:	574-718
Multiple cloning site:	728-770
3'-UTR:	774-1007
B2-tubulin promoter:	1014-1326
Hygromycin resistance [<i>aph7</i>]:	1327-2637
Ampicillin resistance gene [<i>bla</i>]:	2836-3696 [c]*
<i>bla</i> promoter [<i>P_{bla}</i>]:	3697-3748 [c]
pUC origin:	3794-4467

*[c]: complementary strand

Şekil 3.1. pChlamy_3 vektörünün dairesel haritası (Invitrogen User Guide'dan alınmıştır.)



Şekil 3.2. pChlamy_3 vektörünün poli-linker bölgesinin restriksiyon enzimleri ile birlikte verilen DNA dizisi (Invitrogen User Guide)

GFP DNA dizisinin PCR ile çoğaltılıp (pChlamy_3) vektörüne klonlanması için tasarlanan primerler;

1. GFP- KpnI sense primer :

5'- TTTTTTGGTACCATGGGCAGCAGCCATCATCAT -3' 33 bç Tm= 60°C

2. GFP- XbaI reverse primer:

5'- TTTTTTCTAGATTATTTGTAGAGCTCATCCATG -3' 34 bç Tm= 58°C

3.2.2. pChlamy_3 vektörünün, konak DH5α ile çoğaltılması

Invitrogen firmasından satın alınan pChlamy_3 vektörü daha sonraki çalışmalarda kullanabilmek için DH5α *E. coli* suşunda klonlanılarak çoğaltılmıştır.

DH5α Hücrelerinin Transformasyonu

Bu işlem için FSB' li komponent DH5α hücreleri hazırlanıp transformasyona tabi tutuldu.

FSB'li Kompetent Hücre Hazırlanması

- +4 °C 'de DH5α hücrelerinin bulunduğu petrilere 1 koloni alınarak 4ml'lik LB içeren tüplere inoküle edilen kültür 1 gece boyunca çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakıldı.
- Daha sonra 4 ml'lik LB tüplerine inoküle edilen DH5α kültüründen 1 ml alınarak 2 tane steril erlene eklendi. Üzerine 50 ml LB (Luria Bertani) eklenerek; 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Optik dansite, 600 nm'de absorbans yaklaşık olarak 0,7 olduğunda erlenler inkübatörden alındı ve +4 °C 5 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelet üzerine +4 °C'de saklanan soğuk FSB (dondurulmuş saklama tamponu) çözeltisinden 50 ml eklendi ve pellet tamamen çözünene kadar vortekslendi. Ardından 1 saat buz banyosunda inkübe edildi.

- 1 saatin ardından; +4 °C, 4 000 rpm'de 10 dk santrifüjlendi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 8 ml soğuk FSB çözeltisi eklendi ve vortekslemeden pellet çözüldü.
- Pelletin tamamı çözününce üzerine 560 µl DMSO eklendi ve 3 saat buza gömüldü.
- 3 saatin ardından kompetent hücre transformasyon için hazır hale geldi (Hanahan, 1983).

Transformasyon

- Transformasyon için hazır hale getirilmiş buz banyosu içindeki DH5α kompetent hücrelerinden 200'er µl alınarak gerekli sayıda ependorfa pipetleme yapıldı. Üzerine 2 µl pChlamy_3 eklendi ve hassas bir şekilde karıştırılarak 1 saat buz banyosunda bekletildi.
- 1 saatin ardından 2 dk 42 °C'de ısı şokuna maruz bırakıldı.
- Tekrar buza gömülerek 5 dk inkübe edildi.
- Üzerine 300 µl LB sıvı besiyeri eklendi ve yarım saat 37 °C ve 250 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Yarım saatin ardından hücreler ampisilinli petriye yayma yöntemi ile ekildi ve 37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı (Hanahan, 1983).

3.2.3. Plazmit DNA saflaştırılması

Vektör olarak kullanımları ve moleküler klonlama için plazmit DNA'lar, "EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps" kiti kullanarak üretici firmanın protokolüne göre aşağıdaki şekilde saflaştırıldı.

37 °C'de 1 gece inkübasyona bırakılmış olan petrilerdeki koloniler 100 µM/ml konsantrasyondaki Ampisilinden 4'er µl içeren 4 ml'lik steril LB sıvı besiyeri tüplere inoküle edildi. Her bir tüpe bir koloni inoküle edilmesine dikkat edildi. LB sıvı besiyeri ve plazmit DNA taşıyan hücreleri içeren kültürler 37 °C'de gece boyu inkübe edildi.

- Gece boyu inkübe edilen kültür ependorflara aktarıldı Mikrosantrifüj ile 12 000 rpm'de 2 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

- Üzerine 100 µl Solution I eklendi. 1 dk boyunca ependorflar vortekslendi. Pelet çözüldü.
- Üzerine 200 µl Solution II eklendi ve ependorflar vorteks kullanılmadan 4-6 kez manuel olarak alt üst edildi. 1dk boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Üzerine 350 µl Solution III eklendi ve birkaç sefer alt-üst edilerek karıştırıldı. 1 dk inkübe edildi.
- Ependorf tüpleri mikrosantrifüj kullanılarak daha sonra 12 000 rpm’de 8 dk santrifüjlendi. Ardından süpernatant kısım pipetle alındı. Süpernetantın pelet içermemesine dikkat edildi
- Alınan süpernatant, spin kolonlara transfer edildi. 10 000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- 750 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 10 000 rpm’de 2 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı. Daha sonra bu basamak tekrar uygulandı.
- Kolonda çözelti kalmış olabileceğinden kolon boş olarak 10 000 rpm’de 1 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- Kolonlar yeni ependorflara aktarıldı.
- Kolonların ortasına 50+ 20 µl “nükleaz içermeyen su” verildi ve 1 dk boyunca 50 °C’de inkübe edildi.
- Ardından 10 000 rpm’de 2 dk santrifüjlenerek, plazmit DNA’lar saflaştırıldı ve -20 °C’de dondurucuda saklandı.

3.2.4. PCR ile GFP DNA’sının amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kalıp olarak daha önce laboratuvarımızda konstrükt edilen pETGFP plazmit vektörü (pETGFP, *E. coli* suşundan elde edilen pET28 adlı boş vektörle pBad GFP adı verilen ve GFP genini taşıyan vektörün *Nde* I ve *EcoR* I enzimlerinin kesilmesi sonucu elde edilen GFP kodlayan DNA parçasının ligasyonu ile elde edilmiştir) GFP genini amplifiye etmek için kalıp olarak kullanıldı (Bilen, 2010).

PCR işlemleri için yüksek saflıktaki oligonukleotidler DNaz içermeyen saf su ile PCR işlemlerinde kullanılacak olan konsantrasyonda seyreltildi ve aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı.

PCR

PCR karışımı

- 28,5 µl H₂O (DNAz & RNAz free)
- 5 µl 10x PCR reaksiyon tamponu
- 4 µl MgSO₄ (25mM)
- 3 µl dNTP karışımı (10 mM)
- 4 µl primer “sense” (5µM)
- 4 µl primer “reverse” (5µM)
- 1 µl kalıp DNA (pETGFP)
- 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl)

Toplam reaksiyon hacmi 50 µl olan PCR tüpleri PCR işlemi için hazırlanmıştır. PCR işleminde; sıcaklık değerleri her bir döngü için aşağıdaki gibi ayarlandı ve toplamda 30-35 döngüyle PCR işlemi tamamlandı.

1. Denatürasyon: 95 °C
2. Primer Annealing: 55 °C
3. Ekstensiyon: 72 °C

3.2.5. PCR ürünlerinin saflaştırılması

PCR işlemi gerçekleştirildikten sonra, PCR ürünleri PCR karışımından “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification ” kiti kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak saflaştırıldı.

- PCR ürünleri 1.5 ml'lik ependorflara aktarıldı ve üzerine ürünlerin hacminin 3 katı kadar Binding Buffer I eklendi.
- Bu karışım spin kolonlara transfer edilirdi ve oda sıcaklığında 2 dk bekletildi. Daha sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- 750 µl yıkama çözeltisi kolona verildi ve 10 000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı. Ardından bu basamak tekrar uygulandı.
- Kolonda çözelti kalmış olabileceğinden kolon boş olarak 10 000 rpm'de 1 dk santrifüjlendi ve elüat atıldı.
- Kolonlar yeni ependorflara aktarıldı.

- Kolonların ortasına 50+ 20 µl “nükleaz içermeyen su” verildi ve 2 dk boyunca 50 °C’de inkübe edildi.
- Ardından 10 000 rpm’de 1 dk santrifüjlenerek, saflaştırılmış ürünler -20 °C’de dondurucuda saklandı.

3.2.6. Agaroz jel elektroforezi

PCR işlemi yapıldıktan sonra oluşan PCR ürünleri aşağıda açıklandığı şekilde %1’lik agaroz jelde yürütüldü ve görüntüledi. 1 gr agaroz 100 ml 1 X TAE tamponu içine alındı ve mikrodalga fırında hafif hafif kaynatılıp karıştırılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlandı, böylece %1’lik agaroz jeli hazırlanmış oldu. Agaroz, tampon içinde çözüldükten sonra elle tutulabilecek sıcaklığa düştüğünde 1 µl etidyum bromür ilave edildi, elde edilen bu homojen karışım jel tabakasına döküldü ve kuyucukların oluşması için jel sistemine tarak yerleştirilerek donması beklendi. Donma gerçekleştikten sonra tarak oluşan kuyucuklara zarar vermeyecek şekilde ortamdan dikkatlice uzaklaştırıldı ve jel elektroforez tankına yerleştirildi. 1 X TAE tamponu jelin üzerini tamamen örtünceye kadar tanka aktarıldı. PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 10’ar µl PCR ürününün, 5 µl “Orange G DNA yükleme boyası” ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. 110 mA’de 30-45 dk süreyle DNA’lar yürütüldü ve son olarak jel bir UV transillüminatör kullanılarak görüntüledi. Jel Dokümantasyon sistemi kullanılarak (Kodak) fotoğraflandı.

Markör olarak; “1kb (0.5mg DNA/ml 0.05 mg) λ/ EcoR I / Hind III DNA ladder” kullanıldı. Örneğimizden elde edilen DNA bandı, kendi hizasındaki markörün DNA bandı ile karşılaştırılarak bantın hedeflenen DNA ile aynı büyüklükte olup olmadığı analiz edildi.

3.2.7. Restriksiyon enzimleri ile kesim

GFP PCR ürünü ve pChlamy_3 vektörü restriksiyon enzimleri ile kesilerek ligasyon için yapışkan uçlar oluşturuldu.

Saflaştırılan PCR Ürününün (GFP) Kesilmesi

Enzim kesiminde toplam hacim PCR ürünü için 30 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.1). Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37 °C’de sıcak su banyosunda dört saat inkübasyona bırakıldı. Her saat başında reaksiyon tüpleri hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edildi.

Çizelge 3.1. GFP PCR ürününün restriksiyon enzim kesimi için gereken madde miktarları

Saf PCR ürünü (GFP)	20 µl
Multicore (Promega)	3 µl
10xBSA (Promega)	3 µl
KpnI (Promega)	2 µl
XbaI (Takara)	2 µl

pChlamy 3 vektörünün kesilmesi

Enzim kesiminde toplam hacim vektör DNA’sı için 30 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı (Çizelge 3.2). Ardından mikrosantrifüjle 3-5 saniye hızlıca döndürülerek 37 °C’de sıcak su banyosunda 4 saat inkübasyona bırakıldı. Her saat başında reaksiyon tüpleri hızlıca döndürülerek reaksiyona devam edildi. 2. Saat sonunda vektör DNA’sının bulunduğu reaksiyon tüplerine 1’er µl KpnI ve XbaI eklendi, tüpler hızlıca döndürülerek 37°C’de inkübasyona bırakıldı. İlk kesimde olduğu gibi bu kesimde 4 saatte gerçekleştirildi

Çizelge 3.2. pChlamy_3 vektörünün restriksiyon enzim kesimi için gereken madde miktarları

pChlamy_3 vektörü	15 µl
Multicore (Promega)	3 µl
10xBSA (Promega)	3 µl
KpnI (Promega)	2 µl
XbaI (Takara)	2 µl
Saf su	5 µl

Kesim sonrasında ürünler “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification” kiti kullanılarak bölüm 3.2.5’teki protokole göre saflaştırıldı.

3.2.8. DNA ligasyonu

Kesilen plazmit DNA'ları ve PCR ürünleri Promega T4 DNA Ligaz kullanılarak birleştirildi. Çizelge 3.3'te belirtildiği şekilde yapılan pipetlemenin ardından, hazırlanan ligasyon karışımı +16 °C'de 16-18 saat süresince inkübasyona bırakıldı, transformasyon işlemlerinde kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

Çizelge 3.3. Ligasyon reaksiyonları için gereken madde miktarları

Ligasyon Karışımı I	Ligasyon Karışımı II	Ligasyon Karışımı III
2,5 µl Promega 10X T ₄ DNA ligaz tamponu	2,5 µl Promega 10X T ₄ DNA ligaz tamponu	3 µl Promega 10X T ₄ DNA ligaz tamponu
1 µl Promega T ₄ DNA ligaz	1 µl Promega T ₄ DNA ligaz	1 µl Promega T ₄ DNA ligaz
15,5 µl saf GFP- KpnI/XbaI	13,5 µl saf GFP- KpnI/XbaI	18,5 µl saf GFP- KpnI/XbaI
1 µl saf pChlamy_3 - KpnI/XbaI	3 µl saf pChlamy_3 - KpnI/XbaI	2,5 µl saf pChlamy_3 - KpnI/XbaI

3.2.9. Konstrukt pChlamy_3-GFP plazmitinin DH5α hücrelerine transformasyonu

Konstrukt pChlamy_3-GFP plazmiti bölüm 3.2.2'de belirtilen protokole göre DH5α *E. coli* suşuna transforme edilerek çoğaltıldı.

3.2.10. Plazmit DNA saflaştırılması

Vektör olarak kullanımları ve moleküler klonlama için plazmit DNA'lar, "EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps" kiti kullanarak bölüm 3.2.3'teki protokole göre saflaştırıldı.

3.2.11. Plazmit DNA'ların PCR ile analizi

Ligasyon reaksiyonu sonucunda oluşturulan rekombinant pChlamy_3-GFP plazmiti *E. coli* DH5α'dan saflaştırıldıktan sonra genin plazmite doğru bir şekilde klonlanıp klonlanmadığını anlamak amacıyla GFP KpnI sense ve GFP XbaI reverse

primerleri kullanılarak bir doğrulama PCR'ı gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunda kalıp olarak oluşturulan rekombinant plazmit kullanıldı.

- 28,5 µl H₂O (DNAz & RNAz free)
- 5 µl 10x PCR reaksiyon tamponu
- 4 µl MgSO₄ (25mM)
- 3 µl dNTP karışımı (10 mM)
- 4 µl primer "sense" (5µM)
- 4 µl primer "reverse" (5µM)
- 1 µl kalıp DNA (pChlamy_3-GFP)
- 0,5 µl Taq DNA polimeraz (5U/ µl)

şeklinde toplam 50 µl olan PCR tüpleri hazırlandı. PCR işleminde; sıcaklık değerleri her bir döngü için aşağıdaki gibi ayarlanmış ve toplamda 30–35 döngüyle PCR işlemi tamamlanmıştır.

1. Denatürasyon: 94°C

2. Primer Annealing: 55°C

3. Ekstensiyon: 72°C

PCR işlemleri gerçekleştirildikten sonra 20 µl PCR karışımından alınarak %1'lik agaroz jelinde analiz edildi ve jelin fotoğrafı alındı.

3.2.12. DNA dizileme

Transforme olmuş plazmit DNA'larından 30 µl alındı ve T7 promotor primeri ile dizi analizi yapılmak üzere "REFGEN" firmasına DNA dizilemeye gönderildi.

3.2.13. *C. reinhardtii*'ye gen aktarımı

***C. reinhardtii* kültürü ve büyüme koşulları**

C. reinhardtii CC-125 yabani tip suşu, Chlamydomonas Genetics Center (Duke University)' den temin edildi. *C. reinhardtii* için büyüme ortamı olarak Tris-Acetate-Phosphate (TAP) besiyeri kullanıldı. Besiyerleri iklimlendirme dolabında, ortalama 155 µmol/m²/s aydınlatmada genellikle 12:12 saat aydınlık: karanlık (L:D) periyodunda, 3-6

gün boyunca Optik dansite (750nm'de) 0.3- 0.5 arasında olana kadar inkübasyona devam edildi (Invitrogen User Guide).

pChlamy 3-GFP vektörünün linearizasyonu

Nükleer transformasyon *C. reinhardtii*'de halkasal vektör DNA'sı ile başarılıymışsa da linearize edilmiş vektör DNA'sı ile yaklaşık % 70 daha verimli olmaktadır (Pasquali ve ark., 2013). Bu nedenle pChlamy_3-GFP vektör DNA'sı ScaI enzimi ile kesildi.

Elektroporasyon

Elektroporasyon, üretici firmanın ("Invitrogen, Life Technologies") önermiş olduğu protokolde bazı değişiklikler ile aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirilmiştir;

- *C. reinhardtii* kültürünün optik dansitesi spektrofotometrede ölçülerek en iyi performans için OD₇₅₀ 0.3- 0.5 arasında olana kadar inkübasyona devam edildi.
- 15 ml kültürden alınarak oda sıcaklığında 2500 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı.
- Süpernatant uzaklaştırılarak pellet oda sıcaklığında 250 µl TAP-40mM sukroz solusyonunda tekrar çözüldü.
- 30 µl lineerize edilmiş plazmit DNA süspanse edilmiş hücreler içerisine eklenerek iyice karıştırıldı.
- 250 µl transformasyon karışımı 4 ml'lik elektroporasyon küvetine aktarıldı ve oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
- Transformasyon karışımı oda sıcaklığında inkübe edilirken 1 ml TAP-40mM sukroz çözeltisi oda sıcaklığında 1.5 ml'lik ependorflara eklendi.
- Elektroporasyon parametreleri aşağıdaki şekilde ayarlanarak hücrelere uygulandı.

Voltaj: 1190 V

Süre: 2,1 ms

- Transformasyon karışımı ikiye bölünerek 125 µl'lik her bir karışım önceden hazırlanmış olan ve içerisinde 1 ml TAP-40mM sukroz bulunan ependorflara eklendi.
- İçerisinde transformasyon karışımı bulunan ependorflar iklimlendirme dolabına koyularak ortalama 155 µmol/m²/s aydınlatmada genellikle 12:12 saat aydınlık: karanlık (L:D) periyodunda, 24 saat boyunca inkübe edildi.

- Hücreler oda sıcaklığında 2500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı.
- Hücreler üzerine oda sıcaklığında 150 µl TAP-40 mM sukroz çözeltisi eklenerek hücreler tekrar süspanse edildi.
- İçerisinde transformasyon karışımı bulunan 150 µl TAP-40 mM sukroz çözeltisi, TAP-agar-hygomycin bulunan katı besiyerlerine yayma ekim yapıldı.
- Ekim yapılan petriyerler 28°C ve 155 µmol/m²/s 'e ayarlanmış iklimlendirme dolabına yerleştirildi.
- Petriyerler, *C. reinhardtii* kolonileri net bir şekilde görülene kadar inkübe edildi.
- Gelişen kolonilerde entegrasyonun sağlanıp sağlanmadığını test etmek için hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapılarak kontrol PCR'ı yapıldı.

3.2.14. *C. reinhardtii* genomik DNA'sının izolasyonu

Türün Genomik DNA izolasyonu "Zymo Research (ZR Fungal/Bacterial DNA Mini Prep)" kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

- 50- 100 mg alg hücresi 200 µl su veya izotonik tampon (örneğin; PBS) ZR BashingBead™ Lysis Tüp içerisinde çözüldü ve üzerine 750 µl Lizis Solusyonu eklendi.
- Tüp max. hızda 5 dk vortekslendi ve sonra 3 mm ucu olan sonikatörle 1 dk hücrelerin parçalama işlemi gerçekleştirildi.
- ZR BashingBead™ Lysis Tüpü 10 000 x g 1 dk santrifüj edildi.
- 400 µl süpernatant Zymo-Spin™ IV Spin Filter (turuncu kapaklı) kollektör tüpe aktarılır ve 7 000 rpm 1 dak santrifüj yapıldı.
- 1,2 ml of Fungal/Bacterial DNA Binding Tamponu 4. basamaktaki kollektör tüpe ilave edildi.
- Zymo-Spin™ IIC Column kollektör tüpü içerisine yerleştirildi ve 800 µl karışımdan ilave edildi. 10 000 x g 1 dk santrifüj edildi. Kollektör tüpündeki sıvı uzaklaştırılıp işlem tekrarlandı.
- Zymo-Spin™ IIC Column yeni kollektör tüpü içerisine yerleştirildi ve filtre üzerine 200 µl DNA Pre-Wash Tamponu ilave edilerek 10 000 x g 1 dk santrifüjlendi.

Daha sonra 500 µl Fungal/Bacterial DNA Wash Tamponu eklendi ve tekrar aynı şekilde santrifüjlendi.

- Zymo-Spin™ IIC Column 1,5 ml ependorf içerisine dikkatlice yerleştirildi ve üzerine 100 µl DNA Elution Tamponu ilave edildi. Tüpler 10 000 x g 30 s santrifüjlenerek filtrede tutulan DNA alltaki ependorf tüpünde toplandı.

Alglerin izolasyonunun sonrasında 3.2.11'de belirtildiği şekilde doğrulama PCR'ı gerçekleştirildi.

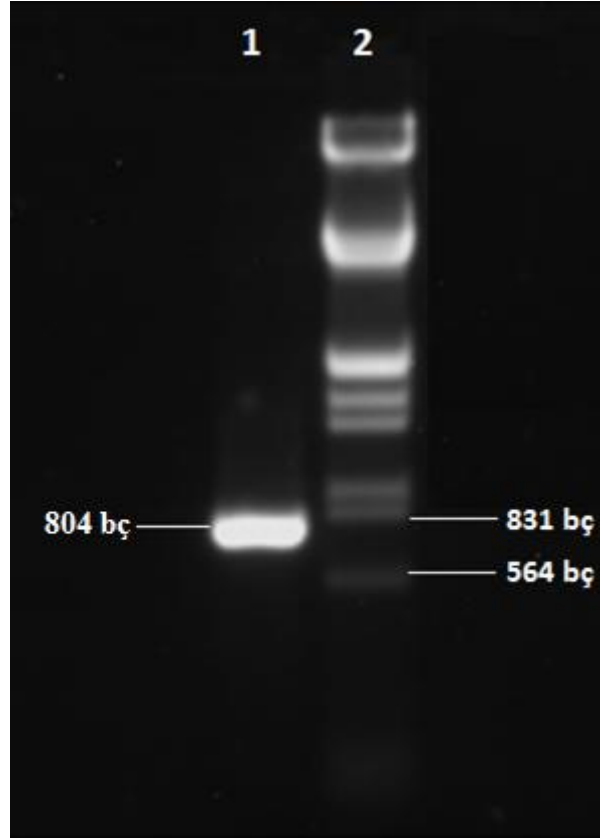
3.2.15. *C. reinhardtii*'de GFP proteininin varlığının SDS-PAGE ile belirlenmesi

Hücre kültüründen alınan 100µl'lik numuneler 100µl jel yükleme tamponuyla karıştırılıp, 100 °C'de 2 dk denatüre edilerek önceden hazırlanan SDS PAGE (sodyumdodesilsülfat poliakrilamid jel elektroforezi) jelinin kuyucuklarına 30'ar µl yüklendi. SDS-PAGE tamamlandıktan sonra distile su ile yıkanan jel sonrasında Coomassie mavisi ile boyandı. Boyanan jelden boya "destain" solüsyonu ile uzaklaştırıldı. Daha sonra bir tarayıcı ile taranarak dijital ortama alındı (Laemmli, 1970).

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. GFP DNA Dizisinin PCR ile Amplifikasyonu

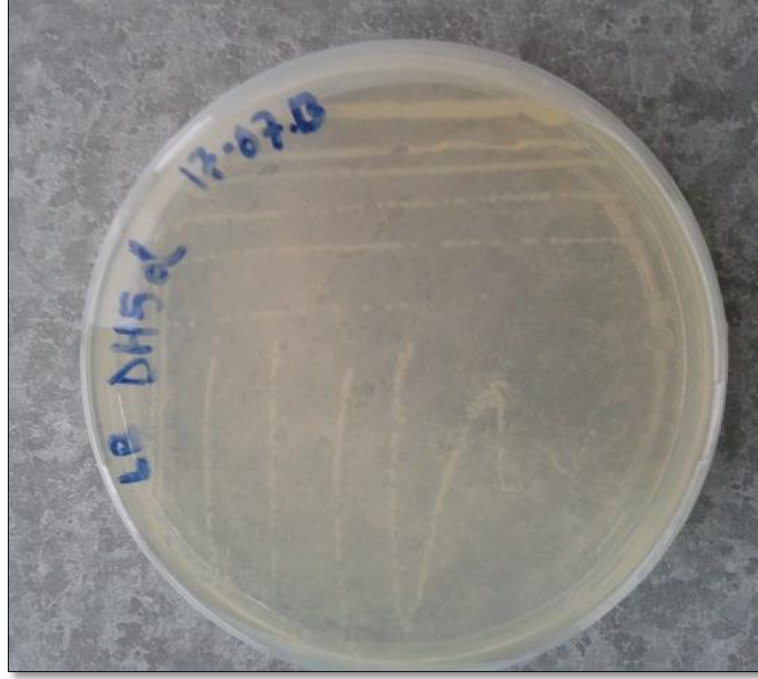
Kalıp DNA pETGFP için dizayn ettiğimiz primerler ile başlık 3.2.4'te anlatılan PCR reaksiyonu sonucunda yaklaşık 804 bç'lik ilgili gen dizisinin amplifiye edildiği görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. GFP KpnI sense ve GFP XbaI reverse primerleri kullanılarak yapılan PCR reaksiyonu sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü 1: GFP'nin amplifiye edilmiş DNA parçası, 2: λ Hind III-EcoR I DNA markörü

4.2. pChlamy_3 Vektörünün Konak DH5 α ile Çoğaltılması

Shuttle vektörümüz, ısı şoku yöntemi ile DH5 α bakterisine aktararak çoğaltma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.2). Böylece başarılı bir şekilde birçok pChlamy_3 plazmit DNA'sı oluşturuldu. Elde edilen plazmit DNA'lar daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.



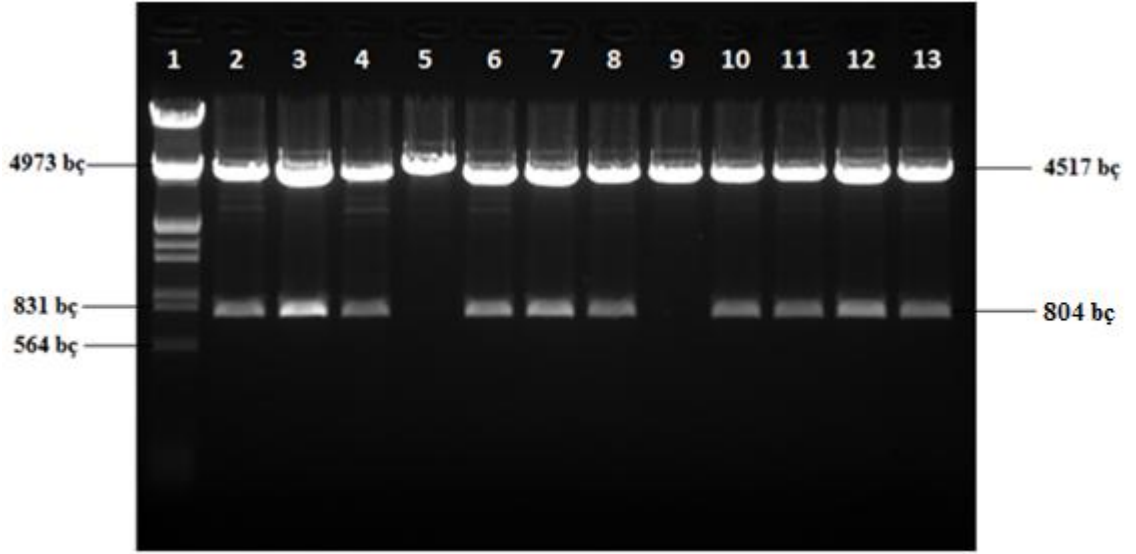
Şekil 4.2. pChlamy_3 plazmitini içeren DH5α bakteri kolonisi

4.3. Plazmit ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

pChlamy_3 plazmiti “EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps” ve GFP DNA’sı “EZ-10 Spin Column PCR Products Purification” kiti kullanılarak üreticinin tavsiye ettiği protokole uygun olarak saflaştırıldı.

4.4. pChlamy_3-GFP Plazmit DNA’larının Restriksiyon Enzimleri ile Analizi

pChlamy_3-GFP plazmit DNA’sı XbaI-KpnI restriksiyon enzimleri ile kesilip ligasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra *E. coli DH5α* suşu kullanılarak transforme edildi. Ardından ampisilin içeren petri tabaklarına ekim yapıldı. Bir gece inkübasyonun ardından beliren kolonilerden 4'er ml'lik sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edildi. Daha sonra hücrelerin “EZ-10 Spin Column Plasmid DNA MiniPreps” kiti ile plazmit DNA saflaştırılması yapıldı. Saflaştırma sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde analiz edildi. Gerçekleştirilen kesimlerde ürün olarak plazmit'e ait (pChlamy_3) 4517 bç'lik ve insert (GFP)'e ait 804 bç'lik birer DNA bantı görüldü (Şekil 4.3).

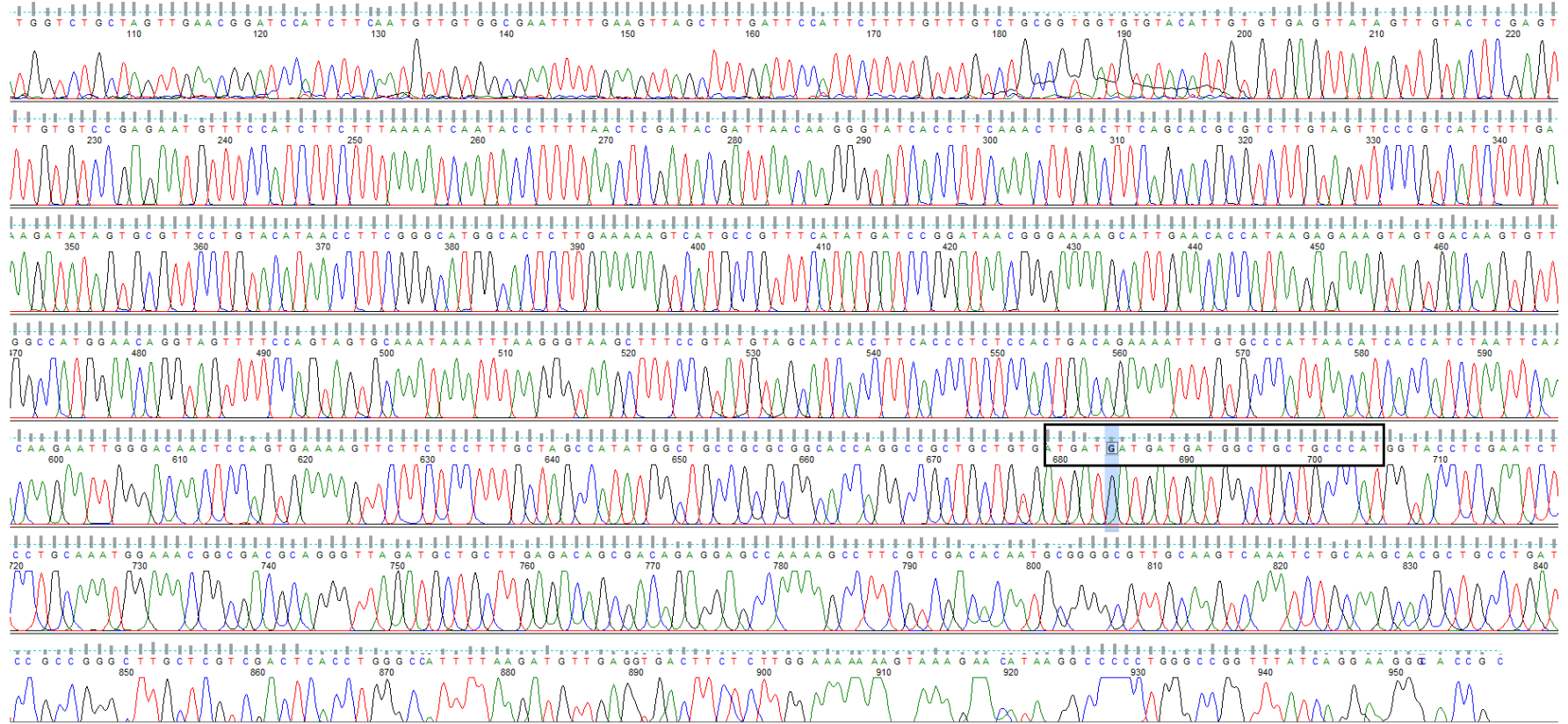


Şekil 4.3. pChlamy_3-GFP plazminin restriksiyon enzimleri ile doğrulama kesimi sonucunda elde edilen agaroz jel görüntüsü 1: λ / Hind III-EcoR I DNA markörü, 2-13: KpnI-XbaI restirksiyon enzimlerinin kesim ürünleri

Bu işlemlerden sonra oluşturulmuş olan rekombinant pChlamy_3-GFP plazmitini pozitif olarak taşıyan hücrelerden izole edilen plazmit DNA'lar primerler ile beraber DNA dizileme (sequencing) işlemi yapılması için "REFGEN" firmasına gönderildi.

4.5. DNA Dizi Analizi

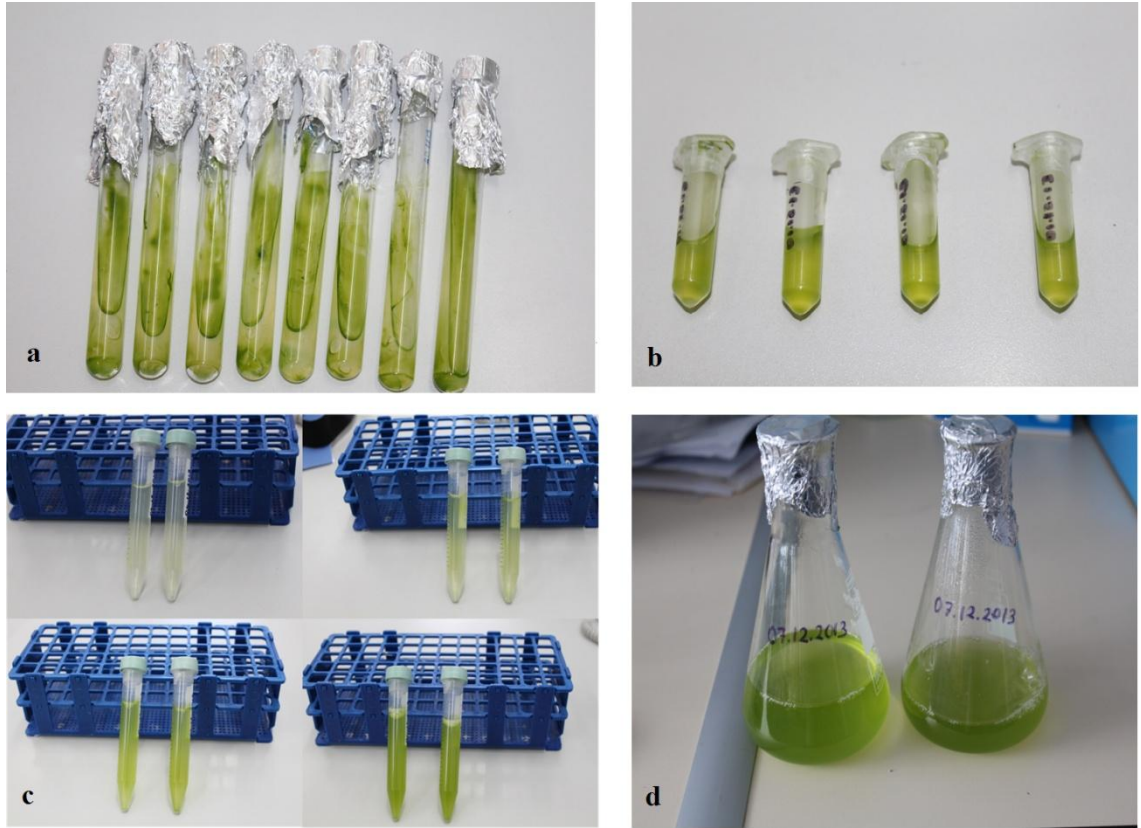
GFP proteinini kodlayan DNA fragmanının pChlamy_3 vektörüne herhangi bir çerçeve kayması problemi olmaksızın başarılı bir şekilde klonlandığı aşağıdaki DNA dizileme kromatogramında (Şekil 4.4) ortaya çıkmaktadır.



Şekil 4.4. pChlamy_3 - GFP plazmidinin DNA dizileme sonucunun kromotogram şeklindeki görüntüsü

4.6. *C. reinhardtii*'nin Katı ve Sıvı Besiyerlerinde Üretilmesi

C. reinhardtii CC-125 yabancı tip suşu, Chlamydomonas Genetics Center (Duke University)' den temin edildi. Katı besiyerinde gelen hücrelerin yatık agar kültüründe başarılı bir şekilde çoğaltıldı (Şekil 4.5a). Elektroporasyon işlemine kullanılmak üzere yatık agar kültüründen alınan hücreler içerisinde TAP bulunan 1 ml'lik ependorf tüplere inoküle edildi (Şekil 4.5b). 1 ml'lik ependorflarda çoğalan hücrelerin hacmini büyütmek için sırasıyla 10 ml ve 50 ml'lik TAP besiyerlerine aktarılarak 1 hafta boyunca iklimlendirme dolabında inkübe edildi (Şekil 4.5c-d).

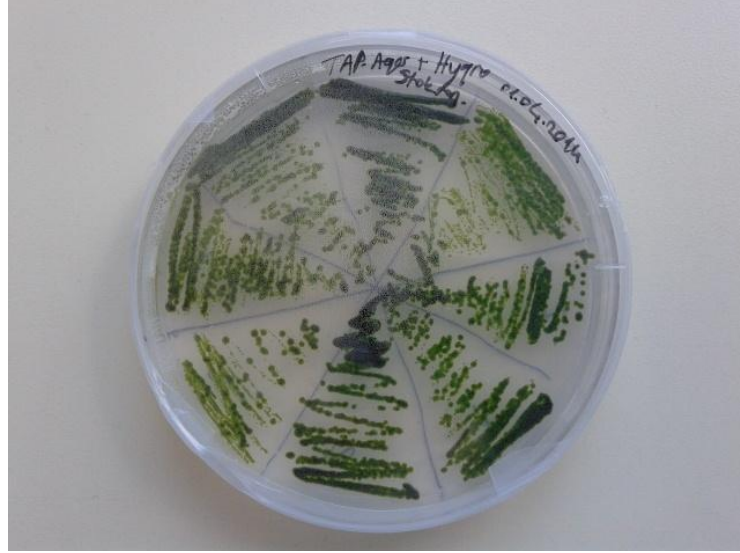


Şekil 4.5. *C. reinhardtii*'nin katı ve sıvı kültürleri

4.7. Elektroporasyon

DNA dizi analizi sonuçları pozitif çıkan pChlmy_3-GFP plazmitlerinin çoğaltılan *C. reinhardtii* hücrelerinin nüklear genomuna elektroporasyon yoluyla aktarımı başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Elektroporasyonu gerçekleştirilen transgenik hücrelerin, Hygromycin antibiyotiğini içeren seçici besiyerine yayma ekimi

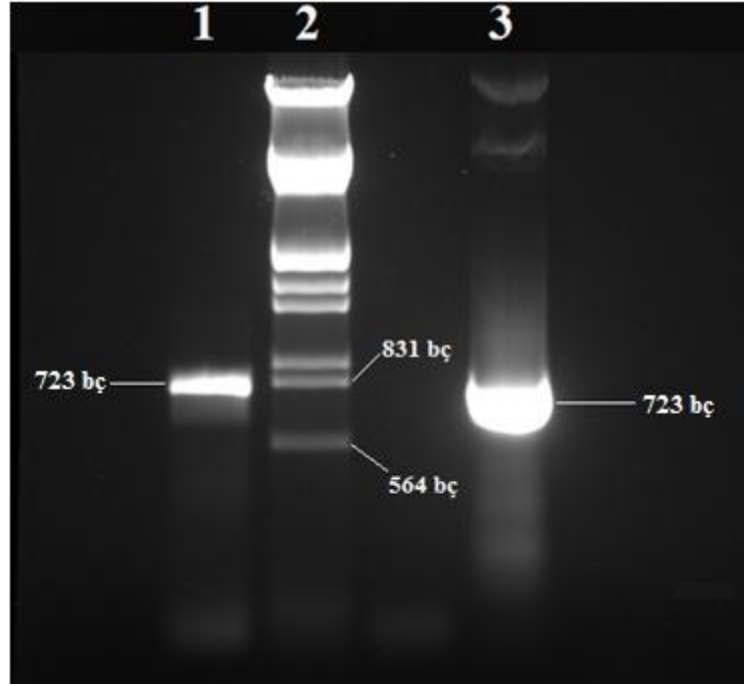
yapıldı. Yaklaşık 6-7 günlük inkübasyondan sonra beliren kolonilerden alınarak bölünmüş petrilere çizgi ekim uygulandı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Transgenik *C. reinhardtii* kolonilerinin seçici besiyerindeki görüntüsü

4.8. GFP Proteinin Ekspresyon Çalışmaları

Plazmit DNA'nın *C. reinhardtii*'nin nükleer genomuna entegre olup olmadığını doğrulamak için seçici katı besiyerinde gelişen koloniler hygromycin içeren sıvı besiyerine (TAP) aktarıldı. Sıvı besiyerinde gelişen transformantların Başlık 3.2.14'te belirtildiği protokole göre genomik DNA izolasyonları yapıldı. Dizayn edilen primerler ile doğrulama PCR'ı gerçekleştirildi. PCR ürünlerinin agaroz jel analizinde pChlamy_3-GFP plazmit DNA'sının *C. reinhardtii* nükleer genomuna başarılı bir şekilde entegre olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. pChlamy_3-GFP plazmit DNA'sı entegrasyonunun doğrulama PCR'ının agaroz jel görüntüsü.
1: Pozitif kontrol (Kalıp GFP DNA'sı); 2: λ Hind III-EcoR I DNA markörü; 3: Elektroporasyon sonucunda *C. reinhardtii* nüklear genomuna entegre olmuş GFP DNA'sı

Sıvı besiyerinde kültürü yapılan hücrelerden alınan numuneler % 12'lik SDS PAGE'ye tabi tutuldu. Elektroforez işlemleri bittikten sonra SDS PAGE jelleri kasetlerden çıkartılarak Coomassie brilliant mavi boyası ile boyandı. Boyama işlemlerinin akabinde iyice yıkanıp temizlenen jeller tarayıcı kullanılarak incelendi. Sonuç olarak GFP ekspresyonunun varlığını gösteren herhangi bir protein bantına rastlanmadı.

3. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *C. reinhardtii*'de, rekombinant DNA teknolojisi ile GFP üretilmeye çalışılmıştır. Hedef genimiz olan GFP (Yeşil Floresans Protein) elektroporasyon yöntemiyle *C. reinhardtii* yeşil alg türüne aktarılmıştır. Aktarılma sonrasında pozitif mikroorganizmalar hyromycin içeren besi ortamından alınmıştır. Yapılan kontrol PCR'ında GFP proteinini kodlayan geninin model organizma *C. reinhardtii*'nin nükleer genomuna entegre olduğu tespit edilmiştir. SDS-PAGE analizi sonucunda ise GFP proteininin overekspresyonu (fazla miktarda üretimi) gözlenememiştir.

C. reinhardtii'de, yabancı proteinlerin ekspresyonunu etkileyen bazı problemler söz konusudur. Bunlardan ilki yüksek rekombinant protein ekspresyonu için önemli bir unsur olan kodon optimizasyonudur. Eğer aktarılacak genin kodon kullanımı konak organizma ile uyumlu olmazsa protein ekspresyonu istenen ölçüde gerçekleşemez (Ferrante ve ark., 2008).

Aktarılan genin, konak organizmanın genomunda yerleşim yeri de son derece önemlidir. Yabancı genetik materyalin konak organizmanın nükleer genom DNA'sına entegrasyonu rastgele genomun herhangi bir bölgesine olabilir (Kindle ve ark., 1989). Yani aktarım, homolog olmayan rekombinasyon ile transgenlerin farklı kromozomal lokasyonlarına entegre olur. Tekrarlı (repetitive) DNA yakınına veya heterokromatin içerisine entegre olan genler doğrudan inaktif hale gelebilirler (Schroda ve ark., 2002).

Bunun yanı sıra DNA dizisinde herhangi bir modifikasyon olmaksızın gen anlatımındaki kalıtsal epigenetik değişimler, genlerin sessizleşmesine (silencing) neden olabilmektedir. Epigenetik değişimler transkripsiyonel seviyede DNA metilasyonu, posttranskripsiyonel seviyede RNA interferans (RNAi) gibi doğal işlemler ile gerçekleşebilir. Metilasyon DNA'nın inaktive olmasına neden olarak protein ekspresyonunu engelleyebilecek bir sistemdir. RNAi, ilgili gen bölgesini protein haline getirecek olan mRNA molekülünü inhibe ederek ya da parçalayarak protein sentezini engelleyebilir (Jeong ve ark., 2002).

Ayrıca endojen enhansır elementleri, düzenleyici mekanizmalar, transformasyon ile ilgili mekanizmalar, proteazlara karşı duyarlılık ve proteinin lokalizasyonu gibi birçok faktörün etkileşimi *C. reinhardtii*' de protein ekspresyonunu etkileyebilir ve

mikroalglerde rekombinant protein üretimi için standart bir sistem oluşturulmasında güçlükler neden olabilir (Rosales-Mendoza ve ark., 2012).

Aşağıda belirtilen öneriler gerçekleştirildiği takdirde daha yüksek seviyede protein ekspresyonu elde edilebilir.

C. reinhardtii nüklear genomu % 64 yüksek GC baz içeriğine sahiptir. Buna göre biyoinformatik araçlar ile düşük sıklıkla ifade edilen nadir kodonlar (rare codon), daha yüksek sıklıkla ifade edilen kodonlarla değiştirilip kodon optimizasyonu sağlanabilir.

Alg ekspresyon vektörleri, aynen maya sistemlerinden *Pichia pastoris*'de olduğu gibi *C. reinhardtii* organizmasında en yüksek seviyede üretilen proteinin genom içerisindeki lokusuna entegre edebilecek şekilde yeniden dizayn edilebilirler (Balamurugan ve ark., 2007).

Alglerde, kloroplast transformasyonu daha verimli olacağından yeni tasarlanan vektör bu organelle entegre olacak şekilde dizayn edilebilir. Kloroplast genomunun organizasyonu, prokaryotik tipte olduğu için gen sessizleşmesi gibi kompleks mekanizmalardan yoksundur. Buna ek olarak kloroplast genomu nüklear genoma göre daha küçüktür. Bu sebeple homolog rekombinasyon ile yönlendirilmiş gen transferi yapmak mümkün olabilir (Rosales-Mendoza ve ark., 2012). Ancak kloroplast transformasyonu, özellikle yüksek posttranslasyonel modifikasyon isteyen protein için uygun olmayabilir.

Mikroalgler, rekombinant gen ekspresyonu için konak organizma olarak yeni yeni kullanılmaya başlandığından yukarıda belirtilen problemler henüz çözülememiş ve tam anlamıyla üstesinden gelinememiştir. Mikroalgler için geliştirilecek yeni ve güçlü promotörler, markörler, raportörler ve farklı yöntemlerle aynı zamanda da bu organizmaların kompleks moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ile bu sorunlar ortadan kaldırılarak mikroalgler daha etkili ve tercih edilir hale gelebilir (Neupert ve ark., 2012).

Ayrıca *C. reinhardtii*, güvenli bir organizma olması sayesinde, hem gıda sanayiinde hem de farmasötik teknolojide kullanımı, son derece uygun olacağından ticari önem taşıyan rekombinant proteinlerin büyük çapta üretimine katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- Adams, M., 2011. Teaching with Chlamydomonas. Proceedings of the Association for Biology Laboratory Education, 32, 237-244.
- Altuner, Z., Pabuçcu, K., Türkekul, İ., 2002. Tohumuz Bitkiler Sistematigi., 1. cilt, say:63, Altan Yayınları, Ankara.
- Anonim, 1998. 1998-1999 Catalog. New England BioLabs. USA.
- Anonim, 2009. REAL OCEANS. <http://realoceans.wordpress.com/> (02.07.2011).
- Anonim, 2012. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> (15.10.2011)
- Anonim, 2014a. Education in Microscopy and Digital Imaging. <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>; (02.07.2014).
- Anonim, 2014b. Durnford Lab. <http://www2.unb.ca/biology/Faculty/Durnford/photo-acclimation.html>; (15.07.2014).
- Apt, K.E., Kroth-Pancic, P.G., Grossman, A R., 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Mol. Gen. Genet., 252, 572-579.
- Aydın, M., 2007. İnsan Karbonik Anhidraz I (Hca I) Geninin Klonlanması, *E. coli* 'de Ekspresyonu ve Phe91Asn Yönlendirilmiş Mutageneziyle Elde Eddlen Mutant Enzimin İnhibitörlere Karşı İlgisinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi.
- Balamurugan, V., Reddy, G.R., Suryanarayana, V.V.S., 2007. *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins -Vaccines. Indian Journal of Biotechnology, 6, 175-186.
- Balta, E., 2007. Biyoteknoloji Ürünleri. Teb haberleri, 4, 8-13.
- Becker, E.W., 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 25, 207-210.
- Bilen, B., 2010. *Escherichia coli* yeşil floresans proteini füzyon vektörünün konstrüksiyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R., Randolph-Anderson, B.L., Robertson, D., Klein, T., Shark, K.B., Sanford, J.C., 1988. Chloroplast transformation in Chlamydomonas with high velocity microprojectiles. Science, 240, 1534-1538.
- Brown, L.E., Sprecher, S.L., Keller, L.R., 1991. Introduction of exogenous DNA into *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. Mol. Cell. Biol., 11, 2328-2333.
- Cadoret, J-P., Garnier, M., Saint-Jean, B., 2012. Microalgae, Functional Genomics and Biotechnology. Advances in Botanical Research, 64, 285-341.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 263 (5148), 802-805.
- Coll, J.M., 2006. Methodologies for transferring DNA into eukaryotic microalgae. Spanish Journal of Agricultural Research, 4(4), 316-330.
- Davies J.P., Grossman, A.R., 1998. The use of Chlamydomonas (chlorophyta: volvocales) as a model algal system for genome studies and the elucidation of photosynthetic processes. J, Phycol, 34, 907-917.
- Debuchy, R., Purton, S., Rochaix, J.D., 1989. The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and

- for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus. *EMBO J*, 8, 2803-2809.
- Dunahay, T.G., 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*, 15(3), 452-5, 457-8, 460.
- Ferrante, P., Catalanotti, C., Bonente, G., Giuliano, G., 2008. An optimized, chemically regulated gene expression system for *Chlamydomonas*. *PLoS ONE*, 3(9), e3200.
- Franklin, S., Ngo, B., Efuet, E., Mayfield, S.P., 2002. Development of a GFP reporter gene for *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *The Plant Journal*, 30, 6, 733-744.
- Fuhrmann, M., Oertel, W., Hegeman, P. 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.*, 19, 353-361.
- Fuhrmann, M., 2002. Expanding the Molecular Toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153, 357-364.
- Gong, Y., Hu, H., Gao, Y., Xu, X., Gao, H. 2011. Microalgae as platforms for production of recombinant proteins and valuable compounds: progress and prospects. *J. Ind. Microbial Biotechnology*, 38, 1879-1890.
- Gregory, J.A., Li, F., Tomosada, L.M., Cox, C.J., Topol, A.B., Vinetz, J.M., Mayfield, S., 2012. Algae-Produced Pfs25 Elicits Antibodies That Inhibit Malaria Transmission. *PLoS ONE* 7(5), e37179.
- Griesbeck, C., Kobl, I., Heitzer, M., 2006. A Protein Expression System for Pharmaceutical and Biotechnological Proteins. *Molecular Biotechnology*, 34, 213-223.
- Griesbeck, C. ve Kirchmayr, A., 2012. Algae: an alternative to the higher plant system in gene farming. Ed: Wang, A., Ma, S., *Molecular Farming in Molecular Farming in Plants: Recent Advances and Future Prospects*, Springer Science+Business Media, 125-144.
- Hallmann, A., 2007. Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal*, 1, 81- 98.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166 (4), 557-580.
- Harris, E.H., 2009. *The Chlamydomonas Sourcebook*, Second Edition, Academic Press, Oxford.
- Hippler, M., Redding, K., and Rochaix, J. D., 1998. *Chlamydomonas* genetics, a tool for the study of bioenergetic pathways. *Biochim. Biophys. Acta*, 1367, 1-62.
- Jeong, B., Wu-Scharf, D., Zhang, C., Cerutti, H., 2002. Suppressors of transcriptional transgenic silencing in *Chlamydomonas* are sensitive to DNA-damaging agents and reactivate transposable elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99, 2, 1076-1081.
- Jinxia, W., Zhangli, H., Chaogang, W., Shuangfei, L., Anping L., 2008. Efficient expression of green fluorescent protein (GFP) mediated by a chimeric promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 26 (3), 242-247.
- Karaboz, İ., Sukatar A., Parlakay A. 2004. Denizsel Organizmalardan Elde Edilen Yeşil Floresans Protein (GFP) ve Kullanım Alanları. *Ege Üniv. Su Ürünleri Dergisi*, 21 (3-4), 383-388.
- Khan, K.H., 2010. Gene Transfer Technologies and their Applications: Roles in Human Diseases. *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 1,1, 208-218.

- Kikkert, J.R., Vidal, J.R., Reisch, B.I., 2005. Stable transformation of plant cells by particle bombardment/biolistics. *Methods. Mol. Biol.*, 286, 61-78.
- Kindle, K.L., Schnell, R.A., Fernandez, E., Lefebvre, P.A., 1989. Stable Nuclear Transformation of *Chlamydomonas* Using the *Chlamydomonas* Gene for Nitrate Reductase. *J. Cell Biol.*, 109, 2589-2601.
- Kindle, K.L., 1990. High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 1228-1232.
- Komsic-Buchmann, K., Stephan, L.M., Becker, B., 2012. The SEC6 protein is required for contractile vacuole function in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Sci.*, 125, 2885-2895.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259), 680-685.
- Lauersen, K.J., Berger, H., Mussgnug, J.H., Kruse, O., 2013. Efficient recombinant protein production and secretion from nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Journal of Biotechnology*, 167 (2), 101-110.
- Lefebvre, P.A., Silflow, C.D., 1999. *Chlamydomonas*: the cell and its genomes. *Genetics*, 151, 9-14.
- Leon-Banares, R., Gonzalez-Ballester, D., Galvan, A., Fernandez, E., 2004. Transgenic microalgae as green cell-factories. *Trends Biotechnol.*, 22, 45-52.
- Leon, R. ve Fernandez, E., 2007. Nuclear transformation of eukaryotic microalgae: historical overview, achievements and problems. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 616, 1-11.
- Mahan, K.M., Odom, O.W., Herrin, D.L., 2005. Controlling fungal contamination in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures. *Biotechniques*, 39, 457-458.
- Manuell, A.L. ve Mayfield, S.P., 2006. A bright future for *Chlamydomonas*. *Genome Biology*, 7, 327.
- Mayfield, S.P., Manuell, A.L., Chen, S., Wu, J., Tran, M., Siefker, D., Muto, M., Marin-Navarro, J. 2007. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as protein factories. *Curr Opin in Biotechnol* 18, 1-8.
- Neupert, J., Shao, N., Lu, Y., Bock, R., 2012. Genetic Transformation of the Model Green Alga. *Transgenic Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 847, 35-47.
- Pabuçcu, K., 2012, *Mougeotia nummuloides*'in Toplam Yağ İçeriği ve Biyodizel Kapasitesi, II. Ulusal Enerji Tarımı ve Biyoyakıtlar Çalıştayı, Tokat.
- Pabuçcu, K. ve Altuner, Z., 2012. Kelkit Havzası (Tokat) Tatlısularının Algaeolojik Envanteri, Tokat Sempozyumu, 01-03 Kasım, 2012, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tokat.
- Pizzoli, G. ve Pasquali, G., 2013. Expression Of An Artificial Human Glucocerebrosidase Gene In *Chlamydomonas reinhardtii*. IV Simpósio Brasileiro de Genética Molecular de Plantas, 8-12 April, Brezilya.
- Plucinak, T.M., 2013. Making *Chlamydomonas reinhardtii* A Better Model Organism: Tackling The Inefficiency of Nuclear Transgene Expression and Improving Methods For The Generation And Characterization of Insertional Mutant Libraries. (Diss.), University of Nebraska.
- Potvin, G., Zhang, Z., 2010. Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae. *Biotechnology Advances*, 28, 910-918.
- Pourmir, A., Noor-Mohammadi, S., Johannes, T.W., 2013. Production of xylitol by recombinant microalgae. *Journal of Biotechnology*, 165, 178-183.

- Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229-33.
- Rasala, B.A., Muto, M., Lee, P.A., Jager, M., Cardoso, R.M.F., Behnke, C.A., Kirk, P., Hokanson, C.A., Crea, R., Mendez, M., Mayfield, S.P., 2010. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.*, 8 (6), 719-733.
- Rasala, B.A., Lee, P.A., Shen, Z., Briggs, S.P., Mendez, M., Mayfield, S.P., 2012. Robust Expression and Secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by Fusion to a Selection Gene and Processing with the FMDV 2A Peptide. *PLoS ONE* 7(8), e43349.
- Rochaix, J.D., 1995. *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.*, 29, 209-230.
- Rosales-Mendoza, S., Paz-Maldonado, L.M.T., Soria-Guerra, R.E., 2012. *Chlamydomonas reinhardtii* as a viable platform for the production of recombinant proteins: current status and perspectives. *Plant Cell Rep.*, 31, 479-494
- Rosenberg, J.N., Oyler, G.A., Wilkinson, L., Betenbaugh, M.J. 2008. A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. *Curr Opin in Biotechnol* 19, 430-436.
- Ruiz-Binder, N.E., Geimer, S., Melkonian, M., 2002. In vivo localization of centrin in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 52, 43-55.
- Sager, R. ve Granick, S., 1954. Nutritional control of sexuality in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Gen Physiol.*, 37 (6), 729-742.
- Schmidt, F.R. 2004. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol* 65, 363-372.
- Schoppmeier, J., Mages, W., Lechtreck, K.F., 2005. GFP as a tool for the analysis of proteins in the flagellar basal apparatus of *Chlamydomonas*. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 61, 189-200.
- Schroda, M., Beck, C.F., Vallon, O., 2002. Sequence elements within an HSP70 promoter counteract transcriptional transgene silencing in *Chlamydomonas*. *The Plant Journal*, 31(4), 445-455.
- Serbest-Kobaner, S., 2006. Hıyar bitkisinde (*Cucumis sativus* L.) rejenerasyonun optimizasyonu ve *Agrobacterium* aracılığıyla GFP (yeşil floresans protein) geninin aktarılması (Y.Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji ABD, Çukurova.
- Shimogawara, K., Fujiwara, S., Grossman, A., Usuda, H. 1997. High-Efficiency Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Genetics Society of America*, 148, 1821-1828.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan. *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-29.
- Sineshchekov, O.A., Govorunova, E.G., 2001. Rhodopsin Receptors of Phototaxis in Green Flagellate Algae. *Biochemistry (Moscow)*, 66, 11, 1300-1310.
- Sipahi, H., 1997. Arabidopsis thaliana tiyamin transformantının kalıtım analizi. (Yüksek Lisans Tezi), Ankara Üniversitesi.

- Specht, E., Miyake-Stoner, S., Mayfield, S.P., 2010. Micro-algae come of age as a platform for recombinant protein production. *Biotechnol Lett*, 32, 137-1383.
- Stewart, JR C.N., 2001. The Utility of Green Fluorescent Protein in Transgenic Plants. *Plant Cell Reports*, 20, 376-382.
- Tural, B., 2005. Regulation of the expression of photorespiratory genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. (M.Sc.Thesis), Louisiana State University.
- Yamano, T., Iguchi, H., Fukuzawa, H., 2013. Rapid transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* without cell-wall removal. *J. Biosci. Bioeng.*, 115(6), 691-4.
- Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N., 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*. 14 (10), 1246-1251.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Öznur CAN
Doğum Tarihi ve Yeri : 03.07.1989 / Kırıkhan
Yabancı Dili : İNGİLİZCE
Telefon : 0 356 252 16 16 (3042)
e-mail : oznurerken@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Lisans	Ordu Üni. Biyoloji Bölümü	2011
Lise	Darüşşafaka Lisesi	2007

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2011- ...	Tokat Gaziosmanpaşa Üni. Biyoloji Bölümü	Araştırma Görevlisi