



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ORTAM KOŞULLARININ *Schizosaccharomyces pombe*'DE
Rec12 GEN ANLATIMI VE HOMOLOG REKOMBİNASYON
ÜZERİNE ETKİSİ**

Deniz YILMAZ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER

Ekim, 2016

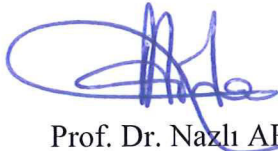
İSTANBUL

Bu çalışma 21.10.2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



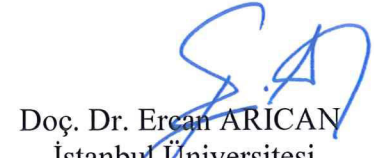
Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER
(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Bedi GEMİCİ PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Cenk KIĞ
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 48846 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca her daim yol gösteren ve yardımcı olan danışman hocam Yard. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER'e ve değerli bilgileriyle eğitim hayatıma katkı sağlayan Prof. Dr. Nazlı ARDA başta olmak üzere İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndaki tüm çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olan, yardımını ve desteğini her zaman hissettiğim Araş. Gör. Merve YILMAZER'e, değerli bilgileri ile yol gösteren Dr. Süleyman Semih EKİMLER'e ve çalışmalarımda yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda floresan mikroskobu görüntülerinin elde edilmesinde katkısı olan Prof. Dr. Gülruh ALBAYRAK'a ve ilgisini hiç esirgemeyen Doç. Dr. Bedia GEMİCİ PALABIYIK'a teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca maddi ve manevi destek olan, yanımda duran ve sevgilerini her daim hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ekim 2016

Deniz YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET.....	xi
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
2.2. HOMOLOG REKOMBİNASYON	5
2.3. ÇALIŞMADA HEDEFLenen <i>Rec12</i> GENİ.....	9
2.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'DE OKSİDATİF STRES	11
2.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER.....	13
2.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
2.5.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'de Eşeyli Üreme ve Random Spor Analizi.....	17
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	20
3.1. ORGANİZMA	20
3.2. BESİ ORTAMLARI	20
3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	24
3.4. ÇAPRAZLAMA ÖNCESİ HÜCRELERE STRES UYGULANMASI	24
3.5. ÇAPRAZLAMA VE ÜREMENİN İZLENMESİ	25
3.6. RANDOM SPOR ANALİZİ	26
3.7. ÇAPRAZLAMA SONRASI FLORESAN MİKRSOKOBU İLE GÖRÜNTÜLEME	27
3.7.1. Floresan Mikroskobu İçin Preparatların Hazırlanması	27
3.8. RNA İZOLASYONU	28
3.8.1. RNA Miktarı ve Saflığının Ölçümü	29

3.9.	RNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ	30
3.10.	cDNA SENTEZİ.....	32
3.11.	cDNA'LARIN KONTROL EDİLMESİ	34
3.11.1.	Agaroz Jel Hazırlanışı ve Elektroforez	34
3.12.	GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)..	34
3.12.1.	Primer Tasarımı	34
3.12.2.	Primerlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Kontrolü	35
3.12.3.	“RT-PCR” deney düzeneğinin hazırlanması	37
4.	BULGULAR.....	40
4.1.	RANDOM SPOR ANALİZİ	40
4.2.	TOTAL RNA İZOLASYONU	41
4.3.	cDNA SENTEZİ.....	43
4.4.	PRİMERLERİN OPTİMİZASYONU	43
4.5.	RT-PCR İLE GEN ANLATIMININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ	44
4.6.	FLORESAN MİKROSKOBU İLE ASKUS GÖRÜNTÜLEME.....	46
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	49
	KAYNAKLAR.....	53
	ÖZGEÇMİŞ	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Fisyon mayalarının filogenetik sınıflandırılması (Sipiczki, 2000).....	4
Şekil 2.2: Homolog rekombinasyonda RecBCD yolağı (Weaver, 2011).....	7
Şekil 2.3: Holiday bağlantısının ayrılması (Weaver, 2011).....	8
Şekil 2.4: Çift İplik Kırıklarının (DSB) tamir mekanizması (Smith ve diğ., 2001).	9
Şekil 2.5: SYBR® Green I'in PCR süresince artan floresan sinyali (Dorak, 2006).	15
Şekil 2.6: TaqMan® probu ile floresan sinyal oluşumu (Dorak, 2006).....	16
Şekil 2.7: LUX™ primerlerinin yapısı ve etki şekli (Dorak, 2006).....	17
Şekil 2.8: <i>S. pombe</i> hücrelerinin seksüel gelişimi (Hoffman ve diğ., 2015).	18
Şekil 3.1: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan 1kb "DNA Ladder".	32
Şekil 3.2: Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan 100 baz çiftlik "DNA Ladder"	37
Şekil 4.1: Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) grafiği.....	41
Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarına ait total RNA'ların agaroz jel elektroforezi (L: 1 kb DNA ladder, 1: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (Kontrol), 2: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), 3: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂), 4: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (Kontrol), 5: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), 6: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂), 7: 972h ⁻ , 8: 972h ⁻ x 975h ⁺).	42
Şekil 4.3: Örneklerle ait cDNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüleri (L: 1 kb DNA ladder, 1: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (Kontrol), 2: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), 3: <i>ura4h⁻</i> x <i>ade5h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂), 4: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (Kontrol), 5: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), 6: <i>ura3h⁻</i> x <i>ade2h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂), 7: 972h ⁻ , 8: 972h ⁻ x 975h ⁺).	43
Şekil 4.4: Ters-transkriptaz PCR sonucu jel elektroforezi görüntüleri (L1: 100 bp DNA ladder, 1: 55°C, 2: 56°C, 3: 57°C, 4: 58°C, 5: 59°C, L2: 1 kb DNA Ladder).....	44

Şekil 4.5: Aktin geni için standart eğri grafiği (1, 1/5, 1/25, 1/125 oranlarında sulandırılmış örnekler).	45
Şekil 4.6: Aktin ve <i>rec12</i> primerlerinin erime eğrisi grafiği.	45
Şekil 4.7: <i>Rec12</i> geni rölatif mRNA seviyelerinin karşılaştırılması (K1: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> (Kontrol), A: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), B: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂), K2: <i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i> (Kontrol), C: <i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i> (0.5 M CuSO ₄), D: <i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i> (1 mM H ₂ O ₂)).	46
Şekil 4.8: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> ırkları askus karşılaştırması (A: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> Kontrol Görünür Işık altında inceleme, AF: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> Kontrol Floresan Işık altında inceleme, B: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> 0.5 M CuSO ₄ Görünür Işık altında inceleme, BF: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> 0.5 M CuSO ₄ Floresan Işık altında inceleme, C: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> 1 mM H ₂ O ₂ Görünür Işık altında inceleme, CF: <i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i> 1 mM H ₂ O ₂ Floresan Işık altında inceleme)... ..	47
Şekil 4.9: 972 <i>h⁻</i> ve 975 <i>h⁺</i> ırklarında tirozinin çaprazlamadaki etkisinin karşılaştırması (A: 972 <i>h⁻</i> ve 975 <i>h⁺</i> Kontrol, B: 972 <i>h⁻</i> ve 975 <i>h⁺</i> Tirozinli SPA).	48

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan suşlar.	20
Tablo 3.2: “Yeast Extract Agar” (YEA) zengin besi ortamı içeriği.	21
Tablo 3.3: “Minimal Medium Agar” (MMA) Minimal Besi Ortamı içeriği.....	21
Tablo 3.4: MMA besi ortamı içeriğindeki stok solüsyon A1.	22
Tablo 3.5: MMA besi ortamı içeriğindeki stok solüsyon A2.	22
Tablo 3.6: MMA ve SPA (Yapay Sporulasyon Agar) besi ortamları içeriğindeki stok solüsyon 3a.....	23
Tablo 3.7: MMA ve SPA besi ortamları içeriğindeki stok solüsyon 3b.	23
Tablo 3.8: “Sporulation Agar” (SPA) Yapay Sporulasyon Agar besi ortamı içeriği	24
Tablo 3.9: Hücrelere uygulanan stres koşulları.	25
Tablo 3.10: Hücrelere uygulanan stres koşullarının hazırlanışı.	25
Tablo 3.11: Çaprazlanan hücreler.	25
Tablo 3.12: 10X TAE (Tris-EDTA) tamponu.	28
Tablo 3.13: PBS hazırlanması.	29
Tablo 3.14: 10X MOPS hazırlanması.	30
Tablo 3.15: MOPS'lu jel için gerekli tampon ve solüsyonlar.	30
Tablo 3.16: 6X Yükleme tamponu.....	32
Tablo 3.17: Primer - kalıp karışımı (Tek örnek için).	33
Tablo 3.18: cDNA sentezinin ikinci aşamasında reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.	33
Tablo 3.19: Tasarlanan primer dizileri.....	35
Tablo 3.20: PCR bileşenleri.	36
Tablo 3.21: PCR koşulları.	36

Tablo 3.22: RT-PCR'da kullanılan primer dizileri.....	38
Tablo 3.23: RT-PCR için PCR karışımı.	38
Tablo 3.24: RT-PCR koşulları.	39
Tablo 4.1: Rekombinasyon değerleri.	40
Tablo 4.2: Örneklerden elde edilen total RNA izolasyonu bulguları.	42
Tablo 4.3: Aktin geni için oluşturulan standart grafiğin istatistiksel verileri.	45



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	: Amonyum sülfat
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
atm	: atmosfer
$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	: Sodyum asetat
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CuSO_4	: Bakır (II) sülfat
FeCl_3	: Demir (III) klorür
g	: gram
H_2O_2	: Hidrojen peroksit
H_3BO_4	: Borik asit
Kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum klorür
KH_2PO_4	: Potasyumdihidrojen fosfat
KI	: Potasyum iyodür
L	: litre
M	: Molar
Mb	: Megabaz
mg	: miligram
MgCl_2	: Magnezyum klorür
MgSO_4	: Magnezyum sülfat
ml	: mililitre
mM	: milimolar
mm	: milimetre
MnSO_4	: Mangan (II) sülfat
Na_2HPO_4	: Disodyum hidrojen fosfat
Na_2MoO_4	: Sodyum molibdat
NaCl	: Sodyum klorür

NaOH	: Sodyum hidroksit
pmol	: pikomol
U	: Ünite
V	: Volt
ZnSO₄	: Çinko sülfat
µl	: mikrolitre
µm	: mikrometre



Kısaltmalar	Açıklama
bç	: Baz çifti
BLAST	: ‘‘Basic Local Alignment Search Tool ‘‘
DAPI	: ‘‘4',6-diamidino-2-phenylindole’’ (4',6-diamidino-2-fenilindol)
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DMSO	: Dimetil sülfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
MMA	: ‘‘Minimal Medium Agar’’ (Minimal katı besiyeri)
MOBS	: 3-(N-morfolino) propanesülfonik asit
NCBI	: ‘‘The National Center for Biotechnology Information’’
PBS	: ‘‘Phosphate Buffer Saline’’ (Tuzlu fosfat tamponu)
PCR	: ‘‘Polymerase Chain Reaction’’ (Polimeraz zincir reaksiyonu)
RNA	: Ribonükleik asit
SPA	: Yapay Sporulasyon Agar
rpm	: ‘‘Revolutions per minute’’ (Dakikada devir sayısı)
TAE	: Tris-asetat EDTA tamponu
YEA	: ‘‘Yeast Extract Agar’’ (Maya ekstreli katı besiyeri)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTAM KOŞULLARININ *Schizosaccharomyces pombe*'DE *Rec12* GEN ANLATIMI VE HOMOLOG REKOMBİNASYON ÜZERİNE ETKİSİ

Deniz YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER

Schizosaccharomyces pombe'nin *Rec12* geninin proteini, 345 amino asit içerir ve çapraz geçişli krosingoverli rekombinasyon için gereklidir. Homolog rekombinasyon, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genom kararlılığını sürdürmesinde önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada tek hücreli ve ökaryotik bir model organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'de çeşitli stres koşulları altında *Rec12*, gen anlatımı ve homolog rekombinasyonundaki değişikliklerin karşılaştırmalı olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Rekombinasyon frekansını artırmak için aynı kromozom üzerinde, birbirinden uzakta yerleşmiş genler bakımından mutan *Schizosaccharomyces pombe* ırkları İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik laboratuvarının stoklarından seçilerek çaprazlandı ve %90 oranında zigot aşamasında bulunan hücrelere, CuSO₄ ve H₂O₂ stresi uygulandı. Kontrol ve stres uygulanmış örneklerden, Random Spor Analizi yapıldı. Stres uygulanmış ve uygulanmamış zigotlardan RNA izole edildi ve revers transkripsiyon PCR yöntemi ile cDNA elde edildi. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak, *Schizosaccharomyces pombe Rec12* geninin farklı koşullardaki anlatımı değerlendirildi.

Ayrıca stres koşullarının homolog rekombinasyon üzerine etkisinin anlaşılması için Random Spor analizi yöntemi ile elde edilen rekombinasyon frekansı, moleküler

yöntemi kullanılarak, *Schizosaccharomyces pombe* *Rec12* geninin farklı koşullardaki anlatımı değerlendirildi.

Ayrıca stres koşullarının homolog rekombinasyon üzerine etkisinin anlaşılması için Random Spor analizi yöntemi ile elde edilen rekombinasyon frekansı, moleküler teknikler ile birlikte değerlendirildi. RT-PCR verileri ile karşılaştırılma yapıldığında, gen anlatımının azaldığı stres koşullarında, homolog rekombinasyon frekansında düşüş belirlendi.

Florasın mikroskobu ile yapılan görüntülemelerde CuSO₄ stresi uygulanmış askuslarının bazılarında morfolojik farklılıklar gözlemlendi.

Ekim 2016, 74 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*, *rec12* geni, homolog rekombinasyon, stres.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECT OF ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON *Rec12* GENE EXPRESSION AND HOMOLOGOUS RECOMBINATION IN *Schizosaccharomyces pombe*

Deniz YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Semian KARAER UZUNER

Schizosaccharomyces pombe Rec12 gene is coding 345 amino acid protein and it is required for crossover recombinations. Homologous recombination is important for prokaryotic and eukaryotic organisms to maintain their genome stability.

In this study, our aim was to carry out a comparative research about how stress conditions are affecting the gene expression and homologous recombination of the unicellular, eukaryotic model organism *Schizosaccharomyces pombe*'s *Rec12* gene.

In order to increase the recombination frequency, suitable *Schizosaccharomyces pombe* mutant strains were chosen from Istanbul University Molecular Biology and Genetics Laboratory collection, which possess distant located genes on the same chromosome, and were crossbred. When zygotes were observed at the rate of %90, CuSO₄ and H₂O₂ stress conditions were applied. Random Spore Analysis was performed for some control and stressed samples. RNA isolation was performed for control and stressed zygotes and cDNA's were obtained by reverse-transcription PCR method. *Schizosaccharomyces pombe Rec12* gene expression level was analyzed by RT-PCR.

In order to understand how stress conditions affect homologous recombination, recombination frequency was evaluated along with molecular techniques. Results that

In order to understand how stress conditions affect homologous recombination, recombination frequency was evaluated along with molecular techniques. Results that have been presented here showed that, recombination frequency and gene expression levels decreased proportionally depending on the stress condition.

Observation by fluorescence microscopy showed morphological changes on some CuSO₄ stressed asci.

October 2016, 74 pages.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, *rec12* gene, homologous recombination, stres.



1. GİRİŞ

Homolog rekombinasyon, homoloji gösteren DNA dizileri arası etkileşimi ifade eder ve prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genom kararlılığını sürdürmesinde önemli rol oynar. Mitotik hücrelerin çift iplik kırıklarını “Double-strand Breaks” (DSBs) ve tek iplik boşluğunu tamir etmek görevleri arasındadır (Krogh ve Symington, 2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rec12 proteini, 345 amino asit içerir ve topoizomerez VI katalitik alt biriminin mayoza özgü ortoloğu olup rekombinasyonu başlatan DNA çift iplikli kırıklarını katalize eder. (Sharif ve diğ., 2002).

Hücre döngüsü düzenlenmesi, eşey farklılaşması ve hücre büyümesi çalışmalarında kullanılan önemli bir organizma olan *S. pombe* (Lundblad ve Struhl, 2008), vejetatif ve seksüel yaşam döngüleri arasındaki geçişlerin anlaşılması için önem taşımaktadır (Hayles ve Nurse, 2016).

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*), ökaryotik tek hücreli bir organizma olup, "Fisyon Mayası" olarak bilinen *Ascomycota* şubesine dahil bir maya türüdür (Hoffman ve diğ., 2015). Vejetatif büyüme gösteren hücreler normal şartlarda haploid halde bulunmaktadır. Besin açlığında özellikle de azot kaynağı eksikliğinde, ortamda karşı eşey tipinde birey mevcut ise zigot meydana gelmektedir (Egel, 2004).

Rekombinasyon frekansını hesaplamak, komplementasyon analizi yapmak, aynı bölgede bulunan farklı alleller arası bağlantının doğrulanmasında ve genetik tarama uygulanırken bağlantı analizi yapmak için kullanılan bir yöntem olan Random Spor Analizi, çok miktarda sporun incelenmesine olanak sağladığı için, rekombinasyon haritalamasında ve yeni suşların elde edilmesinde sıklıkla bu yöntemden yararlanılır (Forsburg ve Rhind, 2006) (Khare ve diğ., 2011) (Moreno ve diğ., 1991).

Rekombinasyon frekansı ile karşılaştırmalı analiz yapmak için uyguladığımız gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR veya qPCR) floresan raportör (“Reporter”) moleküllerini kullanarak, polimeraz zincir reaksiyonu esnasında her bir döngüde meydana gelen ürün miktarının tespit edilmesini sağlar. RT-PCR teknolojisi,

DNA'nın çoğaltımı sırasında orantılı bir şekilde artış gösteren floresan sinyallerin değerlendirilmesine dayanır. Belirli sayıda döngü sonrası oluşmuş DNA miktarının ölçümü yerine, RT-PCR döngüler esnasında ilk PCR ürününün oluştuğu noktayı belirler (Bustin, 2005).

Bu tez çalışmasında farklı stres koşullarının *S. pombe*'nin *Rec12* geni üzerindeki etkileri araştırılmıştır. RT-PCR yöntemi ile gen anlatımındaki değişimler incelenmiştir ve Random Spor Analizi ile homolog rekombinasyondaki farklılıklar saptanmıştır.



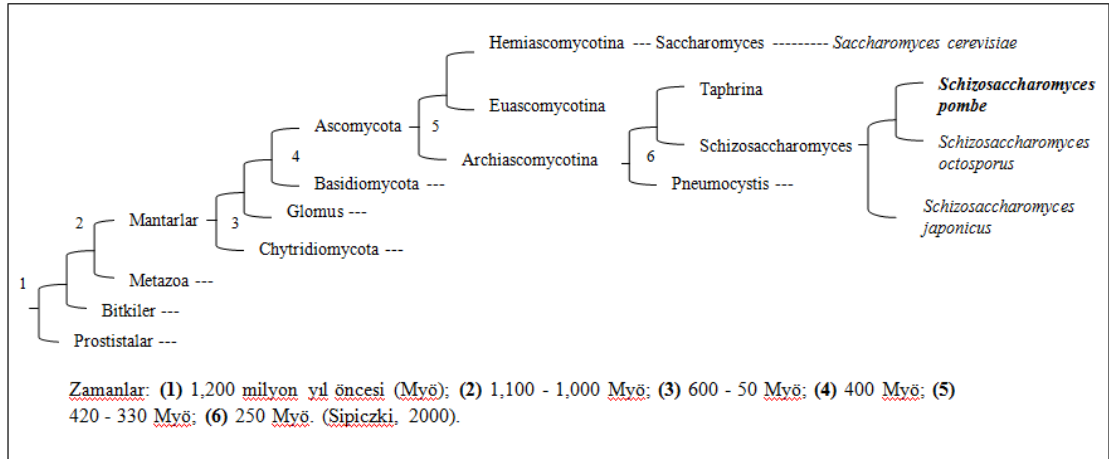
2. GENEL KISIMLAR

2.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Mayalar, mantarlar aleminin içerisinde Ascomycetes ve Basidiomycetes olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Bu ayırım, şekerleri fermente etme yetenekleri ve tek hücreli yaşam şekillerine bağlı olarak yapılır. "Fisyon Mayası" olarak da bilinen *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*), *Ascomycota* şubesine dahil bir maya türüdür. Bu şubenin karakteristik özelliği, seksüel sporların "askus" adı verilen özelleşmiş bir yapı içinde bulunmasıdır (Hoffman ve diğ., 2015).

DNA dizileme verileri ve proteinler esas alınarak incelendiğinde, *Schizosaccharomyces* cinsi Taphrinomycetes sınıfına dahil, 'temel' *Ascomycete* olarak belirtilmektedir (Hoffman ve diğ., 2015).

Schizosaccharomyces pombe ve *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) arasında bulunan evrimsel uzaklığın, memeliler ve diğer mayalar arasında bulunan uzaklığa denk olduğu belirtilmektedir (Sipiczki 2000; Heckman ve diğ., 2001). Ancak, *S. pombe*'nin ortak atadan ayrıldıktan sonra çok daha az evrimsel değişimden geçtiği gözlemlendiği için, *S. cerevisiae*'ye kıyasla daha "eskiden kalma" olduğu düşünülmektedir (Hoffman ve diğ., 2015).



Şekil 2.1: Fiyon mayalarının filogenetik sınıflandırılması (Sipiczki, 2000).

1940'ların sonunda Urs Leopold'un girişimi ile *S. pombe*'de çalışmalar başlamıştır (Leupold, 1993).

S. pombe, $972h^-$ (heterotallik) , $975h^+$ (heterotallik) ve $968h^{90}$ (homotallik) olmak üzere farklı eşey tiplerine sahiptir (Kohli ve diğ., 1977). $968h^{90}$ kendi kendine eşleşebilme özelliği gösterir ancak $975h^+$ ve $972h^-$ yalnızca birbirleriyle eşleşip diploid hücre meydana getirebilirler. Vejetatif büyüme gösteren hücreler normal şartlarda haploid halde bulunmaktadır. Besin açlığında özellikle de azot kaynağı eksikliğinde, ortamda karşı eşey tipinde birey mevcut ise zigot meydana gelmektedir (Egel, 2004).

S. cerevisiae ve *S. pombe* kapsamlı bir şekilde karakterizasyonu yapılmış ve genomları tamamen dizilenmiş ökaryotik model organizmalardır. Maya genomu boyutunun küçük olmasına karşın, yüksek ökaryotların sahip olduğu genetik özelliklerin çoğunu içermektedir. Çoğu hücresel sürecin farklı ökaryotik türler arasında korunmuş olması, mayaları moleküler biyolojide önemli model organizmalar haline getirmektedir (Lundblad ve Struhl, 2008).

Schizosaccharomyces pombe hücreleri morfolojik olarak silindirik şekillidir ve kenarları yarım küresel biçimlidir. Zengin besiyerinde, logaritmik fazda, yaklaşık 3.5 μm çapındadır. Yeni oluşmuş hücreler yaklaşık 8 μm uzunluğundadır ve hücre döngüleri

boyunca, çapları değişmeden uzamaya devam ederler. Böylece; hücrenin yaşı, boyu ölçülerek belirlenebilmektedir (Hoffman ve diğ., 2015).

S. pombe genom projesi ile, *S. pombe*'de genom boyutunun 13.8 Mb olduğu belirlenmiştir (Wood ve diğ., 2002). *S. cerevisiae* ile yaklaşık aynı değerlerdeki genom boyutuna rağmen, *S. pombe*'nin 5.7 Mb (Kromozom I), 4.6 Mb (Kromozom II) ve 3.5 Mb (Kromozom III) boyutunda  büyük kromozomu bulunmaktadır (Hoffman ve diğ., 2015). *S. pombe*'de protein kodlayan gen sayısı (*S. pombe* veritabanı olan PomBase verileri temel alınarak) 5118 olarak belirlenmiştir.

S. pombe memeli hücrelerine benzer şekilde, ortadan ikiye bölünerek eşit büyüklükte iki yavru hücre meydana getirmektedir (Hoffman ve diğ., 2015). Nüklear DNA mitozdan çok kısa bir süre sonra replikasyon geçirir (Nasmyth ve diğ. 1979). Dolayısıyla, mitoz ile hücre bölünmesi arasında, septum ikiye blnene kadar iki tane eşlenmemiş nukleusun bulunduğu, kısa bir G1 fazı gerçekleşir. S fazında septum oluşumu görülmeye devam ederken yeni meydana gelen kardeş hücreler G2 fazında belirginleşir. Hücreler sitokinezden sonra, yaşam çevrimlerinin yaklaşık üçte birini, bir sonraki mitoz bölünmeye kadar G2 fazında bekleyerek geçirirler. Buna bağlı olarak, çoğalan bir popülasyonda bulunan, neredeyse tüm haploid hücreler iki takım kromozomal kopya içerirler (Hoffman ve diğ., 2015).

S. pombe; hücre dnęs düzenlenmesi, eşey farklılaşması, kromozom dinamikleri ve hücre büyümesi çalışmalarında kullanılan önemli bir organizmadır (Lundblad ve Struhl, 2008). Vejetatif ve seksüel yaşam dnęleri arasındaki geçişlerin anlaşılması için de önem taşımaktadır (Hayles ve Nurse, 2016).

2.2. HOMOLOG REKOMBİNASYON

Rekombinasyon, DNA molekülleri arası değiş-tokuşu ya da transferi ifade eder. Homolog rekombinasyon ise homoloji gösteren DNA dizileri arası etkileşimi kapsar. Homoloji göstermeyen veya çok az gösteren diziler arası rekombinasyonlar ise homolog

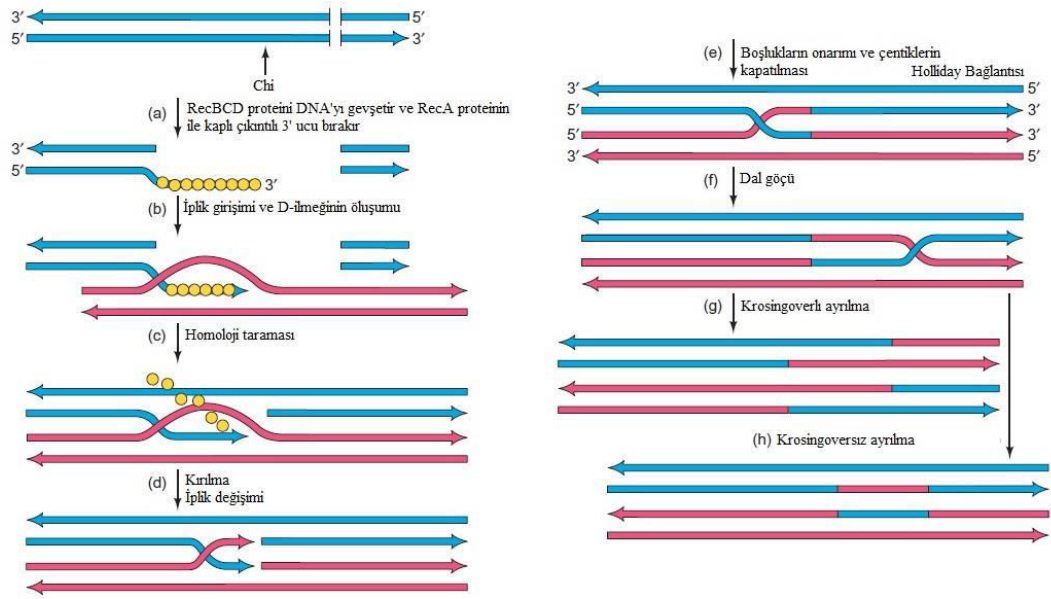
olmayan rekombinasyon (Nonhomologous Recombination End Joining ‘‘NHEJ’’) olarak adlandırılır (Krogh ve Symington, 2004).

Homolog rekombinasyon, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların genom kararlılığını sürdürmesinde önemli rol oynar. Birincil görevi, mitotik hücrelerin çift iplik kırıklarını ‘‘Double-strand Breaks’’ (DSBs) tamir etmektir. Ayrıca replikasyon çatalının zarar görmesinden dolayı veya DNA’ya zarar veren ajanların yarattığı hasarlardan dolayı meydana gelmiş tek iplik boşluğunu tamir etmektedir. Homolog rekombinasyon, mayoz esnasında, homolog kromozomlar arasında fiziksel bir etkileşim yaratmaktadır (Krogh ve Symington, 2004).

Mayaların ökaryotik organizmalarda rekombinasyonun araştırılması için önemli bir sistem olduğu ortaya konulmuştur (Krogh ve Symington, 2004).

S. pombe’de mayotik DNA kırıklarının oluşması için birden fazla genin ürünü iş görür. Rec6, Rec7, Rec12, Rec14 ve Rec15 proteinleri mayotik rekombinasyon ve DNA kırıklarının oluşması için çok gereklidir. Dolayısıyla, *S. pombe*’de rekombinasyon ve DNA kırıkları birbirleri ile bağlantılıdır (Young ve diğ., 2002).

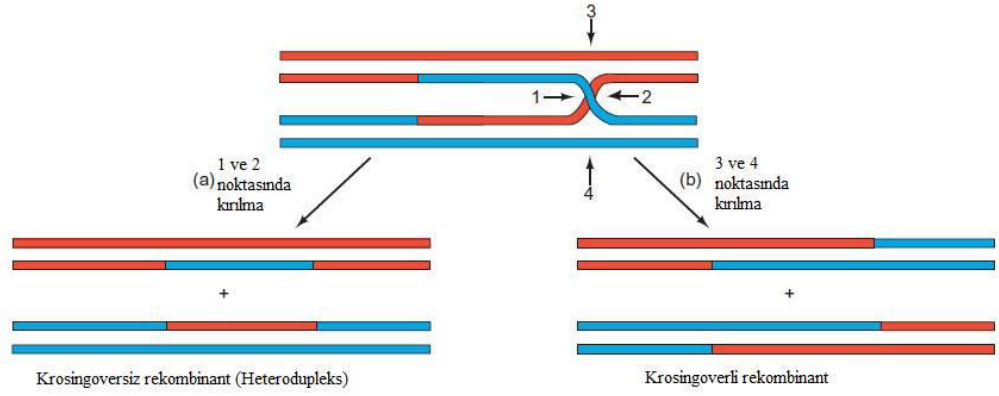
Prokaryotik organizmalarda gözlenen rekombinasyon işlemi, homoloji gösteren DNA ipliklerinin birinde çift-iplikli kırığın tetiklenmesi ile başlamakta, recB, recC ve recD proteinlerinin ürünü olan RecBCD proteininin DNA çift iplik kırığına bağlanması ile devam etmektedir (Şekil 2.2). RecBCD proteini DNA’yı 5’-GCTGGTGG-3’ dizilerini içeren ve ‘‘Crossover Hotspot Instigator’’ (Chi veya x) olarak adlandırılan diziden DNA helikaz aktivitesiyle çözmektedir. RecBCD proteinin çift iplik ve tek iplik ekzonükleaz ve tek iplik endonükleaz aktivitesi bulunmaktadır. Bu aktivite, RecBCD proteininin, RecA proteini ile sarılı tek iplik ucu oluşturmaya olanak sağlamaktadır (Şekil 2.3) (Weaver, 2011).



Şekil 2.2: Homolog rekombinasyonda RecBCD yolağı (Weaver, 2011).

(a) RecBCD proteini çift iplikli DNA kırığına bağlanır ve DNA helikaz aktivitesi ile DNA'yı Chi bölgesine doğru yönlendirir. Böylelikle, RecA proteini (sarı daireler) kaplı tek iplikli 3' - uç meydana getirir. (b) RecA proteini D-ilmeğini oluşturarak diğer DNA çift sarmalına girişi sağlar. (c) RecA proteini, alıcı görevi üstlenen çift iplikli DNA'da homoloji gösteren bölgenin bulunmasına yardımcı olur. İplik, homolog bölge ile baz eşleşmesi gerçekleştirdiğinde RecA'dan ayrılır. (d) Homolog bölge bulunduktan sonra ilmekte kırılma meydana gelir. Diğer DNA'daki tek iplikli bölgede baz eşleşmesi meydana gelir. (e) Geriye kalan boşluklar doldurulur ve kırıklar DNA ligaz tarafından birleştirilir, Holliday bağlantısı oluşur. (f) Dal göçü meydana gelir. (g) ve (h) Yapı, krosingoverli rekombinant veya heterodupleks olmak üzere iki moleküle ayrılabilir.

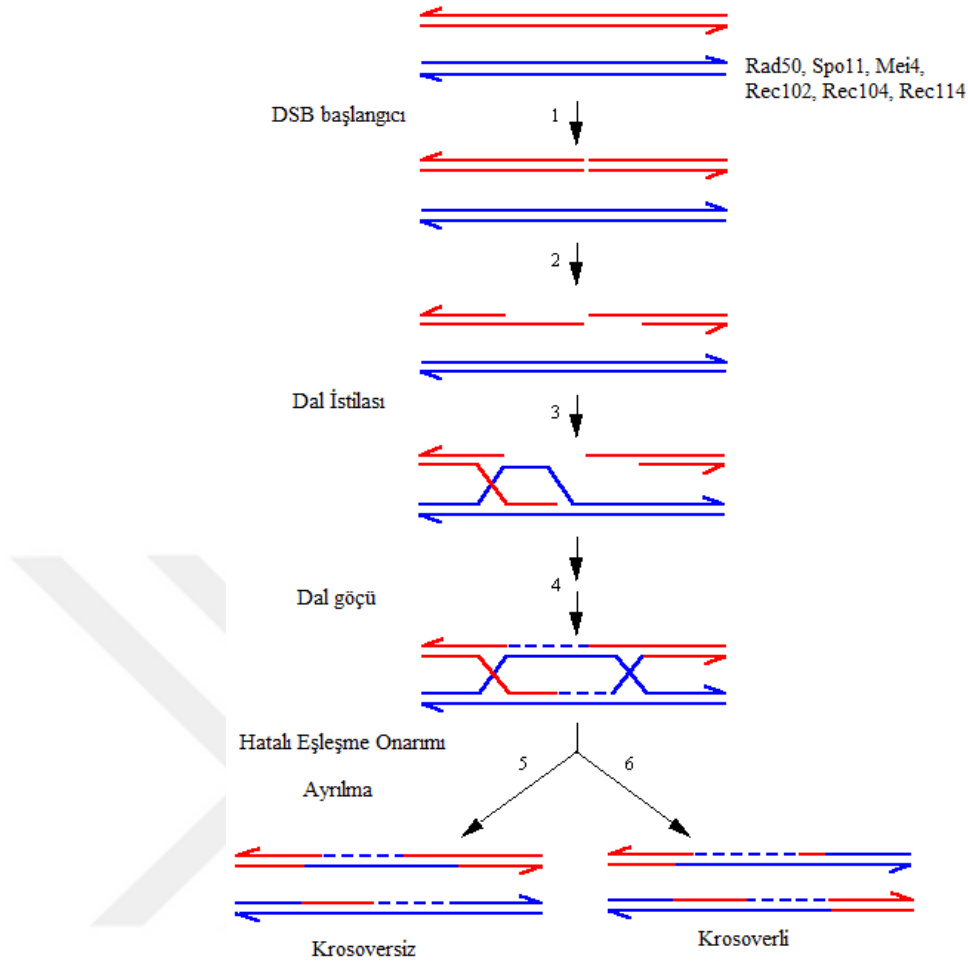
Holliday bağlantısında içteki zincirler kırılırsa krosoversiz rekombinantlar, bağlantı noktasında dıştaki iplikler kırılırsa krosoverli rekombinantlar serbest kalmaktadır (Weaver, 2011).



Şekil 2.3: Holiday bağlantısının ayrılması (Weaver, 2011).

(a) 1 ve 2 noktalarında kırılmayla oluşan ürün heterodupleks DNA parçası içeren dupleks DNA'dır. (b) 3 ve 4 noktalarında kırılmayla oluşan ürün krosingoverli rekombinant moleküldür.

Ökaryotik organizmalarda gözlenen rekombinasyona çift iplik kırıkları tamir mekanizması örnek verilebilir (Smith ve diğ., 2001) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Çift İplik Kırıklarının (DSB) tamir mekanizması (Smith ve diğ., 2001).

(1) ve (2) Spo11 nükleazı DSB'leri başlatır. (3) Tek iplikli 3'- uçlardan bir tanesi dilmeğinin yerine geçer. (4) Çift Holliday bağlantısı oluşur ve dal göçü meydana gelir. (5) ve (6) Yapı, krosoverli rekombinant veya krosoversiz rekombinant olmak üzere iki moleküle ayrılabilir.

2.3. ÇALIŞMADA HEDEFLENEN *Rec12* GENİ

Schizosaccharomyces pombe Rec12 (*S. cerevisiae* ortoloğu Spo11) geninin proteini, topoizomeraz VI katalitik alt biriminin mayoza özgü ortoloğudur ve rekombinasyonu başlatan DNA çift iplikli kırıklarını katalize eder (DeWall ve diğ., 2005). Rec12, 345 amino asit içeren bir proteindir ve çapraz geçişli krosingoverli rekombinasyon için ve Mayoz I'de kromozomların kiazmatik ayrışması için gereklidir (Sharif ve diğ., 2002).

Spo11 homologları birçok ökaryotta tanımlanmıştır ve Spo11-bağımlı çift iplik kırılmaları ile mayotik rekombinasyonun başlaması, bu mekanizmanın evrim süresince korunmuş olduğu göstermektedir (Sharif ve diğ., 2002). *S. cerevisiae*'de çift iplik kırıklarının oluşumunun başlatılması için en az 10 genin ürünü iş görür (Kee ve Keeney, 2001). Spo11 proteini, mayozun ilk aşamalarında gerçekleşen çift iplik kırıklarından sorumludur ve Spo11 aracılığı ile oluşturulmuş kırıklar, mayotik rekombinasyonun başlatılması için gereklidir (Lichten, 2001). Spo11, tanımlanmış ilk rekombinasyon genlerinden biridir (Esposito ve Esposito, 1969).

Mitotik hücrelerde onarılmamış tek bir çift iplik hasarı ölümcül olabilir ve homolog rekombinasyon DNA hasarı onarımı yapmak için kullanılır (Resnick ve Martin, 1976).

Rec12 proteininin etkin bölge "active site" tirozini, krossoverli rekombinasyonu için gereklidir. Rec12 proteinin, Mayoz I'de iki ayrı görevi daha vardır: Katalitik olarak aktive edilmiş Rec12 kiazmatik ayrışma için gereklidir. Katalitik olarak inaktive edilmiş Rec12 proteini akizmatik ayrışmaya olanak sağlar. Ek olarak, Rec12 ve aktif tirozin bölgesi Mayoz II'de gerçekleşecek düzgün bir kromozomal ayrışma için gereklidir (Sharif ve diğ., 2002).

S. pombe mayotik rekombinasyonu homolog kromozomların tetratlar halinde ekvator düzlemine sıralanması, DSB'lerin oluşması ve DSB'lerin tamir edilmesi olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Birinci ve ikinci aşamalar mayoza özgü iken, son aşama mitotik DNA tamiri ile ortak görev yapmaktadır (Cromie ve Smith, 2007).

DSB'ler, diğer proteinlerle uyum içinde çalışan Rec12 proteini tarafından oluşturulur ve kardeş kromatitin veya homolog kromozomun homolog DNA bölgesi ile etkileşimi sayesinde tamir edilir (Cromie ve Smith, 2007). Rec12 nükleozomlar ile direkt ilişki içindedir ve histon modifikasyonlarının, kromatin-Spo11/Rec12 etkileşimlerini değiştirdiği düşünülmektedir (Acquaviva ve diğ., 2013).

Mayotik rekombinasyon, *rec12* geni eksikliğinde, başka DNA bölgeleri tarafından indüklenebilir (Farah ve diğ., 2002).

2.4. *Schizosaccharomyces pombe*'DE OKSİDATİF STRES

Canlı hücreler, içinde bulundukları ortamdaki değişiklikleri algılayıp, tepki verirler. Tek hücreli organizmalar, ortamlarındaki değişikliklere karşı çok daha hassastırlar ve pH, osmotik basınç, sıcaklık değişimi ve toksinlere karşı tepki gösterirler. Gen anlatımının düzenlenmesi, bu tepkilerin en önemlilerinden biridir. Gen anlatımındaki değişikliklerle çeşitli koruyucu proteinlerin miktarı artar ve daha az önemli hücresel aktivitelerde azalma görülür. Bunun sebebi, hücresel kaynakların stres adaptasyonu için kullanılmasına ve zarar görmüş makro moleküllerin tamir edilmesine olanak sağlamaktır (Reiter ve diğ., 2008).

İnsan vücudundaki hücreler günde yaklaşık 1012 oksijen molekülünü metabolize ederler ve bunun sadece ~%1'i Reaktif Oksijen Türlerine (ROS) dönüşür. Süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) reaktif oksijen türlerine örnektir. Bu moleküller yüksek reaktivite gösterikleri için, doğrudan ya da dolaylı olarak DNA dahil çeşitli hücre makro moleküllerine zarar verirler (Ikner ve Shiozaki, 2005).

Hücreler, DNA'ya verilen zararı onarmak için geri mutasyon, hatalı eşleşme onarımı ("Mismatch Repair") ve DNA eksizyon yolağı gibi çeşitli tamir mekanizmaları geliştirmişlerdir (Gros ve diğ., 2002). Aerobik olarak gelişim gösteren organizmalar, ROS'ların bozulması için tersine etki yaratan enzimler (katalaz, süperoksit dismutaz, peroksidaz) ve süpürücü moleküller (glutatyon, tioredoksin) gibi çeşitli yollar bulundurmaktadırlar. Bu enzim ve moleküller, oksidatif zarara karşı birincil olarak görev almaktadırlar (Ikner ve Shiozaki, 2005).

Çeşitli maya ırkları ile yapılan çalışmalarda (*S. pombe*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*) MAP (Mitojen aktive eden protein) kinaz kaskadı, çok adımlı fosforil ("Phosphorelay") ve AP-1 (Aktivatör protein 1) benzeri transkripsiyon faktörü olmak üzere üç adet korunmuş oksidatif stres sinyal yanıtı tanımlanmıştır (Ikner ve Shiozaki, 2005). Stres ile aktif hale geçen MAP kinaz yolağı, tüm ökaryotlarda ortaktır (Reiter ve diğ., 2008). MAP Kinaz kaskadları, homeostasi, proliferasyon, hücre ölümü gibi birçok hücresel sürecin düzenlenmesinde görev almaktadır (Ikner ve Shiozaki, 2005).

S. pombe'de stres yanıtı olarak, MAP Kinaz yolağı aktif hale geçer ve bu yolak, üç adet korunmuş protein kinaz seti (Sty1, Atf1, Pap1) içerir. Sty1, osmotik stres, oksidatif stres ve yüksek sıcaklık streslerine yanıtta çok önemlidir (Shiozaki ve Russell, 1995). Atf1 ve Pap1 transkripsiyon faktörleri, Sty1 tarafından tetiklenir. Atf1 osmotik stres altındaki hücrelerin bölünmesinden sorumludur, Pap1 ise oksidatif stres altındaki hücrelerdeki stres yanıtında görev alır. (Chen ve diğ., 2003) (Reiter ve diğ., 2008).

Pap1 transkripsiyon faktörü, Sty1'le karşılaştırıldığında, hidrojen peroksit stresine karşı çok daha fazla duyarlıdır. İki yolak da oksidatif stres koşulları altında hücrelerin hayatta kalması için gereklidir ancak aerobik büyüme sırasında hücrelerin yaşayabilme yeteneklerini sürdürmeleri için gerekli değildir (Vivancos ve diğ., 2006).

Geçiş metalleri, elektron alıp-verme yeteneklerinden dolayı, çok büyük önem taşırlar ve demir, bakır, manganez gibi metaller, redoks reaksiyonlarını katalize eden proteinlerde bulunurlar. Ancak bu metal iyonlarının miktarının fazlalaşması, hücrelerde toksik etki gösterir (De Freitas ve diğ., 2002).

Hemen hemen tüm canlı hücreler, demir taşınması, oksidatif stresten korunma, hormon üretimi, kan pıhtılaşması ve hücre büyümesi gibi biyolojik süreçler için bakıra ihtiyaç duyarlar (Puig ve Thiele, 2002) .

Birçok enzimin kofaktörü olan bakır, konsantrasyonuna bağlı olarak mikro organizmalarda geniş çaplı zararlara yol açabilir. Bakır, hidrojen peroksit ve süperoksit anyonu ile rahatlıkla tepkimeye girer ve karbonhidratları, amino asitleri, fosfolipidleri ve nükleik asitleri okside edebilen hidroksil radikallerinin açığa çıkmasına sebep olur (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Bunun sonucunda büyüme baskılanması, fizyolojik aktivitenin azalması, membran bütünlüğünün bozulması, mutagenез ve hücrenin canlılığını yitirmesi gözlenebilir (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Aynı zamanda, maya plazma membranının spesifik olmayan geçirgenliğinin artmasına sebep olur (Ohsumi ve diğ., 1988).

Bakır taşınmasında önemli olan Ctr protein ailesi, mayalarda, bitkilerde ve memelilerde korunmuştur Hücre içine bakır alınırken, *S. cerevisiae*'de bağımsız Ctr1 ve Ctr3 bakır

taşıyıcı “transporter” molekülleri, *S. pombe*’de ise Ctr4, Ctr5 ve Ctr6 proteinlerinin oluşturduğu heteromerik kompleks yapı iş görür. Tüm Ctr proteinleri birbirleri ile yapısal olarak bağlantılıdır (Puig ve Thiele, 2002) (Rustici ve diğ., 2007).

S. cerevisiae’de bakır bağlayan Atx1, Ccs1 ve Cox17 isimli üç protein belirlenmiştir. Bu proteinler, bakırı spesifik hücre içi bölgelere taşıyan şaperonlardır. *S. pombe*’de bu proteinlerin homologlarının bulunduğu düşünülmektedir ancak deneysel olarak sadece Pccs isimli bir tanesi kanıtlanmıştır. Bu protein, *S. cerevisiae*’de bulunan Ccs1 proteinin ortoloğudur ve fisyon mayasının bakır ve kadmiyum stresine maruz kaldığı durumlarda, yaşamını devam ettirmesi için önem taşımaktadır (Laliberte ve diğ., 2004) (Chardeen ve diğ., 2008).

Bakır iyonları redoks özelliği aracılığı ile ATP sentezi, ROS yıkımı gibi önemli metabolik reaksiyonlara katılırlar (Waggoner ve diğ., 1999). Aynı özellikten dolayı, yüksek konsantrasyonlarda kuvvetli toksin özelliği gösterirler. Bakırın hücre içi konsantrasyonu ve aktivitesi, homeostatik mekanizmalar tarafından sıkı bir biçimde kontrol altında tutulmaktadır (Tarhan ve Sarıkaya, 2012).

2.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN YÖNTEMLER

2.5.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR veya qPCR) floresan raportör (“Reporter”) moleküllerini kullanarak, polimeraz zincir reaksiyonu esnasında her bir döngüde meydana gelen ürün miktarının tespit edilmesini sağlar. Bu yöntem, DNA çoğaltımını ve saptanmasını tek bir adımda birleştirerek, ürünlerin jel elektroforezi ile tayin edilmesi ihtiyacını gereksiz kılmaktadır (Bustin, 2005).

RT-PCR teknolojisi, DNA’nın çoğaltımı sırasında orantılı bir şekilde artış gösteren floresan sinyallerin değerlendirilmesine dayanır. Belirli sayıda döngü sonrası meydana gelen DNA miktarının ölçümü yerine, RT-PCR döngüler esnasında ilk PCR ürününün oluştuğu noktayı belirler (Bustin, 2005).

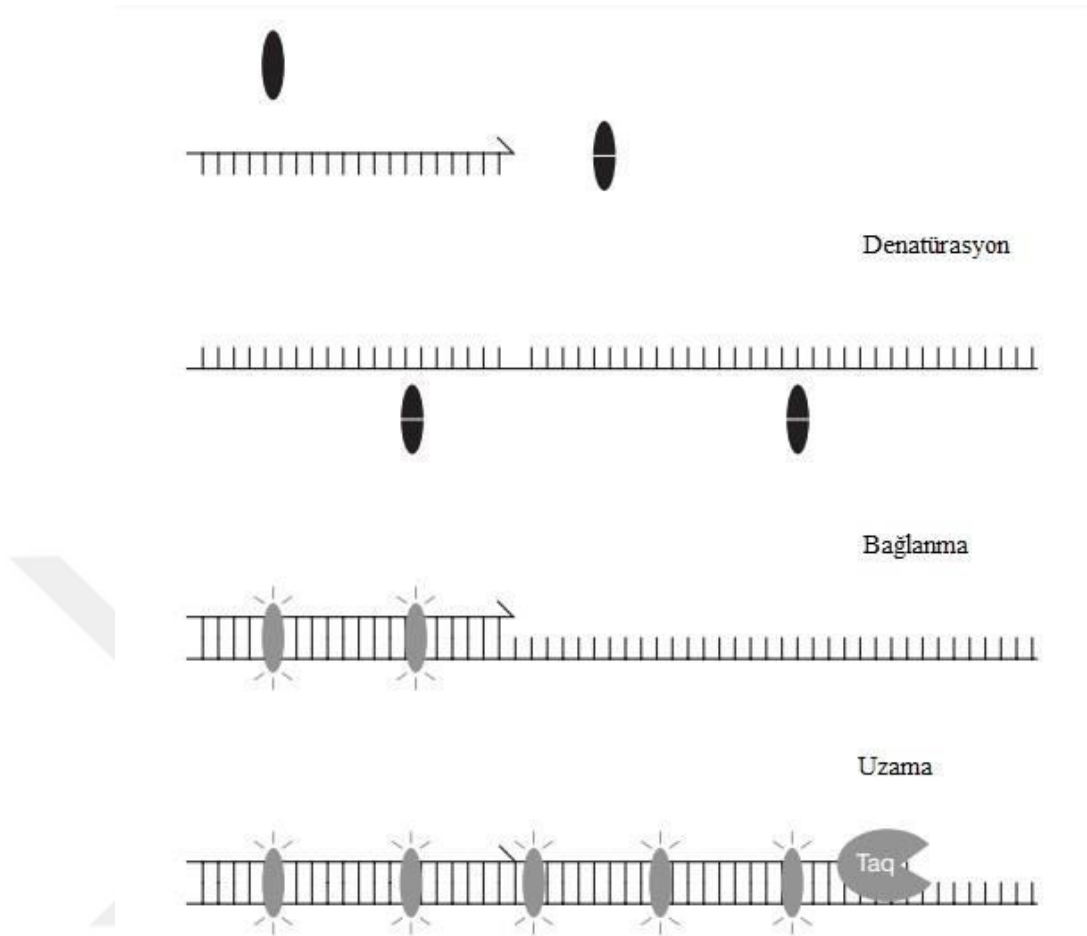
Raportör boya emisyon yoğunluğunun, arka plan gürültüsünü (“Background noise”) geçtiği döngü sayısı ile belirlenir. Bu döngünün sayısı C_T olarak isimlendirilir (Bustin,

2005) C_T (cycle threshold) floresan sinyal miktarının, gözlemlenebilmesi için gereken eşik değerini geçtiği döngü sayısına verilen addır (Schmittgen ve Livak, 2008). C_T değeri, PCR reaksiyonunun logaritmik fazında hesaplanır ve hedef kopya sayısı ile ters orantılıdır (Bustin, 2005).

RT-PCR'da floresan sinyal olarak, nonspesifik olarak DNA'ya bağlanan floresan boyalar (SYBR® Green I, Eva Green™) diziye özgü proplar (TaqMan®, hibridizasyon probları) veya işaretli primerler (LUX™, Plexor) kullanılabilir (Bustin, 2005) (Dorak, 2006).

SYBR® Green I sadece çift iplikli DNA'ya bağlanan bir floresan boyadır ve çift iplikli DNA miktarıyla doğru orantılı olarak floresan ışıma yapar. RT-PCR'ın ilk döngülerinde, SYBR® Green I tarafından yapılan ışıma arka plan gürültüsünü yoğunluğunu geçemez. Işıma, logaritmik faza geçildiğinde her bir döngüde iki kat artar. Her bir döngüde iki kat artış gösteren ışıma miktarı, iyi şekilde optimize edilmiş deney göstergesidir. Otuz ile otuz beş döngünün ardından, floresan ışıma durağanlaşır. Bu, PCR'ın doygunluğa ulaştığının belirtisidir (Dorak, 2006).

Kolay uygulanması, sadece bir çift primerin yeterli olması, her deney için aynı saptama mekanizmasının kullanılabilmesi ve pahalı olmaması, SYBR® Green I'in yaygın olarak kullanılmasının nedenlerindendir. Olumsuz yanı, reaksiyondaki primer dimerleri gibi tüm çift iplikli moleküllerin sinyal yaymasıdır (Dorak, 2006).

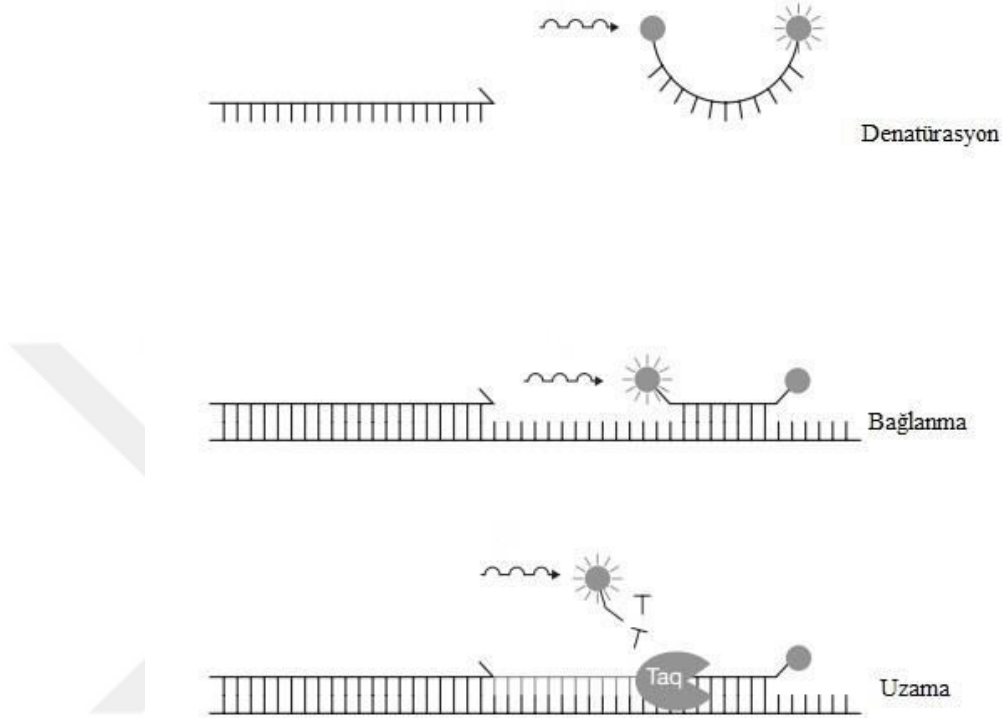


Şekil 2.5: SYBR® Green I'in PCR süresince artan floresan sinyali (Dorak, 2006).

Serbest boya çok az ışıma yapar ve tek iplikli veya denatüre olmuş DNA'ya bağlanmaz. Primer bağlanması (Annealing) sırasında, çift iplikli yapı oluşur ve SYBR® Green I boyası çift iplikli yapıya bağlanarak ışımasını artırır. Taq DNA Polimeraz ile primer uzaması sırasında, SYBR® Green I'in bağlandığı çift iplikli yapı ile doğru orantılı olarak, floresan sinyali artar.

TaqMan® probu, geleneksel olarak 5'- ucundan bir raportör ile, 3' ucundan ise söndürücü ("quencher") diye adlandırılan bir gruba işaretlenmiş lineer oligonükleotiddir. Raportör ile "quencher" grubu karşıt yönlerde de kullanılabilir. Raportör ile "quencher" boyları, solüsyon içerisinde birbirlerine yakın iken sinyal gözlenmez. Prob, hedefi olan tamamlayıcı diziye bağlandığında, iki boya birbirlerinden uzaklaşır ve sinyal gözlenir. Prob temelli kitlerde PCR ürünü baz dizisi, o ürüne özgü

floresan işaretli problarla görüntülenir, bu yüzden çoğalan ürün spesifik biçimde saptanmış olur (Dorak, 2006).

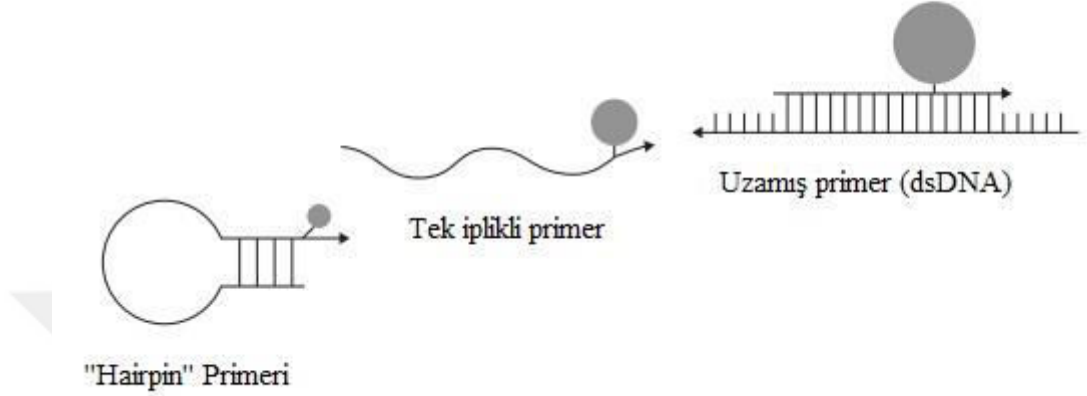


Şekil 2.6: TaqMan® probu ile floresan sinyal oluşumu (Dorak, 2006).

Solüsyon içinde, raportör boya ikinci boya tarafından söndürülür ve sinyal gözlenmez. Reaksiyon bağlanma sıcaklığına erişirken, primere kıyasla daha yüksek sıcaklıkta, prob tamamlayıcı hedef dizisine bağlanır. Taq DNA Polimeraz ile uzama esnasında, probun yeri değiştirilir ve raportör boyanın açığa çıkması ile sinyal gözlenir.

Primer temelli sistemlerde ise, SYBR® Green I'de olduğu gibi PCR ürünü spesifik olarak belirlenemez. LUX™, kendi kendini söndüren ("self-quenched") florojenik primer ve işaretlenmemiş tamamlayıcı çiftini içeren primer setidir. İşaretli primer, 5'-ucunda 46 nükleotidlik bir diziye sahiptir. Bu dizi, primerin 3' ucu ile komplementerdir. Ortaya çıkan ikincil "hairpin" yapısı, floroforun (floresan madde) söndürülmesi için en uygun yapıdır. Primer, çift iplikli DNA'ya bağlandığında, floroforun söndürülmesi biter

ve sinyalde 10 kata kadar artış gözlenir. LUX™ primerleri, TaqMan® problemlerine kıyasla tek bir boya içerdiklerinden, daha uygun fiyatlı ürünlerdir (Dorak, 2006).



Şekil 2.7: LUX™ primerlerinin yapısı ve etki şekli (Dorak, 2006).

LUX™ primerleri, 3' ucu ile komplementasyon gösteren, işaretli primer, 5' ucunda tamamlayıcı dizisi bulunan yapılardır. Meydana gelen "hairpin" yapısı, floresan sinyalin gözlenmesine engel olur. Primerin kalıba bağlanması ile, primer lineer hale geçer ve floresan ışımaya gözlenir.

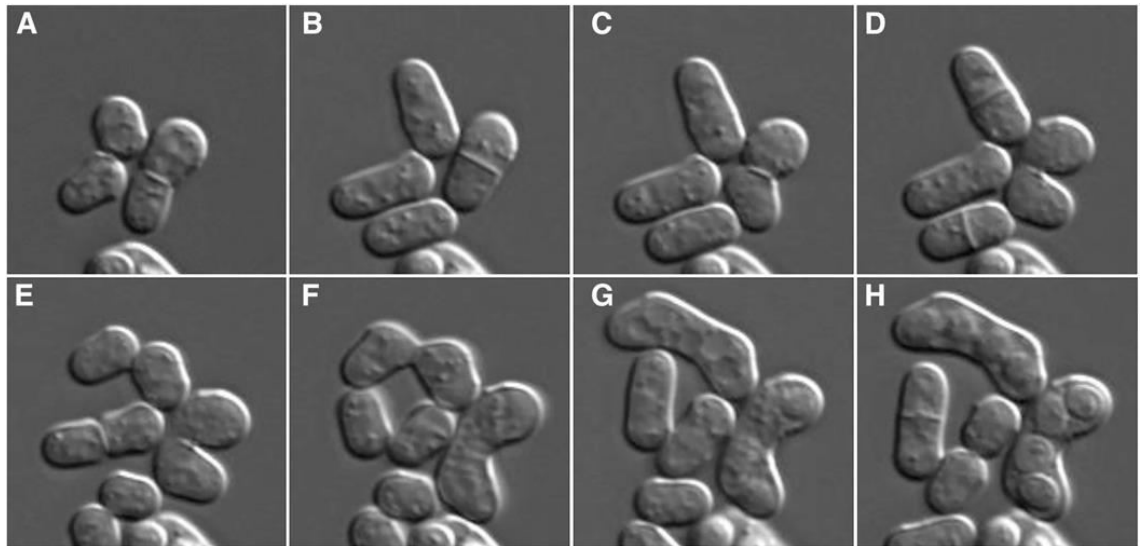
RT-PCR yönteminin kolaylığı, özgül olması, hassasiyeti, güvenilir cihazlar ile iş görmesi ve gelişmiş deneysel protokollere sahip olması yöntemi temel kılar (Bustin, 2005).

2.5.2. *Schizosaccharomyces pombe*'de Eşeyli Üreme ve Random Spor Analizi

Schizosaccharomyces pombe yaşam döngüsü iki fazdan meydana gelir: aseksüel (vejetatif) ve seksüel faz (Egel, 1989; Forsburg ve Nurse, 1991). *S.pombe*'nin, özellikle hücre döngüsü konusunda model organizma olmasının temelinde de vejetatif döngüsünün kontrolü yer alır. Seksüel fazı da birçok çalışmaya konu olmaktadır (Hoffman ve diğ., 2015).

Diploid *S. pombe* hücreleri haploid hücrelerden yaklaşık 4.4 μm daha genişirler ve yaklaşık 24 μm uzunluğa eriştikleri zaman sitokinez geçirirler. Eğer ortamda eşlenebilecekleri hücre bulunmuyorsa ve besin açlığına maruz kalıyorlar ise, haploid hücreler hücre döngüsünden çıkıp durağan faza girer (Hoffman ve diğ., 2015). *S. pombe*'de bulunan olağan dışı özellik ise, nitrojen eksikliğinde G1 fazından durağan faza, glukoz açlığında ise G2 fazından durağan faza geçiş yapmalarıdır (Costello ve diğ., 1986). Ancak eşlenebilecekleri hücreler bulunuyorsa, haploid hücreler seksüel faza geçiş yapar (Hoffman ve diğ., 2015).

Birbirine uygun iki haploid *S. pombe* hücresi, besin açlığı durumunda konjugasyona uğrar (Egel ve Egel-Mitani, 1974; Egel, 1989). Bu birleşme, hücrelerin birbirine tutunması ile başlar, iki nukleus içeren tek bir hücre meydana getirmek için hücre duvarlarının parçalanması ile devam eder. (Şekil 2.7) Ardından, diploid tek nukleusun bulunduğu hücre formu, "zigot" meydana gelir. Zigot oluşumunun ardından hücreler mayotik yolağa girer ve dört haploid çekirdek oluşur. Sonrasında, her nukleusun etrafında spor duvarı meydana gelir. İçinde dört adet spor bulunan zigota "askus" adı verilir. Askus duvarı, zengin içerikli besiyerlerine maruz bırakıldığında parçalanır, sporlar gelişmeye başlar ve vejetatif hücrelere dönüşür (Hoffman ve diğ. 2015).



Şekil 2.8: *S. pombe* hücrelerinin seksüel gelişimi (Hoffman ve diğ., 2015).

(Homotallik 968h⁹⁰ hücreleri EMM besiyerine ekilmiş ve 30°C'de inkübe edilmişlerdir. Fotoğraflar; (A) 0. dakika, (B) 184. dakika, (C) 204. dakika, (D) 254. dakika, (E) 286. dakika, (F) 334. dakika, (G) 446. dakika, (H) 560. dakika'da çekilmişlerdir. *S. pombe* 968h⁹⁰ hücreleri

kendi kendilerini eşleyebildiklerinden dolayı, iki kardeş hücre eşleşmiş ve askus formunu meydana getirmişlerdir (Hoffman ve diğ., 2015).

Random spor analizi *Saccharomyces cerevisiae* ve *Schizosaccharomyces pombe* gibi maya ırklarında farklı bölgeler arası bağlantıyı belirlemeyi ve çaprazlama yaparak yeni rekombinantların oluşumunu sağlayan bir yöntemdir (Khare ve diğ., 2011).

Çok miktarda sporun incelenmesine olanak sağladığı için, rekombinasyon haritalamasında ve yeni suşların elde edilmesinde sıklıkla bu yöntemden yararlanılır (Moreno ve diğ., 1991).

Bu yöntem, tüm askosporların tek tek takip edilmesine ihtiyaç duymaz, böylelikle çok fazla sayıda askospor aynı anda incelenebilir (Khare ve diğ., 2011).

Birçok mantar türünde, askus örnekleri toplamak kolaydır. *Saccharomyces* cinsi ise istisna gösterir, sporlarının toplanması için askuslar cam boncuklarla işlem görürler. Askus duvarları çeşitli enzimlerle muamele edilerek de yıkılabilirler (Siddiqi, 1971).

Random spor analizi için örnek toplanırken iki problem gözlenir; askosporların birbirinden ayrılması ve askosporların vejetatif hücrelerden ayrılması. Askusların “salyangoz enzimleri” ile muamele edilmesinin bulunması ve alkol kullanılarak diploid hücrelerin seçici inaktivasyonunun yapılması ile beraber, bahsedilen problemler ortadan kalkmıştır (Siddiqi, 1971).

Random spor analizi, genetik tarama uygulanırken bağlantı analizi yapmak ve rekombinasyon frekansını saptamak üzere, mutant taraması yapılırken komplementasyon analizi için ve aynı bölgede bulunan farklı alleller arası bağıntının doğrulanmasında kullanılabilen bir yöntemdir (Forsburg ve Rhind, 2006) (Khare ve diğ., 2011).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA

Çalışmada Fungi aleminin Ascomycetes sınıfında yer alan tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) ırkları kullanıldı (Tablo 3.1).

Çalışmada kullanılan suşlar, İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan suşlar.

<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Linder <i>liquifaciens</i> 972h ⁻
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Linder <i>liquifaciens</i> 975h ⁺
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>ura4hΔ</i>)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>ura3h⁻</i>)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>ade2h⁺</i>)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (<i>ade5h⁺</i>)

3.2. BESİ ORTAMLARI

S. pombe hücreleri Gutz ve ark. (1974)'nın ve Leupold (1970) 'un önerdiği şekilde üretildi.

Tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da ve 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edildi. Kullanılan besi ortamlarının içerikleri aşağıdaki tablolarda verildi (Tablo 3.2, 3.3, 3.8).

Tablo 3.2: “Yeast Extract Agar” (YEA) zengin besi ortamı içeriği.

YEA (1L)	
Maya Ekstresi (Yeast Extract)	5 g
Glukoz	30 g
Agar	20 g
Distile su	1000 ml

YEA hazırlamak için Tablo 3.2’de belirtilen bileşenler uygun miktarlarda bir araya getirildi, sterilizasyon sonrası cam tüplere ve petrilere dökülerek hazırlandı.

Tablo 3.3: “Minimal Medium Agar” (MMA) Minimal Besi Ortamı içeriği.

MMA (1L)	
Stok A2	100 ml
Stok 3a	1 ml
Stok 3b	1 ml
Glukoz	10 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1 g
Agar	20 g
Distile su	900 ml

Tablo 3.4: MMA besi ortamı içeriğindeki stok solüsyon A1.

Stok A1 (100 ml)	
H ₃ BO ₄	50 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	4 mg
KI	10 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	53 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	19.5 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	40 mg
Distile su	100 ml

Tablo 3.5: MMA besi ortamı içeriğindeki stok solüsyon A2.

Stok A2 (100 ml)	
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g
NaCl	0.1 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.15 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
Stok A1	1 ml
Distile su	100 ml

Tablo 3.6: MMA ve SPA (Yapay Sporulasyon Agar) besi ortamları içeriğindeki stok solüsyon 3a.

Stok 3a (100 ml)	
Kalsiyum Pantotenat	100 mg
Nikotinik Asit	1 g
Mezoinositol	1 g
Distile su	100 ml

Tablo 3.7: MMA ve SPA besi ortamları içeriğindeki stok solüsyon 3b.

Stok 3b	
Biotin	1 mg
%50 etanol	100 ml

MMA besi ortamı bileşenleri yukarıdaki uygun miktarlarda sırasıyla distile suya eklenerek çözdürüldü. Sterilizasyon sonrası steril petrilere döküldü. Seçici besi ortamı için gerekli metabolitler final konsantrasyon 50 mg/l olacak şekilde ilave edildi.

Tablo 3.8: “Sporulation Agar” (SPA) Yapay Sporulasyon Agar besi ortamı içeriği.

SPA (1L)	
Glukoz	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Stok 3b	1 ml
Stok 3a	1 ml
Agar	30 g
Distile su	1000 ml

SPA bileşenleri yukarıdaki uygun miktarlarda sırasıyla distile suya eklenerek çözdürüldü. Sterilizasyon sonrası steril cam tüplere döküldü.

3.3.ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

Çalışmada kullanılan (Tablo 3.1) ırklar 4°C’deki silika jel (çap:0.2-0.5mm) stoklarından alınarak YEA besi ortamı içeren petrilere ekildi. 2 gün, 30°C’de etüvde bekleme sonrasında elde edilen kolonilerden azaltma ekim yapılarak, tek koloniler elde edildi. Bir koloni seçilerek eğri YEA besi ortamına ekilde ve 30°C’de 2 gün bekletilerek tek koloninin çoğaltımı yapıldı. *Ura4h⁻*, *ura3h⁻*, *ade2h⁺* ve *ade3h⁺* mutantlarının genotipleri MMA besi ortamı ve urasil/adenin içeren seçici MMA besi ortamlarında kontrol edildi. Genotipleri kontrol edilen hücreler, eğri YEA besi ortamlarına ekilerek çalışma boyunca 4°C’de saklandı. Hücrelerin genotip kontrolleri ve pasajları belirli aralıklarla yapıldı.

3.4. ÇAPRAZLAMA ÖNCESİ HÜCRELERE STRES UYGULANMASI

Stres uygulanacak *S. pombe* yabani ırklar (972 *h⁻*, 975 *h⁺*), *ura4h⁻*, *ura3h⁻*, *ade2h⁺*, *ade5h⁺* mutant hücreleri öncelikle YEA besi ortamında 30°C’de, 2 gün boyunca üretildi. Hücreler distile su ile toplandı ve 7000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilerek

çöktürüldü. Bu hücreler için Tablo 3.9'da belirtilmiş olan stres koşulları uygulandı. Stres koşulları, Tablo 3.10'da gösterildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.9: Hücrelere uygulanan stres koşulları.

Stres Koşulu	Uygulanma Süresi
Kontrol	-
0.5 M CuSO ₄	60 dakika
1 mM H ₂ O ₂	15 dakika

Tablo 3.10: Hücrelere uygulanan stres koşullarının hazırlanışı.

0.5 M CuSO ₄		1 mM H ₂ O ₂	
CuSO ₄	124.8 g	H ₂ O ₂ Solüsyonu %30 (w/v)	0.1 ml
Distile su	1000 ml	Distile su	1000 ml

3.5. ÇAPRAZLAMA VE ÜREMENİN İZLENMESİ

SPA eğri besi ortamında, Tablo 3.11'de gösterildiği şekilde, ırkların çaprazlamaları yapıldı. Hücreler, çaprazlamanın ardından 25°C'lik etüvde RNA izolasyonu için 2 gün, Random Spor Analizi için 21 gün inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.11: Çaprazlanan hücreler.

$972 h^- \times 975 h^+$
$ura4h^- \times ade5h^+$
$ura3h^- \times ade2h^+$

Çaprazlama sonrası 1., 2. ve 3. günlerde, hücreler mikroskopta incelendi. Zigot aşamasındaki hücreler %90 oranına ulaştığında Bölüm 3.7. de anlatıldığı şekilde RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

Tirozin miktarının çaprazlama üzerindeki etkisinin anlaşılması için YEA besiyerinde üretilmiş 972 *h*⁻ ve 975 *h*⁺ ırkları, 50 mg/L olacak şekilde tirozin eklenmiş SPA'da çaprazlandı.

3.6. RANDOM SPOR ANALİZİ

Random spor analizi, farklı mutantların çaprazlanması ile oluşturulan rekombinantların, kültürdeki miktarını (% olarak) ölçmek için kullanılan bir yöntemdir.

SPA besi ortamında çaprazlanan deney grupları (Tablo 3.11), 21 gün boyunca 25°C'de inkübe edildi. Eğri tüpler 5'er ml distile su ile toplandı ve 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Her bir örnek için 1 ml hücre kültürü, 3 ml %99'luk etanol ve 6 ml distile sudan oluşan karışımlar oluşturularak 18°C'de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu işlem ile vejetatif hücrelerin yok edilmesi ve sporların seçilmesi amaçlandı.

İnkübasyonun ardından 10 kez sulandırma işlemi yapılarak, sporlar alkol etkisinden kurtarıldı.

“Malassez” lamında yapılan spor sayımının ardından MMA besi ortamı içeren petrilere ekim için 10⁻² oranında, YEA besi ortamı içeren petrilere ekim için 10⁻³ oranında sulandırmalar yapıldı ve yayma ekimler gerçekleştirildi. 30°C'de 5 gün inkübasyona bırakıldı. Protokol, Forsburg ve Rhind'in (2006) makalesinden alınıp, uyarlanarak uygulandı.

Random spor analizini gerçekleştirmek için allellerin ikili kombinasyonları iki gruba ayrıldı: parental ve nonparental. Bu ayırım sonrası, rekombinasyon frekansı (RF) ve rekombinasyon oranı $[(RF \times 100) \text{ RF} : \frac{\text{Rekombinant Koloniler}}{\text{Tüm Koloniler}}]$ formülü kullanılarak bulundu.

3.7. ÇAPRAZLAMA SONRASI FLORESAN MİKRSOKOBU İLE GÖRÜNTÜLEME

Tablo 3.11’de belirtilen çaprazlaması yapılmış hücrelerin zigot ve askus görüntüleri Olympus BX53F floresan mikroskobu ile elde edildi. Hücrelerin fotoğrafları 'Olympus cellSens Standart' programı kullanılarak çekildi.

SPA eğri besi ortamında çaprazlaması yapılmış hücreler, distile su ile toplandı ve 7000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Çöktürülen hücreler 1 ml soğuk %70’lik etanol ile muamele edildi (Forsburg ve Rhind, 2006). -20°C’de 15 dakika bekletildi ve ardından distile su ile yıkanarak alkol uzaklaştırıldı. Tekrar 7000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilen hücreler 200 µl soğutulmuş %70’lik etanolde süspanse edildi.

Örneklere, son konsantrasyon 1µg/ml olacak şekilde, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Roche) eklendi ve 37°C’de 2 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

3.7.1. Floresan Mikroskobu İçin Preparatların Hazırlanması

DAPI ile boyanmış ve boyanmamış hücrelerin kümeleşmesini önlemek amacıyla, Rines ve ark. (2011)’nın önerdiği agaroz dolguları hazırlandı.

%1.2’lik (w/v) agaroz jel hazırlamak için Tablo 3.12’de belirtildiği şekilde hazırlanan 10X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 10 ml 1X TAE tamponuna 0.12 g agaroz (Sigma-Aldrich Agarose, Type II) eklendi ve mikrodalga fırında ~2 dakika eritildi. Bir süre oda sıcaklığında bekletilerek ~50-55°C’ye gelen agaroz jelden 50 µl alınarak lamın üzerine konuldu. Üstü lam ile kapatılarak soğumaya bırakıldı.

Agaroz dolgularının üstündeki lam alındı. Dolgunun ortasına 2.2 µl (Rines ve ark., 2011) maya kültürü ilave edildi. Üzeri alkol ile temizlenmiş lamel ile kapatıldı.

Tablo 3.12: 10X TAE (Tris-EDTA) tamponu.

10X TAE (Tris - EDTA) Tamponu
400 mM Tris
%1.2 glasiyel asetik asit
10 mM EDTA (pH:8.0)

3.8. RNA İZOLASYONU

SPA eğri besi ortamında çaprazlanan ve 2 gün 25°C’de inkübe edilen *S.pombe* kültürleri distile su ile toplanarak, 7000 rpm’de, 10 dakika santrifüj edildi. Çöktürülen hücrelerden total RNA izolasyonu "Roche High Pure RNA Isolation Kit" ile üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Total RNA izolasyonunda hücre parçalama aşamasında firmanın önerdiği koşullara ilave olarak bazı değişiklikler yapıldı.

Çöktürülen hücrelere 200 µl Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Tablo 3.13) eklenerek steril 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün 0.5 çizgisine kadar cam boncuk (çap: 0.45-0.50 mm) konuldu. Cam boncukların üzerine 200 µl PBS ile süspanse edilmiş hücreler ilave edildikten sonra “Sartorius Mikro-Dismembrator S” marka hücre parçalayıcısında 3000 rpm’de 30 saniye boyunca parçalama, 30 saniye buzda bekletme şeklinde, iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.13: PBS hazırlanması.

Bileşenler	Miktar/Hacim	1X için final konsantrasyonu
NaCl	8 g	137 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	1.44 g	10 mM
KH ₂ PO ₄	0.24 g	1.8 mM
Distile su	1 L	-

Parçalama sonrası, sıvı fazın alt mikrosantrifüj tüpüne geçmesi sağlandı. Alt sıvı 7.000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürüldü ve süpernatant steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre içeriğine 400 µl "Lysis/Binding Buffer" eklenip, 15 saniye boyunca tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Karışımdan 700 µl filtreli kolona alınarak, 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası altta kalan sıvı atıldı. Her bir örnek için 90 µl "DNase Incubation Buffer" ve 10 µl "DNase 1", yeni bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Her bir örnek için, filtreli kolonlara bu karışımdan 100 µl eklendi ve 15°C - 25°C'de 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Filtreli kolona 500 µl "Wash Buffer I" eklendi ve 8000 g'de 1 dakika santrifüj edildi, alt sıvı uzaklaştırıldı. Kolona 500 µl "Wash Buffer II" konuldu ve 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi, alta geçen sıvı uzaklaştırıldı. 200 µl "Wash Buffer II" eklendi ve 13000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak 50 µl "Elution Buffer" kolona ilave edildi. 8000 g'de 1 dakika santrifüjlendi. Membrandan alta geçen sıvıdan elde edilen total RNA -80°C'de saklandı.

3.8.1. RNA Miktarı ve Saflığının Ölçümü

İzole edilen *S. pombe* ırklarının total RNA'ların spektrofotometrik olarak miktar ve saflık kontrolleri "Nanodrop 2000c" adlı cihazda ölçülerek yapıldı. Öncelikle total RNA'nın içinde çözündürüldüğü solüsyon 1.5 µl olacak şekilde kör örnek olarak cihaza okutulduktan sonra örneklerden 1.5 µl alınarak saflık ve miktar ölçümleri yapıldı.

3.9. RNA'NIN ELEKTROFORETİK ANALİZİ

İzole edilen total RNA'ların miktar ve saflığının nanodrop ile kontrolünün ardından MOPS'lu jelde elektroforetik olarak kontrolleri gerçekleştirildi.

Jel hazırlamak için gerekli 10X MOPS Tablo 3.14 'te, solüsyonlar ve tamponlar Tablo 3.15'de belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tablo 3.14: 10X MOPS hazırlanması.

10X MOPS (1L)	
Bileşen	Miktar
3-(N-morfolino) propanesülfonik asit (MOPS)	41.9 g
$C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$	8.2 g
EDTA	3.72 g
800 ml distile suda çözdürüldü. 10 M NaOH ile pH 7'ye ayarlandı. Distile su ile 1 L'ye tamamlanıp, otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi.	

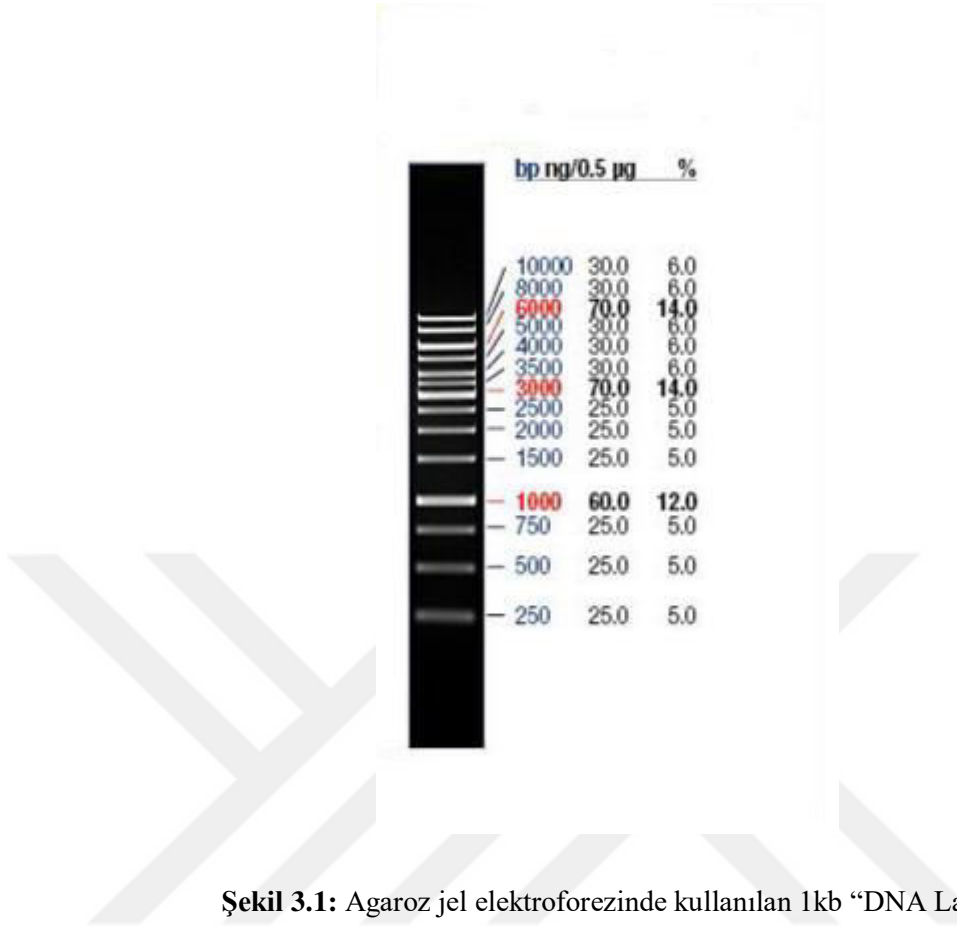
Tablo 3.15: MOPS'lu jel için gerekli tampon ve solüsyonlar.

MOPS'lu Yürütme Tamponu (300 ml)		MOPS'lu Yükleme Solüsyonu (775 µl)	
Bileşen	Hacim	Bileşen	Hacim
10X MOPS	30 ml	10X MOPS	100 µl
0.22 M %37 Formaldehit	5.4 ml	Formaldehit	175 µl
Distile su	264.6 ml	Formamid	500 µl

Hazırlanan 10X MOPS tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 3 ml 1X MOPS tamponuna 0.45 g agaroz (Sigma-Aldrich Agarose, Type II) ve 24.6 ml distile su eklenerek mikrodalga fırında ~2 dakika eritildi. Bir süre oda sıcaklığında bekletilerek ~50-55°C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Üzerine 2.4 ml formaldehit ve 1 µl etidyum bromür eklendi.

Jel daha önceden hazırlanmış ve tarak yerleştirilmiş yatay elektroforez kasetine yavaşça dökülerek oda sıcaklığında 25-30 dakika polimerizasyona bırakıldı.

Katılaştıran jel, MOPS'lu yürütme tamponu ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir RNA örneğinden 5 µl alınarak 15 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldı ve 55°C'de 15 dakika denatüre edildi. Ardından 10 dakika buzda bekletildi. 5 µL bromofenol mavisi (6X Fermentas yükleme tamponu, Tablo 3.16) ile karıştırılıp, jele yüklendi. Elektroforezde marker olarak "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)" kullanıldı (Şekil 3.1) Jel 55 voltta (10 V/cm) 35 dakika ardından 70 voltta (10 V/cm) 10 dakika yürütüldü.



Şekil 3.1: Agaroze jel elektroforezinde kullanılan 1kb “DNA Ladder”.

Tablo 3.16: 6X Yükleme tamponu.

6X Yükleme Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH:7.6)
	%0.03 bromofenol mavisi,
	%0.03 ksilen siyanol FF
	% 60 gliserol,
	60 mM EDTA

3.10. cDNA SENTEZİ

Total RNA izolasyonu yapılmış örneklerden, "Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" kullanılarak, firmanın önerdiği koşullarda cDNA sentezi yapıldı.

Sentez reaksiyonu Tablo 3.17 ve Tablo 3.18'de belirtildiği gibi gerçekleştirildi.

Tablo 3.17: Primer - kalıp karışımı (Tek örnek için).

Bileşenler	Başlangıç konsantrasyonu	Hacim	Son konsantrasyon
RNA	-	Değişken	1 µg/13 µl
Oligo (dT) ₁₈ Primer	50 pmol/µl	1 µl	2.5 µM
Distile su	-	Değişken	-
Toplam		13 µl	

Steril 0.2 ml'lik tüpte karışım hazırlandı. 65°C'de 10 dakika denatürasyonun ardından hemen buza konuldu.

Tablo 3.18: cDNA sentezinin ikinci aşamasında reaksiyon ortamına eklenen bileşenler.

Bileşenler	Başlangıç konsantrasyonu	Hacim	Son konsantrasyon
"Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction Buffer"	5X	4 µl	1X
"Protector RNase Inhibitor"	40U/µl	0.5 µl	20U
"Deoxynucleotide Mix"	10 mM	2 µl	1 Mm
"Transcriptor Reverse Transcriptase"	20U/ µl	0.5 µl	10U
Toplam		7 µl	

Primer - kalıp karışımının üzerine, Tablo 3.18'de belirtilen bileşenler eklendi ve karıştırıldı. 55°C'de 30 dakika inkübe edildi, ardından "Transcriptor Reverse

Transcriptase" aktivitesini durdurmak için 85°C'de 5 dakika bekletilerek sentez sonlandırıldı. İnkübasyon işlemi "Bio-RAD T100 Thermal Cycler"adlı cihaz ile gerçekleştirildi.

3.11. cDNA'LARIN KONTROL EDİLMESİ

Sentezi yapılan *S. pombe* yabancı ırklarının ve mutantlarının cDNA'ları %1'lik (w/v) agaroz jelde kontrol edildi.

3.11.1. Agaroz Jel Hazırlanışı ve Elektrophorez

%1'lik (w/v) agaroz jel hazırlamak için 40 ml 1X TAE tamponuna 0.40 g agaroz (Sigma-Aldrich Agarose, Type II) eklenerek mikrodalga fırında ~2 dakika eritildi. Bir süre oda sıcaklığında bekletilerek ~50-55°C'ye kadar soğutuldu. Jele 0.5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel daha önceden hazırlanmış ve tarak yerleştirilmiş yatay elektrophorez kasetine yavaşça dökülerek oda sıcaklığında polimerize olmaya bırakıldı.

Jel 1X TAE ile dolu olan elektrophorez tankına yerleştirildi. Her bir DNA örneğinden 5 µl alınarak 1 µl 6X yükleme tamponu (Fermentas) (Tablo 3.16) ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi. Elektrophorezde marker olarak "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)" kullanıldı (Şekil 3.1). cDNA örnekleri 60 voltta (10 V/cm) 40 dakika yürütüldü.

3.12. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

İzole edilen total RNA'lardan cDNA'lar elde edildi. Bu cDNA'ların gen anlatımlarındaki değişiklikleri gözlemlemek amacıyla, Real-Time PCR yapıldı.

3.12.1. Primer Tasarımı

S.pombe'de 1. kromozom üzerindeki *rec12* geninin çoğaltılmasını sağlayan primer dizileri oluşturuldu. NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanındaki bilgilerden yola çıkılarak *rec12* genine ait primerler, PrimerQuest Tool programı ile tasarlandı (Tablo 3.19).

Tablo 3.19: Tasarlanan primer dizileri.

Primer Dizileri		G+C Oranı (%)	T _m (°C)	Hedef Bölge Uzunluğu (bp)
<i>rec12</i>	Forward 5'- CAAACCGTAGTCGATGAG -3'	50	57	155
	Reverse 5'- GGACCCAAATACCAATCC -3'	50	57	

3.12.2. Primerlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Kontrolü

Sentezlenen primerlerin kontrolü gradient PCR ile yapıldı. Kalıp olarak *S.pombe* 972 h⁺ ırkı cDNA'sı kullanılarak reaksiyon hazırlandı. Reaksiyon “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” enzimiyle üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Tablo 3.20’de verilen bileşenler 0.2 ml’lik steril PCR tüplerinde karıştırıldı. Reaksiyon, “Bio-RAD T100 Thermal Cycler” adlı cihaz ile Tablo 3.21 ’de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

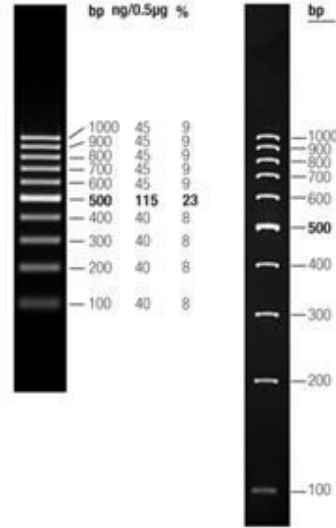
Tablo 3.20: PCR bileşenleri.

Bileşenin Adı	Hacim	Son Konsantrasyon
Reaksiyon Tamponu (5X) (+ MgCl ₂)	4 µl	1X
10 mM dNTP	0.4 µl	0.2 mM
25 mM MgCl ₂	0.5 µl	0.625 Mm
Forward Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/µl
Reverse Primer (10 pmol/ µl)	0.5 µl	0.25 pmol/µl
Kalıp	1 µl	-
Enzim (5 U/µl)	0.2 µl	0.05 U/µl
Distile su	12.9 µl	-
Toplam	20 µl	

Tablo 3.21: PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98°C	30 saniye	1
Denatürasyon	98°C	10 saniye	
Bağlanma	55-60°C	30 saniye	35
Uzama	72°C	1 dakika	
Son Uzama	72°C	5 dakika	1

cDNA'ların kontrolü agaroz jelde yapıldı. Elektroforezde marker olarak "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)" ve "GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas SM0241)" kullanıldı (Şekil 3.2). Jel 60 voltta (10 V/cm) 40 dakika yürütüldü.



Şekil 3.2: Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan 100 baz çiftlik "DNA Ladder".

3.12.3. 'RT-PCR' deney düzeneğinin hazırlanması

Real - Time PCR, kullanıcının PCR ürünlerinin amplifikasyonunu eş zamanlı olarak görmesine olanak veren bir sistemdir.

Real - Time PCR için "Roche LightCycler 480 II" cihazı kullanıldı. Real - Time PCR analizi için "LightCycler 480 SW 1.5" yazılımı kullanıldı ve bu yazılımdan çıkan veriler "Microsoft Office Excel" programı ile değerlendirildi. Floresan boya olarak "Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master" kit kullanıldı. Gen anlatımındaki değişiklikleri belirlemek amacıyla, referans gen olarak hücre dışı koşulların etkisiyle anlatımı değişmeyen *S. pombe aktin* geni seçildi. (Tablo 3.22)

"Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master" kit, firmanın önerdiği koşullarda uygulandı. İlk aşama olarak PCR karışımı hazırlandı. Bunun için Tablo 3.22'de belirtilen primerler, 100 µM stoktan alınıp 10 kat sulandırıldı. Tablo 3.23'de belirtilen

miktarda bileşenler, buzda bekletilen 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve pipetaj yapıldı. Her bir örnek için 15 µl "PCR Mix", 96 kuyucuklu "LightCycler 480 Multiwell Plate" plakanın kuyucuklarına konuldu. 5 µl cDNA (100 ng) kuyucuklara eklendi. Gen anlatımındaki değişikliklerin belirlenmesi için kontrol grubu cDNA'ları 1, 1/5, 1/25 ve 1/125 kat sulandırılarak standart olarak kullanıldı. Kalıp içermeyen kontrol ("non-template control, NTC") için kalıp cDNA miktarı kadar saf su eklendi. "LightCycler 480 Multiwell Plate" , "LightCycler 480 Multiwell Sealing Foil" ile kapatılarak 1500 g'de 1 dakika santrifüj edildi. "Roche LightCycler 480 II" cihazına yerleştirildi.

Tablo 3.22: RT-PCR'da kullanılan primer dizileri.

Primer Dizileri			G+C Oranı (%)	T _m (°C)	Hedef Bölge Uzunluğu (bp)
<i>act1</i>	Forward	5'- AGATTCTCATGGAGCGTGTT-3'	50	56.1	100
	Reverse	5' - TCAAAGTCCAAAGCGACGTA -3'	45	54.2	
<i>rec12</i>	Forward	5'- CAAACCGTAGTCGATGAG -3'	50	57	155
	Reverse	5'- GGACCCAAATACCAATCC -3'	50	57	

Tablo 3.23: RT-PCR için PCR karışımı.

Bileşen	Hacim (Her bir örnek için)
"PCR - Grade Water"	3 µl
Reverse ve Forward Primer	2 µl
"Master Mix"	10 µl
Toplam	15 µl

96 kuyucuklu "LightCycler 480 Multiwell Plate" cihaza yerleştirildikten sonra, Tablo 3.24'de belirtilen koşullar programa ("LightCycler 480 SW 1.5.1") girildi ve deney başlatıldı. Deney analizleri aynı programda gerçekleştirildi.

Tablo 3.24: RT-PCR koşulları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	5 dak	1
Denatürasyon	95	10 sn	
Primer bağlanma	57	14 sn	45
Uzama	72	20 sn	
	95	5 sn	
Erime eğrisi	66	1 dak	1
	97	-	
Soğutma	40	10 sn	1
Saklama	4	∞	

Örneklere rölatif kantifikasyon [Relative Quantification] analizi uygulandı ve aynı grup örneklerde aktin cDNA'sı miktarı ile *Rec12* cDNA'sı miktarları 2^{-ddCT} yöntemi ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışmada Tablo 3.1’de verilen ırklar kullanılarak, *rec12* geninin strese bağlı olarak gen anlatımındaki ve homolog rekombinasyonundaki değişikliklerin gözlemlenmesi amaçlandı. Bu doğrultuda, stres uygulanmış ve çaprazlanmış hücrelerden RNA izole edildi ve cDNA sentezi yapıldı. Gen anlatımındaki değişiklikler Real-Time PCR (RT-PCR) yapılarak belirlendi. Random spor analizi ile homolog rekombinasyon oranları belirlendikten sonra, RT-PCR verileri ile karşılaştırılarak sonuçlar elde edildi.

4.1. RANDOM SPOR ANALİZİ

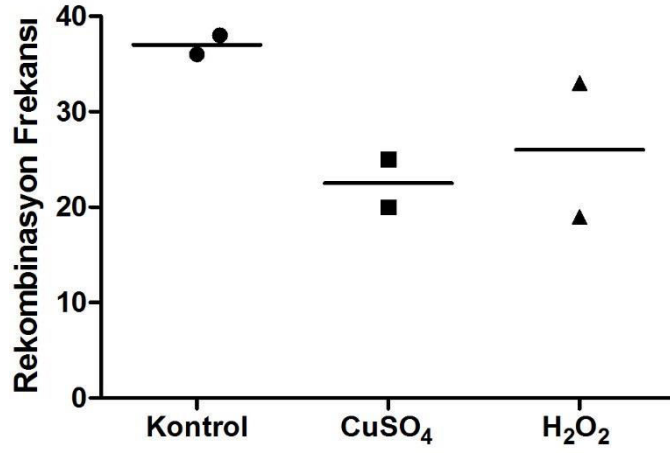
Random Spor Analizi Bölüm 3.13’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Rekombinasyon gerçekleşme oranı Tablo 4.1’de verildi.

Tablo 4.1: Rekombinasyon değerleri.

Hücre Adı	Stres Koşulu	Rekombinasyon Değeri
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	Kontrol	%38
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	0.5 M CuSO ₄	%25
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	1 mM H ₂ O ₂	%33
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	Kontrol	%36
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	0.5 M CuSO ₄	%20
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	1 mM H ₂ O ₂	%19

İstatistiksel olarak farklılık olup olmadığını test etmek için varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Deneyi etkileyen yalnız bir tane faktör olduğundan dolayı bir yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) yöntemi tercih edildi. Graphpad Prism 5.01 programı kullanılarak sonuçlar elde edildi. P değeri 0.1891 olarak bulundu ve $p > 0.005$ olduğu için uyguladığımız stres koşullarının rekombinasyonu etkilediği hipotezi doğru kabul edildi ancak fark anlamsız olarak belirtildi. Analize ait grafik Şekil 4.1’de verildi.

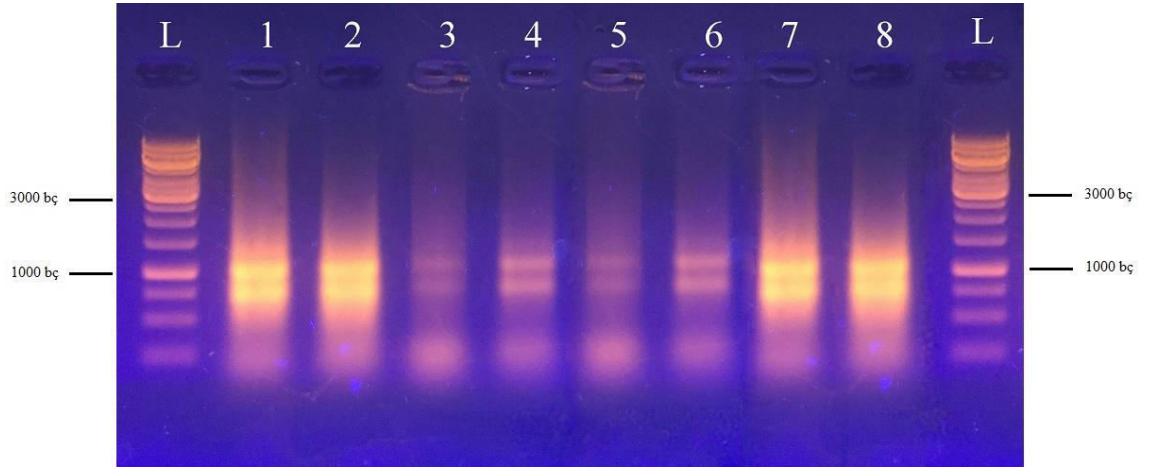
Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way ANOVA)



Şekil 4.1: Tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) grafiği.

4.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

S. pombe ırkına ait Tablo 3.1'de belirtilen hücrelere stres uygulandıktan ve Tablo 3.11'de belirtildiği gibi başarılı bir şekilde çaprazlandıktan sonra, ırkların total RNA izolasyonları Bölüm 3.7'de belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Total RNA'ların izolasyonunun ardından %1'lik agaroz jelde ve 10X MOPS'lu jelde kontrol edildi. Şekil 4.2'de gösterilen agaroz jelde 26S ve 18S rRNA'lara ait bantların izlenmesi ile total RNA'ların başarılı bir şekilde izole edildiği saptandı. Örneklerle ait spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen total RNA konsantrasyonları Tablo 4.2'deki verildi.



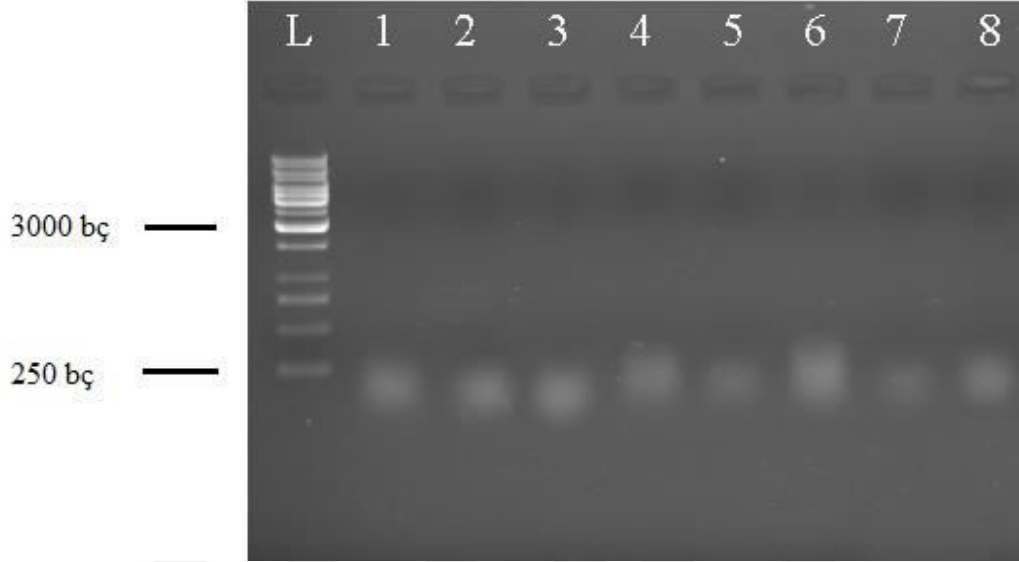
Şekil 4.2: Kontrol ve deney gruplarına ait total RNA'ların agaroz jel elektroforezi (L: 1 kb DNA ladder, 1: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (Kontrol), 2: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (0.5 M CuSO₄), 3: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (1 mM H₂O₂), 4: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (Kontrol), 5: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (0.5 M CuSO₄), 6: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (1 mM H₂O₂), 7: *972h⁻*, 8: *972h⁻ x 975h⁺*).

Tablo 4.2: Örneklerden elde edilen total RNA izolasyonu bulguları.

Örnekler	Stres Koşulu	RNA Konsantrasyonu (ng/μl)	Absorbans (260/280)
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	Kontrol	1263.1	2.27
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	0.5 M CuSO ₄	407.9	2.22
<i>ura4h⁻ x ade5h⁺</i>	1 mM H ₂ O ₂	916.8	2.30
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	Kontrol	1285.3	2.28
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	0.5 M CuSO ₄	413.3	2.25
<i>ura3h⁻ x ade2h⁺</i>	1 mM H ₂ O ₂	1192.6	2.27
<i>972h⁻</i>	-	910	2.01
<i>972h⁻ x 975h⁺</i>	-	824.5	2.17

4.3. cDNA SENTEZİ

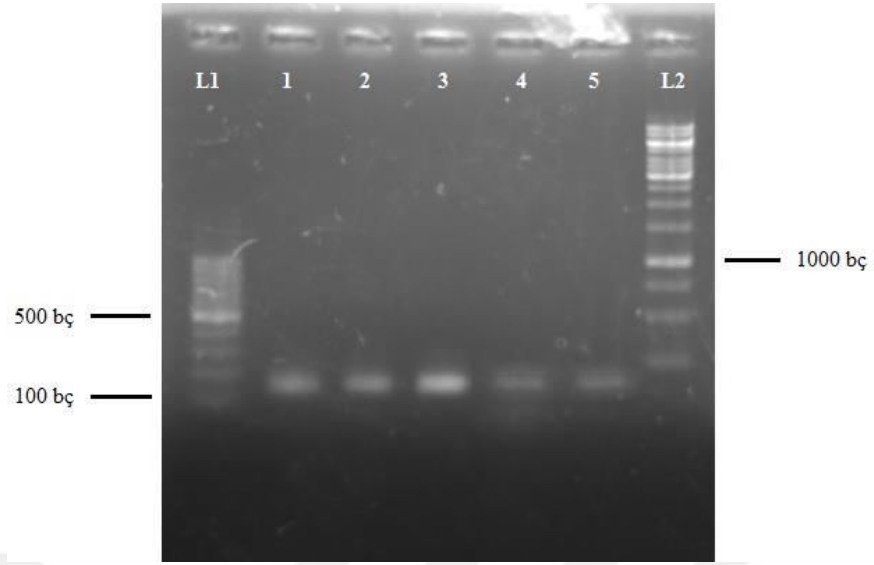
Total RNA izolasyonunu takiben Bölüm 3.10'da anlatıldığı gibi cDNA sentezi yapıldı (Şekil 4.3). Reaksiyon sonrasında örnekler %1'lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.



Şekil 4.3: Örnekler ait cDNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüleri (L: 1 kb DNA ladder, 1: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (Kontrol), 2: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (0.5 M CuSO₄), 3: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (1 mM H₂O₂), 4: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (Kontrol), 5: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (0.5 M CuSO₄), 6: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (1 mM H₂O₂), 7: *972h⁻*, 8: *972h⁻ x 975h⁺*).

4.4. PRİMERLERİN OPTİMİZASYONU

S. pombe rec12 genine özgü tasarlanan primerler, *972h⁻ x 975h⁺* cDNA'sı kullanılarak Bölüm 3.12.2'de belirtildiği gibi farklı sıcaklık koşullarında denendi. En iyi bant 57°C gözlemlendi (Şekil 4.4) ve diğer PCR çalışmaları için bu sıcaklık koşulu seçildi.

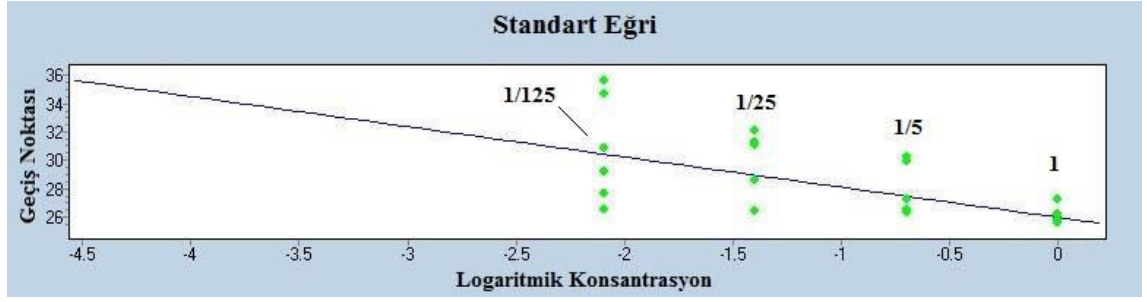


Şekil 4.4: Ters-transkriptaz PCR sonucu jel elektroforezi görüntüleri (L1: 100 bp DNA ladder, 1: 55°C, 2: 56°C, 3: 57°C, 4: 58°C, 5: 59°C, L2: 1 kb DNA Ladder).

4.5. RT-PCR İLE GEN ANLATIMININ KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ

S. pombe hücrelerinde *rec12* geninin anlatımının farklı stres koşulları ile değişimini saptamaya yönelik çalışma sonrasında yapılan RT-PCR sonuçları LightCycler 480 SW 1.5 yazılımı kullanılarak değerlendirildi. Bu yazılım aracılığıyla *S. pombe* 972h⁻ x 975h⁺ kontrol grubu cDNA'larından elde edilen standart grafik Şekil 4.5'te ve grafiğe ait istatistiksel değerler Tablo 4.2'de gösterildi.

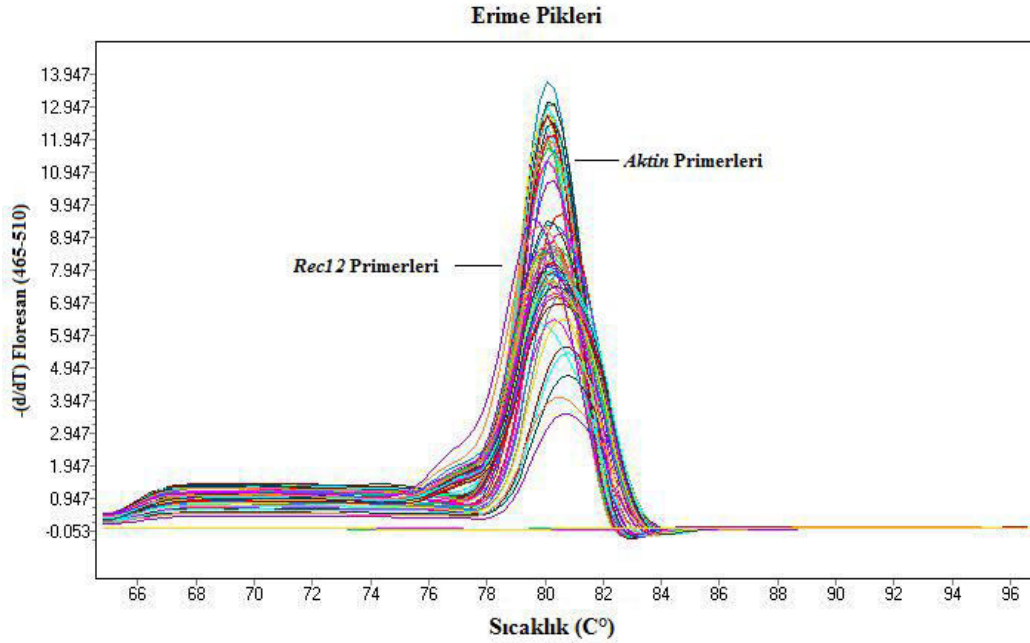
Aktin ve *rec12* primerlerinin etkinliğini ölçmek için erime eğrisi grafiği yazılım sayesinde gerçekleştirilerek, erime eğrisinde her iki primer için de tek bir pik gözlemlendi. Primerlerin erime eğrisine ait grafik Şekil 4.6'da verildi. Daha sonra örneklerde *aktin* cDNA'sı miktarı ile *rec12* cDNA'sı miktarları karşılaştırıldı.



Şekil 4.5: Aktin geni için standart eğri grafiği (1, 1/5, 1/25, 1/125 oranlarında sulandırılmış örnekler).

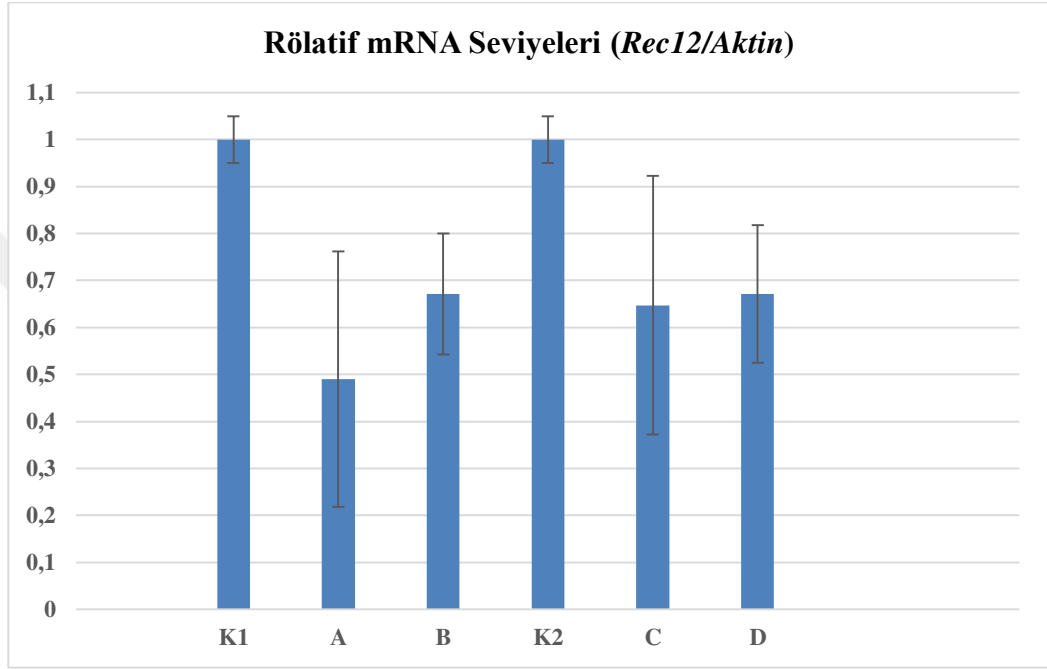
Tablo 4.3: Aktin geni için oluşturulan standart grafiğin istatistiksel verileri.

Hata Payı	0.0294
Verimlilik	2.950
Eğim	-2.128



Şekil 4.6: Aktin ve rec12 primerlerinin erime eğrisi grafiği.

S. pombe *Rec12* geninin anlatımındaki değişikliklerin incelenmesi amacıyla yapılan RT-PCR analizi sonucunda 1 mM H₂O₂ uygulanmış *ura4h⁻ x ade5h⁺* ve *ura3h⁻ x ade2h⁺* çaprazlanmalarının, aynı ırklara uygulanan 0.5 M CuSO₄ stresine kıyasla daha fazla anlatım yaptığı gözlenmiştir. Sonuçlara ait grafik Şekil 4.7’de verildi.

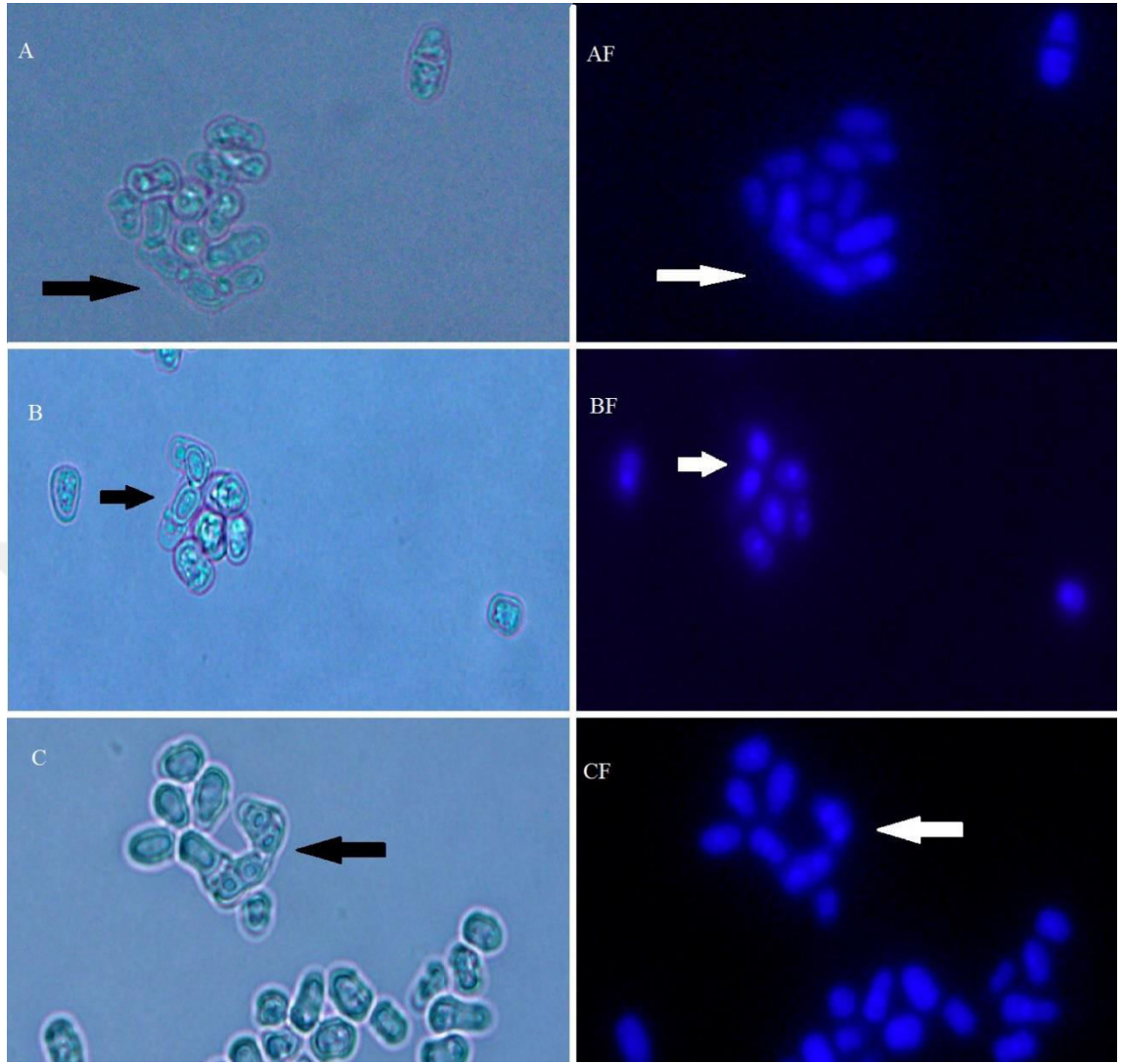


Şekil 4.7: *Rec12* geni rölatif mRNA seviyelerinin karşılaştırılması (K1: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (Kontrol), A: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (0.5 M CuSO₄), B: *ura4h⁻ x ade5h⁺* (1 mM H₂O₂), K2: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (Kontrol), C: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (0.5 M CuSO₄), D: *ura3h⁻ x ade2h⁺* (1 mM H₂O₂)).

4.6. FLORESAN MİKROSKOBU İLE ASKUS GÖRÜNTÜLEME

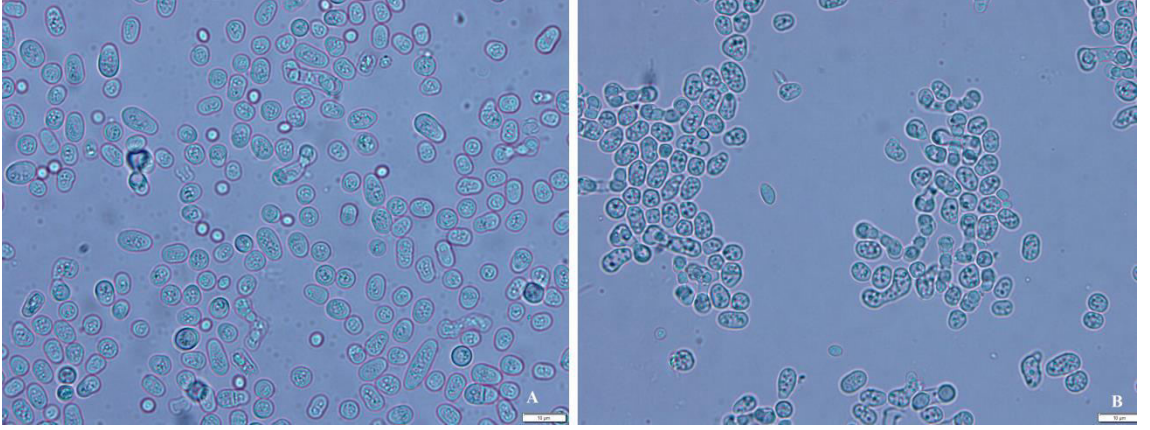
Çaprazlanan *ura4h⁻ x ade5h⁺* ırklarının zigot ve askuslarının floresan görüntüleme işlemi Bölüm 3.6’da açıklandığı şekilde yapıldı. İşlem Olympus BX53F floresan mikroskobu ile gerçekleştirildi ve hücrelerin fotoğrafları 'Olympus cellSens Standart' programı kullanılarak çekildi.

Görüntülemelerde 0.5 M CuSO₄ stresi uygulanmış *ura4h⁻ x ade5h⁺* askuslarının bazılarında (%1) şekil farklılıkları gözlemlendi. 1 mM H₂O₂ stresi uygulanmış *ura4h⁻ x ade5h⁺* askularında ise bir değişiklik görülmedi. Sonuçlara ait fotoğraflar Şekil 4.8’de verildi.



Şekil 4.8: *ura4h⁻ x ade5h⁺* ırkları askus karşılaştırması (A: *ura4h⁻ x ade5h⁺* Kontrol Görünür Işık altında inceleme, AF: *ura4h⁻ x ade5h⁺* Kontrol Floresan Işık altında inceleme, B: *ura4h⁻ x ade5h⁺* 0.5 M CuSO₄ Görünür Işık altında inceleme, BF: *ura4h⁻ x ade5h⁺* 0.5 M CuSO₄ Floresan Işık altında inceleme, C: *ura4h⁻ x ade5h⁺* 1 mM H₂O₂ Görünür Işık altında inceleme, CF: *ura4h⁻ x ade5h⁺* 1 mM H₂O₂ Floresan Işık altında inceleme).

Tirozin miktarının çaprazlama üzerindeki etkisinin anlaşılması için, SPA besiyerine 50 mg/L olacak şekilde tirozin eklendi. Bu besiyerinde çaprazlanan 972 *h⁻* ve 975 *h⁺* ırklarına ait sonuçların fotoğrafları Şekil 4.9'da verildi. Tirozinsiz besiyerinde askus miktarı 3/200 hücre iken, tirozinli besiyerinde askus miktarı 11/200 hücre olarak belirlendi.



Şekil 4.9: 972 h^- ve 975 h^+ ırklarında tirozinin çaprazlamadaki etkisinin karşılaştırması (A: 972 h^- ve 975 h^+ Kontrol, B: 972 h^- ve 975 h^+ Tirozinli SPA).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dizilenmesi tamamlanmış altıncı ökaryotik organizma olan *S. pombe* (Decottignies ve diğ., 2003), insanda temel hücrel süreçler ve metabolik yolların anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır (Suter ve diğ., 2006).

S. pombe'nin en kuvvetli rekombinasyon yetersizliğine sebep olan Rec- mutantları, yaşayabilir sporlar üretebilir. Bunun sebebi 3 kromozoma sahip olmasıdır, böylece rekombinasyon eksikliği durumunda bile, düzgün bir şekilde ayrılarak, %12.5 oranında yaşayan sporlar üretebilir (Cromie ve Smith, 2007). *S. pombe*'nin rekombinant olmayan (akiazmatik) kromozomların Mayoz I'de ayrışabilmelerine olanak sağlayan mekanizması (Molnar ve diğ., 2001), rekombinasyonu başlatamayan güçlü Rec- mutantlarının bile ~%10-%25 oranında canlı spor üretebilmesine olanak sağlamaktadır (Young ve diğ., 2004).

Rec12 mutantlarında anormal spor yerleşimi, azalmış spor sayısı, anormal spor biçimi gibi gelişimsel kusurlar sıklıkla gözlenir. Bu tür fenotiplerin, Mayoz II'de gerçekleşen bir hatadan dolayı meydana geldiği belirtilmiştir. *S. pombe* spor oluşumu, Mayoz II'deki iğ iplikleri kutup cisimciği "spindle pole body" ile kontrol altında tutulur (Shariff ve diğ., 2002).

Rekombinasyon ile bağlantılı bazı *S. pombe* genleri mutasyona uğradıklarında (*rec13* ve *rec17-rec21*) mayotik rekombinasyon frekanslarında azalma gözlenir (DeVeaux et al. 1992). Yaban tip ile karşılaştırıldığında (%88), *rec10-155* çaprazlamalarında sporların yaşama oranlarının azalmadığı (%89) ancak *rec10-175* çaprazlamalarında belirgin bir düşüşün olduğu (%24.5) belirlenmiştir. Rec12 allelleri ile yapılan çalışmalarda, *rec12-152* ve *rec12-171* çaprazlamalarında, *rec10-175*'e kıyasla (%17.5 ve %15.5) azalmalar gözlenmiştir. *Rec10-175* ve *rec12-171* ikili mutantında ise bu oran %9'a kadar inmiştir (Mallela ve diğ., 2011).

Bakır (Cu^{+2}) metali, hayati önem taşıyan ve birçok biyolojik süreçte görev alan enzimlerin ayrılmaz bir parçasıdır. Normalde proteinlere bağlanan bakır, hidroksil

radikallerini katalize etmek için serbest halde de bulunabilir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalar, bakırın oksidatif zarar vermeye sebep olduğunu ve önemli hücresel olayları etkilediğini göstermiştir (Gaetke ve Chow, 2003). Yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında, lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif zarar görmesine sebep olur ve nörodejeneratif hastalıklara yol açar (Gaetke ve Chow, 2003).

1 Mm'dan az veya eşit konsantrasyonda bakır içeren besiyerlerinde kültüre edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri, bakır stresi uygulanmamış besi ortamlarına ekilmiş hücrelere kıyasla, daha aktif bir plazma membranı sergilemiştir. En fazla spesifik aktivite 0.5 mM CuSO₄'te gözlenmiştir. 1.5 Mm'dan fazla konsantrasyon seviyelerinde, ATPaz aktivitesi gözlenmemiştir (Fernandes ve diğ., 1998). *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında, birçok genin homologunun tanımlanmış olmasına rağmen, *S. pombe* bakır metabolizması daha az bilinmektedir. Bu genler, yüksek affinite gösteren hücre için bakır alımında görev alırlar, genin ürünleri plazma membranında bulunur. Ctr6 "vacuolar membran transporter" olarak işlev görmektedir (Rustici ve diğ., 2007). *S. pombe*'de yüksek bakır stresine karşı süperoksit dismutaz bakır şaperonunu kodlayan *Ccs1p* geni (Laliberte ve diğ., 2004) ve fitokelatin sentaz (*PCS*) geni belirlenmiştir. (Rustici ve diğ., 2007).

Orta ve yüksek seviyelerdeki bakır konsantrasyonlarında, *S. pombe* genel gen anlatımı cevabı, *S. cerevisiae*'ye kıyasla çok daha az değişim gösterir. Fisyon mayası, daha az konsantrasyonlarda uygulanan bakır stresine karşı, *S. cerevisiae*'ye kıyasla çok daha erken cevap verir (2 µmol/l versus 8 µmol/l) (Rustici ve diğ., 2007). *S. pombe*'de bakır alımı, bakır ve bakıra bağımlı proteinlerin işlevlerini sürdürebilmesi için gereklidir. Bu yüzden, bakır eksikliği durumunda, mayoz bölünmedeki değişimler ve bakır transporterlerinin anlatım profilleri incelenmektedir (Beaudoin ve diğ., 2013).

Yabani ırk *S. pombe* hücreleri ile yapılan deneyler sonucunda, hücrelerin hidrojen peroksit karşı diğer stres faktörlerine nazaran (Menadion, 1-kloro-2,4-dinitrobenzen vb.) daha dayanıklı olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebinin, hidrojen peroksit moleküllerinin katalaz enzimi tarafından etkili bir biçimde ayrıştırılması olduğu belirtilmektedir (Mutoh ve diğ., 2005). Lee ve diğerlerinin 2005 yılında yaptığı çalışmada, *S. pombe* hücreleri logaritmik fazda iken, çeşitli konsantrasyonlarda H₂O₂ ile

muamele edilmiştir. 10 mM'a kadar olan konsantrasyonlarda, hücrelerin hayatta kalma oranları etkilenmemiştir. 1 saat uygulanmış, 40 mM'a kadar olan H_2O_2 konsantrasyonlarında ise hücrelerin %10 u hayatta kalmıştır. *S. pombe*'nin H_2O_2 'ye karşı olan direncinin, lipid peroksidasyon eksikliği ile ve içerdiği yüksek seviyelerdeki antioksidan enzimler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Chen ve diğerlerinin 2007 yılında yaptığı çalışmada ise, düşük (0.07 mM), orta (0.5 mM) ve yüksek (6 mM) seviyelerde uygulanan 3 farklı H_2O_2 dozunda, fisyon mayasının doza bağlı cevapları araştırılmıştır ve H_2O_2 'nin gen anlatımını yeniden düzenlediği belirlenmiştir. Yüksek doza maruz bırakılan hücrelerde yaklaşık 3000 genin anlatımının değiştiği belirtilmiştir. Her üç dozda da anlatımı değişen yaklaşık 150 gen belirlenmiştir. Orta ve yüksek doz uygulanan hücrelerdeki gen anlatımı cevapları hemen hemen aynı kalmış ancak transkripsiyon seviyesinin en çok artış gösterdiği doz, orta dereceli olarak bildirilmiştir. Bunun sebebinin, yüksek doza maruz kalmış hücrelerin fazla zarara uğraması dolayısıyla, hücresel düzenleme mekanizmalarının hasar görmesidir. Hücrelerin ölüm oranı, yüksek dozda %67 iken, orta doz için %22 olarak belirtilmiştir. H_2O_2 ile muamele edilmiş hücrelerde süperoksit radikali oluşumunda artış belirlenmiştir ve bunun sonucunda, H_2O_2 tarafından başlatılan zararın, süperoksit radikalının oluşumuyla beraber daha da fazla zarara neden olduğu belirtilmiştir (Perrone ve diğ., 2008).

Bu çalışmada, çeşitli *S. pombe* ırkları Gutz ve ark.(1974)'nın ve Leupold (1970) 'un önerdiği şekilde üretildi ve Tablo 3.9'da belirtildiği şekilde stres koşulları uygulandı. Random Spor Analizi yöntemi Forsburg ve Rhind'in 2006 yılındaki makalesinden alınıp, uyarlanarak uygulandı. 21 günlük bekleme süresinin ardından, zengin ve seçici besi ortamlarına ekilen hücreler, 30°C'de inkübe edildikten sonra rekombinasyon frekansları hesaplandı. 0.5 M $CuSO_4$ stresine maruz bırakılan hücrelerin en az rekombinasyon frekansına sahip olduğu gözlemlendi. Chen ve diğerlerinin 2007 yılında yaptığı çalışmada orta-düşük seviye kabul edilen 1 mM H_2O_2 stresine maruz bırakılmış hücrelerin, 0.5 M $CuSO_4$ stresine kıyasla daha fazla rekombinasyon frekansına sahip olduğu belirlendi. Mallela ve diğerlerinin 2011 yılında *Rec12* mutantları ile yaptıkları çalışmalarda, *rec12* mutantlarının çaprazlanması sonucu oluşan sporların yaşama oranının azalması, *rec12* geninin rekombinasyon üzerindeki etkisini göstermektedir.

RT-PCR’da yapılan rölatif mRNA seviyelerinin karşılaştırmalı analizi sonucunda, rekombinasyon frekansı ile orantılı bir biçimde, *rec12* geninin anlatımının azaldığı belirlendi.

Floresan mikroskopunda yapılan çalışmalar sonucunda, 0.5 M CuSO₄ stresi uygulanmış *ura4h⁻ x ade5h⁺* askuslarının bazılarında (%1) şekil farklılıkları gözlemlendi (Şekil 4.7). Shariff ve diğerlerinin 2002 yılında yürüttüğü çalışmalarda, *Rec12* mutantlarında anormal spor yerleşimi, azalmış spor sayısı, anormal spor biçimi gibi gelişimsel kusurların sıklıkla görüldüğü belirtilmiştir.

Sonuç olarak, *rec12* geninin gen anlatımının ve homolog rekombinasyonun, uyguladığımız stres koşullarında değiştiği belirlenmiştir.

Adaptasyon gerektiren şartların, yani bir anlamda stresin, canlılar üzerinde nasıl etkili olduğu ve canlıların bu koşullara nasıl bir tepki oluşturduğu birçok açıdan ele alınan bir araştırma konusudur. Canlıların doğal yaşam ortamlarında, meydana gelen değişimlere karşı hücresel boyutta bir yanıt oluşup oluşmadığı cevap aranılan konular arasındadır. Seçmiş olduğumuz stres faktörleri maya dahil birçok organizma grubunda farklı açıdan araştırılmıştır ve bu çalışmada da hücresel cevabın moleküler düzeydeki etkileri aydınlatmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Acquaviva, L., Szekvolgyi, L., Dichtl, B., Dichtl, B.S., de La Roche Saint Andre, C., Nicolas, A., Geli, V., 2013, The COMPASS subunit Spp1 links histone methylation to initiation of meiotic recombination, *Science*, 339, 215–218.
- Bustin, S.A., 2005, Real-time PCR, *Encyclopedia of diagnostic genomics and proteomics*, 10, 1117-1125.
- Chardeen, P., Laliberté, J., Beaudoin, J., Labbé, S., 2008, Copper distributed by Atx1 is available to copper amine oxidase 1 in *Schizosaccharomyces pombe*, *Eukaryotic cell*, 7(10), 1781-1794.
- Chen, D., Wilkinson, C. R., Watt, S., Penkett, C. J., Toone, W. M., Jones, N., Bähler, J., 2008, Multiple pathways differentially regulate global oxidative stress responses in fission yeast, *Molecular biology of the cell*, 19(1), 308-317.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Bähler, J., 2003, Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress, *Molecular biology of the cell*, 14(1), 214-229.
- Costello, G., Rodgers, L., Beach, D., 1986, Fission yeast enters the stationary phase G0 state from either mitotic G1 or G2, *Current Genetics*, 11, 119–125.
- Cromie, G., Smith, G.R., 2008, Meiotic Recombination in *Schizosaccharomyces pombe*: A Paradigm for Genetic and Molecular Analysis, *Recombination and meiosis*, Springer Berlin Heidelberg, 195-230.
- De Freitas, J., Wintz, H., Kim, J. H., Poynton, H., Fox, T., Vulpe, C., 2003, Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies, *Biometals*, 16(1), 185-197.
- Decottignies, A., Sanchez-Perez, I., Nurse, P., 2003, *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study, *Genome Research*, 13, 399-406.
- DeVeaux, L.C., Hoagland, N.A., Smith, G.R., 1992, Seventeen complementation groups of mutations decreasing meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics*, 130, 251–262.
- DeWall, K.M., Davidson, M.K., Sharif, W.D., Wiley, C.A., Wahls, W.P., 2005, A DNA binding motif of meiotic recombinase Rec12 (Spo11) defined by essential glycine-202, and persistence of Rec12 protein after completion of recombination, *Gene*, 356, 77-84.
- Dorak, T., 2006, Real-Time PCR, Taylor & Francis Group, New York, ISBN: 0-203-96731-3.

- Egel, R., 1989, Mating-type genes, meiosis and sporulation, *Molecular Biology of the Fission Yeast*, Academic Press Inc., San Diego, California, ISBN 0-12-514085-1.
- Egel, R., 2004, *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN 978-3642056314.
- Egel, R., Egel-Mitani, M., 1974, Premeiotic DNA synthesis in fission yeast, *Experimental Cell Research*, 88, 127–134.
- Esposito, M. S., Esposito, R. E., 1969, The genetic control of sporulation in *Saccharomyces*. I. The isolation of temperature-sensitive sporulation-deficient mutants, *Genetics*, 61, 79–89.
- Farah, J.A., Hartsuiker, E., Mizuno, K., et al., 2002, A 160-bp palindrome is a Rad50, Rad32-dependent mitotic recombination hotspot in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics* 161, 461–468.
- Fernandes, A.R., Peixoto, F.P., Sá-Correia, I., 1998, Activation of the H⁺-ATPase in the plasma membrane of cells of *Saccharomyces cerevisiae* grown under mild copper stress, *Archives of Microbiology*, 171, 6–12.
- Forsburg, S., Rhind, N., 2006, Basic methods for fission yeast, *Yeast*, 23, 173–183.
- Forsburg, S.L., Nurse, P., 1991, Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *Annual Review of Cell Biology*, 7, 227–256.
- Forsburg, S.L., Rhind, N., 2006, Basic methods for fission yeast, *Yeast*, 23, 173–183.
- Gaetke, L.M., Chow, C.K., 2003, Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients, *Toxicology*, 189, 147–163.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G., 1996, Life with 6000 genes, *Science*, 274, 546–567.
- Gros, L., Sapparbaev, M.K., Laval, J., 2002, Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage, *Oncogene*, 21, 8905–8925.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., 1989, *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- Hayles, J., Nurse, P., 2016, *Fission Yeast: A Laboratory Manual*, Chapter 1, Cold Spring Harbor Protocols, ISBN 978-1-621820-82-6.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., Hedges, S.B., 2001, Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants, *Science*, 293, 1129–1133.

- Hoffman, C.S., Wood, V., Fantes, P.A., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics*, 201, 403-423.
- Ikner, A., Shiozaki, K., 2005, Yeast signaling pathways in the oxidative stress response, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 569(1), 13-27.
- Janda, S., Gill, G., Sigler, K., Hufer, M., 1993, Effects of peroxidation on sugar transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *Folia Microbiol*, 38, 135-140.
- Kee, K., Keeney, S., 2002, Functional interactions between SPO11 and REC102 during initiation of meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 160(1), 111-122.
- Keeney, S., 2001, Mechanism and control of meiotic recombination initiation, *Curr Topics*
- Khare, A. K., Singh, B., Singh, J., 2011, A fast and inexpensive method for random spore analysis in *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast*, 28, 527-533.
- Klar, A.J.S. and Bonaduce, M.J., 2013, Unbiased segregation of fission yeast chromosome 2 strands to daughter cells, *Chromosome Research*, 21, 297-309.
- Krogh, B.O., Symington, L.S., 2004, Recombination Proteins in Yeast, *Annual Review of Genetics*, 38, 233-271.
- Laliberte, J., Whitson, L. J., Beaudoin, J., Holloway, S. P., Hart, P. J., Labbe, S., 2004, The *Schizosaccharomyces pombe* Pccs protein functions in both copper trafficking and metal detoxification pathways, *J. Biol. Chem.*, 279, 28744–28755.
- Lee, J., Dawes, I. W., Roe, J. H., 1995, Adaptive response of *Schizosaccharomyces pombe* to hydrogen peroxide and menadione, *Microbiology*, 141(12), 3127-3132.
- Leupold, U., 1970, *Methods Cell Physiology*, 4, 169-177.
- Leupold, U., 1987, Sex Appeal in Fission Yeast, *Current Genetics*, 12, 543-545.
- Leupold, U., 1993, The origin of *Schizosaccharomyces pombe* genetics, *The Early Days of Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, ISBN 978-087969874-4.
- Lichten M., 2001, Meiotic recombination: breaking the genome to save it, *Curr Biol.*, 11, 253-256.
- Lundblad, V.,K., Struhl, 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 13, Yeast, John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 9780471142720.
- Mallela, S., Latypov, V., Kohli, J., 2011, Rec10-and Rec12-independent recombination in meiosis of *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast*, 28(5), 405-421.

- Molnar, M., Bahler, J., Kohli, J., Hiraoka, Y., 2001, Live observation of fission yeast meiosis in recombination-deficient mutants: a study on achismate chromosome segregation, *Journal of Cell Science*, 114, 2843-2853.
- Moreno, S., Klar, A.J., Nurse, P., 1991, Molecular Genetic Analysis of Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in Enzymology*, 194, 795-823.
- Mutoh, N., Kawabata, M., Kitajima, S., 2005, Effects of four oxidants, menadione, 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, on fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biochemistry*, 138(6), 797-804.
- Nasmyth, K., Nurse, P., Fraser, R.S., 1979, The effect of cellmass on the cell cycle timing and duration of S-phase in fission yeast, *Journal of Cell Science*, 39, 215-233.
- Nichols, M.D., DeAngelis, K., Keck, J.L., Berger, J.M., 1999, Structure and function of an archaeal topoisomerase VI subunit with homology to the meiotic recombination factor Spo11, *EMBO J*, 18, 6177-6188.
- Ohsumi, Y., Kitamoto, K., Anraku, Y., 1988, Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion, *Journal of Bacteriology*, 170(6), 2676-2682.
- Perrone, G. G., Tan, S. , Dawes, I. W., 2008, Reactive oxygen species and yeast apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 1354-1368.
- Pidoux, A.L., Allshire, R.C., 2005, The role of heterochromatin in centromere function, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 360 (1455), 569-79.
- Puig, S., Thiele, D. J., 2002, Molecular mechanisms of copper uptake and distribution, *Current opinion in chemical biology*, 6(2), 171-180.
- Rabitsch, K.P., Gregan, J., Schleiffer, A., Javerzat, J.P., Eisenhaber, F., Nasmyth, K., 2004, Two fission yeast homologs of drosophila Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II, *Current Biology*, 14, 287- 301.
- Resnick, M.A., Martin, P., 1976, The repair of double-strand breaks in the nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae* and its genetic control, *Mol. Gen. Genet.*, 143, 119-129.
- Rines, D.R., Thomann, D., Dorn, J.F., Goodwin, P., Sorger, P.K., 2011, Live Cell Imaging of Yeast, *Cold Spring Harbor Protocols*, doi:10.1101/pdb.top065482
- Rustici, G., van Bakel, H., Lackner, D. H., Holstege, F. C., Wijmenga, C., Bähler, J., Brazma, A., 2007, Global transcriptional responses of fission and budding yeast to changes in copper and iron levels: a comparative study, *Genome biology*, 8(5), 1.

- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008, Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method, *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108.
- Sharif, W.D., Glick, G.G., Davidson, M.K., Wahls, W.P., 2002, Distinct functions of *S. pombe* Rec12 (Spo11) protein and Rec12-dependent crossover recombination (chiasmata) in meiosis I; and a requirement for Rec12 in meiosis II, *Cell & Chromosome*, 1, 1.
- Shiozaki, K., Russell, P., 1995, Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast, *Nature*, 378, 739-743.
- Siddiqi, B.A., 1971, Random-spore analysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Hereditas*, 69, 67-76.
- Sipiczki, M., 2000, Where does fission yeast sit on the tree of life?, *Genome Biol*, 1 (2), 1011.
- Smith, J., Smith, K., Mézard, C., 2001, Tying up loose ends: Generation and repair of DNA double-strand breaks, *Atlas Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*, 3, 497-521.
- Sun, H., Treco, D., Schultes, N.P., Szostak, J.W., 1989, Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion, *Nature*, 338, 87– 90.
- Suter, B., Auerbach, D. and Stagljar, I., 2006, Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond, *BioTechniques*, 40, 625-644.
- Tarhan, Ç., Sarıkaya, A.T., 2012, Does copper stress lead to spindle misposition-dependent cell cycle arrest?, *Genetics and Molecular Research*, 11(4), 3824-3834.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., Hidalgo, E., 2006, Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H_2O_2 levels, different response pathways, *Molecular Genetics and Genomics*, 276(6), 495-502.
- Waggoner, D.J., Bartnikas, T.B., Gitlin, J.D., 1999, The role of copper in neurodegenerative disease, *Neurobiology of Disease*, 6, 221-230.
- Weaver, R.F., 2011, *Molecular Biology*, 5 ed., McGraw-Hill, New York, ISBN: 978-0-07-352532-7.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Nurse, P., et al., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871–880.
- Young, J.A., Schreckhise, R.W., Steiner, W.W., Smith, G.R., 2002, Meiotic Recombination Remote from Prominent DNA Break Sites in *S.pombe*, *Molecular Cell*, 9, 253-263.

Young, J.A., Hyppa, R.W., Smith, G.R., 2004, Conserved and nonconserved proteins for meiotic DNA breakage and repair in yeasts, *Genetics*, 167, 593-605.

(<http://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>) [Ziyaret Tarihi: 17.05.2016]

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2542150>) [Ziyaret Tarihi: 17.05.2016]

(<http://www.pombase.org/status/statistics>) [Ziyaret Tarihi: 07.08.2016]



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Deniz YILMAZ
Doğum Yeri	Fatih, İstanbul
Doğum Tarihi	22.10.1990
Uyruğu	x T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0535 987 73 33
E-Posta Adresi	d-yilmaz@windowslive.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	13.06.2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Programı	Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı
Mezuniyet Tarihi	21.10.2016