



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'DE
GEN ANLATIMINDAKİ NİTRİK OKSİDE BAĞIMLI
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Cenk KIĞ

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof.Dr. Güler TEMİZKAN

Eylül, 2008

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'DE
GEN ANLATIMINDAKİ NİTRİK OKSİDE BAĞIMLI
DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI**

Cenk KIĞ

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

Danışman

Prof.Dr. Güler TEMİZKAN

Eylül, 2008

İSTANBUL

Bu çalışma/....../ 2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Anabilim Dalı programında Doktora / Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN (Danışman)
İstanbul Üniversitesi

Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşegöl TOPAL SARIKAYA
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Sezai TÜRKEİ
Uludağ Üniversitesi

Prof. Dr. Ayşe ÖZER
Marmara Üniversitesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin
T-747/13092005 numaralı projesi ile desteklenmiřtir.

ÖNSÖZ

Lisans, yüksek lisans ve doktora eğitimimi kapsayan süre içerisinde destek, yardım ve ilgisini esirgemeyerek bana her konuda yol gösteren Danışman hocam Prof. Dr. Güler TEMİZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Lisansüstü düzeydeki eğitimim süresince aldığım derslerde ve yaptığım deneysel çalışmalarda değerli katkılarını ve eleştirilerini benden esirgemeyen, tez izleme komitesinde bulunan, Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans tezimden bu yana Doktora tezimin de her aşamasında deneyim, eleştiri ve katkılarıyla bana destek olan, tez izleme komitesi üyesi, Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmamın önemli bir aşamasını oluşturan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu uygulaması için gerekli olan cihazın kullanımında kıymetli bilgilerinden yararlandığım İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nihan ERGİNEL - ÜNALTUNA'ya teşekkür ederim.

Çalışmada gerekli bazı cihazların ve kimyasal maddelerin kullanımı konusunda desteğini esirgemeyerek bana zaman ayıran Prof. Dr. Nazlı ARDA'ya, Lisans ve Lisansüstü eğitimimin yanı sıra tez konumun belirlenmesinde de bana yol gösteren Prof. Dr. Cihan DEMİRCİ'ye teşekkür ederim. Ayrıca, hücre fotoğraflarının çekilmesinde, floresans dijital görüntü aktarımı sağlayan mikroskopun kullanılması konusunda gösterdiği anlayıştan dolayı Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya teşekkür ederim.

Lisans düzeyimdeki eğitimimden itibaren laboratuvar deneyimi kazanmam konusunda sürekli ilgileriyle bana yol göstermiş olan Yard. Doç. Dr. Semian KARAER'e, Yard. Doç. Dr. Tuba GÜNEL'e ve Dr. Bedia GEMİCİ PALABIYIK'a teşekkür ederim. Ayrıca, kendi tezi sırasında kazandığı deneyimlerini benimle paylaşarak bana destek olan Dr. Neslihan TURGUT KARA'ya ve diğer tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Kaliteli hizmetlerinden dolayı ELİPS Sağlık Ürünleri İth. ve İhr. Ltd. Şirketi'ne ve gerçek zamanlı PZR yönteminin uygulanması aşamasında bana zaman ayırarak teknik konularda büyük destek sağlayan Gülçin ÜLGEN'e teşekkür ederim.

Tüm eğitim yaşamım süresince, maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyerek özveriyle bana kuvvet veren ve anlayış gösteren anneme, babama, eşime, kardeşime ve ailemin diğer tüm üyelerine içten teşekkür ederim.

Eylül, 2008

Cenk KIĞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	vi
TABLO LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	ix
ÖZET	xii
SUMMARY.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	5
2.1. NİTRİK OKSİT (NO) VE NİTRİK OKSİT SENTAHLAR (NOS'LAR)	5
2.2. NO'NUN SİNYAL MOLEKÜL OLARAK İŞLEVLERİ.....	10
2.2.1. NO'nun cGMP Sinyal Yoluna Etkisi	11
2.2.2. NO'nun cGMP'ye Bağımlı Olmayan Sinyal Yollarına Etkisi	12
2.2.3. NO'nun Gen Anlatımı Üzerinde Doğrudan Etkisi	13
2.3. HÜCRE İÇİ NO DÜZEYİ DENGESİ	15
2.3.1. NO Vericileri.....	17
2.3.2. NOS Engelleyicileri	17
2.3.3. NO/cGMP Yolundaki Etkileyiciler	18
2.4. MODEL ORGANİZMA OLARAK MAYALAR	18
2.4.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	18
2.4.2. Maya ve Bazı Mantar Türlerinde NO'ya Bağlı Etkiler	21
2.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ	23
2.5.1. Dizi Benzerliği Karşılaştırmaları	27
2.5.2. Gen Anlatımı Profillerinde Saptanan Değişimlerin Doğrulanması	27
2.5.3. Gerçek Zamanlı PZR Tekniği	28

3. MALZEME VE YÖNTEM	32
3.1. ORGANİZMA	32
3.2. BESİ ORTAMLARI.....	32
3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	33
3.4 L-NAME VE SNP UYGULAMASI	33
3.5. L-NAME’NİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	34
3.6. SNP’NİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ	34
3.7. NO VE cGMP DÜZEYİNDEKİ AZALMANIN HÜCRELERDEKİ ETKİLERİ...35	
3.7.1. Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler.....	35
3.7.2. Mayoz Bölünme ve Spor Oluşumu Üzerindeki Etkiler.....	35
3.7.3. Stres Yanıtı ve Apoptoz Üzerindeki Etkiler.....	36
3.8. NOS AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI.....	36
3.8.1. Protein İzolasyonu.....	37
3.8.2. Protein Konsantrasyonun Saptanması	37
3.8.3. NOS Aktivitesinin Ölçülmesi.....	38
3.9. KÜLTÜR ORTAMINDA NO ÇIKIŞININ SAPTANMASI	39
3.10. FARKLILIK GÖSTERİMİ	40
3.10.1. Total RNA İzolasyonu.....	40
3.10.2. RNA’nın Elektroforetik Analizi.....	42
3.10.3. cDNA Sentezi	43
3.10.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	44
3.10.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi.....	45
3.10.6. Gümüş Boyama	46
3.10.7. Jelden Geri Kazanım ve İkinci Çoğaltım	47
3.11. NÜKLEOTİD DİZİLEMESİ VE DİZİ BİLGİLERİNİN ANALİZİ	47
3.12. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	48
3.12.1. cDNA Kalıpları.....	49
3.12.2. Primerler	49
3.12.3. Reaksiyon Koşulları	50
3.12.4. Sonuçların Analizi	51

4. BULGULAR	53
4.1. L-NAME VE SNP'NİN HÜCRELERİNİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ	53
4.1.1. L-NAME'nin Hücrelerin Yaşam Yetenekleri Üzerindeki Etkisi	53
4.1.2. SNP'nin Hücrelerin Yaşam Yetenekleri Üzerindeki Etkisi.....	54
4.2. NOS AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ	55
4.2.1. Protein Konsantrasyonu Tayini.....	55
4.2.2. NOS Aktivitesinin Ölçülmesi.....	55
4.3. SNP'NİN NO₂ BİRİKİMİNE ETKİSİ	58
4.4. NO KONSANTRASYONLARINDAKİ DEĞİŞİMLERE DUYARLI GENLERİN SAPTANMASI.....	59
4.4.1. Total RNA Konsantrasyonları	59
4.4.2. cDNA Sentezi	60
4.4.3. Rastgele ve Oligo dT Primerlerle PZR.....	61
4.4.4. PZR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektrophoreziyle Ayrımı	62
4.4.5. cDNA Parçalarının Jelden Geri Kazanımı	63
4.5. DİZİ BİLGİLERİNİN ANALİZİ	65
4.5.1. Dizi Bilgilerinin Genom ve Protein Veri Tabanlarındaki Benzerlik Analizleri.....	67
4.6. GEN ANLATIMINDA SAPTANAN DEĞİŞİMLERİN GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLU	74
4.7. NO'NUN HÜCRE BÖLÜNMELERİ VE STRES YANITINDAKİ ETKİLERİ	79
4.7.1. NO'nun Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri.....	80
4.7.2. NO'nun Mayoz Bölünme ve Spor Oluşumu Üzerindeki Etkileri	83
4.7.3. NO'nun Apoptozun Teşvik Edildiği Hücrelerdeki Etkileri.....	85
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	87
KAYNAKLAR	102
EKLER	117
EK-1. BLAST analizlerinde yüksek skor üreten sorgulamalara ilişkin dizi bilgileri ve bazı skorlar için elde edilen sonuçlar	117

EK-2. <i>sid1</i>, <i>cam1</i>, <i>omt2</i> ile BH4 sentezi için gerekli olan GTP-siklo hidrolazları şifreleyen SPAC17A5.13, SPAP27G11.09c, SPAC1002.19 genlerinin mayoz sırasındaki anlatım profillerine değişimleri gösteren grafikler.	128
EK-3. Memeli ve maya hücrelerinde benzer işleve sahip MAPK sinyal yolu bileşenleri	131
ÖZGEÇMİŞ	132

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.	:NOS enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen NO sentezi	5
Şekil 2.2.	:NOS enzimi ve yapısına katılan kofaktörlerin şematik görünümü.....	6
Şekil 2.3.	:(a) NOS (b) sitokrom P450 enzimlerinde elektron akışı	7
Şekil 2.4.	:NOS veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin doğadaki dağılımı.....	9
Şekil 2.5.	:NO/cGMP sinyal yolu.....	11
Şekil 2.6.	:İnsan monosit hücre kültüründe NO'nun gen anlatımı üzerindeki etkileri	14
Şekil 2.7.	: <i>S. pombe</i> hücrelerinde haploid ve diploid yaşam çevrimleri.....	19
Şekil 2.8.	:Farklılık gösterimi tekniğinin temel aşamaları.....	25
Şekil 2.9.	:GZ PZR tekniğinin kullanımındaki artışı gösteren grafik.....	28
Şekil 2.10.	:SYBR Green boyasının (a) absorpladığı ve yaydığı ışınların dalga boyları (b) ortamdaki çift zincirli DNA moleküllerine bağlanması.....	29
Şekil 2.11.	:TaqMan hidroliz problemlerinin çalışma ilkesi	30
Şekil 4.1.	:L-NAME'nin çeşitli konsantrasyonlarının hücrelerin yaşam yetenekleri üzerine etkisi	53
Şekil 4.2.	:SNP'nin çeşitli konsantrasyonlarının hücrelerin yaşam yetenekleri üzerindeki etkisi	54
Şekil 4.3.	: <i>S. pombe</i> ham hücre özütlerinde bağl fluoresans şiddeti değişimleri ..	56
Şekil 4.4.	: <i>S. pombe</i> ham hücre özütlerinde, DAF2T oksidasyonu reaksiyonunda 648. saniyede kontrole göre fluoresans değişim oranları	57
Şekil 4.5.	:Çeşitli SNP konsantrasyonlarının kültür ortamındaki NO ₂ birikimine etkisi.....	59
Şekil 4.6.	:Total RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel elektroforezi görüntüleri	60
Şekil 4.7.	:cDNA sentezi ürünlerinden bazılarının agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri	61
Şekil 4.8.	:PZR ürünlerinden rastgele alınan bazı örneklerin agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri	62
Şekil 4.9.	: PZR ürünlerinin poliakrilamid jeldeki görüntüleri.....	63
Şekil 4.10.	:Saflaştırılmış DNA örneklerinin agaroz jeldeki görüntülerine ait örnek	64
Şekil 4.11.	:(a) "S2A+ L2A-" örneğine ait dizileme sonucu	65
Şekil 4.11.	:(b) "S2A+ L2A-" örneğinin dizilenmesi sırasında cihazda kaydedilen sinyallere ilişkin grafik	66
Şekil 4.12.	: "S2A+ L2A-" dizisinin <i>S. pombe</i> genom veri bankasında BLASTX programına uygulanması	68
Şekil 4.13.	: "S2A+ L2A-" dizisine ilişkin BLASTX analizi sonuçları	69
Şekil 4.14.	: <i>S. pombe</i> 'de Byr1 proteininin işlevleri ve hücrede rol oynadığı süreçlere ilişkin bazı veriler	70
Şekil 4.15.	: <i>S. pombe</i> 'de Byr1 proteininin moleküler etkileşimlerine ilişkin bazı bilgiler	70

Şekil 4.16.	:Seri sulandırılarda (1, 1/10, 1/100) <i>act1</i> ve <i>pek1</i> genleri için belirlenen Ct değerleri 75
Şekil 4.17.	:(a) <i>act1</i> , <i>pek1</i> , <i>wis1</i> ve <i>byr1</i> genlerini kapsayan bir PZR serisinde kaydedilen zemin gürültüleri, (b) çoğalmanın anlamlı kabul edileceği uygunluk noktası 76
Şekil 4.18.	: <i>act1</i> ve <i>pek1</i> genleri için reaksiyon verimlerini gösteren standart eğriler..... 77
Şekil 4.19.	: <i>act1</i> ve <i>pek1</i> genleri için elde edilen erime eğrileri 77
Şekil 4.20.	:L-NAME ve SNP uygulamasıyla <i>sid1</i> , <i>ppk14</i> , <i>pek1</i> ve <i>ubp12</i> genlerinin anlatımlarında PFAFFL denkleminde göre hesaplanan değişimler 79
Şekil 4.21.	(a) L-NAME içermeyen, (b) L-NAME içeren ortamlarda koloni morfolojileri 81
Şekil 4.22.	:(a) L-NAME eklenmemiş, (b) L-NAME içeren ortamda üreyen hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri (400X) 81
Şekil 4.23.	:(a) Metilen mavisi içermeyen, (b) metilen mavisi içeren petrilere oluşan kolonilerin görüntüsü 82
Şekil 4.24.	:(a) Metilen mavisi eklenmemiş (b) Metilen mavisi içeren ortamdaki hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri (600X) 82
Şekil 4.25.	:Kontrol, L-NAME ve metilen mavisi içeren MEA'dan 3. ve 12. günlerde alınan örneklerin ışık mikroskopundaki görüntüleri (400X) 84
Şekil 4.26.	:(a) H ₂ O ₂ uygulanmamış (b) H ₂ O ₂ uygulanmış (c) L-NAME etkisinde bırakıldıktan sonra H ₂ O ₂ uygulanmış, (d) Metilen mavisi etkisinde bırakıldıktan sonra H ₂ O ₂ uygulanmış hücreler 85
Şekil 4.27.	:H ₂ O ₂ uygulamasıyla yaratılan oksidatif stres koşullarında L-NAME ve metilen mavisinin hücrelerin hayatta kalma oranlarına etkisi 86

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1.	:Farklılık gösterimi tekniğinin diğer tekniklerle karşılaştırılması	26
Tablo 3.1.	:Çalışmada kullanılan besi ortamları	32
Tablo 3.2.	:MML besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler.....	33
Tablo 3.3.	:Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan çözeltiler	37
Tablo 3.4.	:NOS aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde kullanılan reaksiyon bileşenleri	38
Tablo 3.5.	:NOS aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesinde kullanılan deney serileri	39
Tablo 3.6.	:Agaroz-formaldehit jel sisteminde kullanılan tamponlar ve bileşenleri	42
Tablo 3.7.	:cDNA sentezinde kullanılan oligo-dT primerlerinin dizileri	43
Tablo 3.8.	:PZR reaksiyonlarında kullanılan rastgele primerlerin dizileri.....	44
Tablo 3.9.	:Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözelti ve tamponlar ...	46
Tablo 3.10.	:GZ PZR yönteminde kullanılan primerler	50
Tablo 4.1.	:L-NAME'nin çeşitli konsantrasyonlarının ortalama koloni sayısına etkisi	54
Tablo 4.2.	:Spektrofotometrik ölçümlerde elde edilen bağıl floresans değerleri	56
Tablo 4.3.	:SNP'nin ortamdaki NO ₂ birikimine etkisi	58
Tablo 4.4.	:Kontrol ile SNP ve L-NAME etkisinde tutulan örneklerdeki total RNA konsantrasyonları	60
Tablo 4.5.	:BLAST analizlerinde önemli benzerlikler gösteren dokuz dizinin köken ve yaklaşık molekül boyutlarına ilişkin veriler	71
Tablo 4.6.	:BLASTN veya BLASTX analizleri sonucunda saptanan önemli benzerliklere ilişkin bulgular	72
Tablo 4.7.	:BLAST analizi sonuçlarına göre seçilen genlerin adları ile ürünlerinin işlevleri	73
Tablo 4.8.	: L-NAME ve metilen mavisi içeren petrilerdeki ortalama koloni sayıları	82

SEMBOL LİSTESİ

ANOVA	: varyans analizi (“analysis of variance”)
APS	: amonyum persülfat
bç	: baz çifti
BH ₄	: tetrahidrobiyopterin
BLAST	: “basic local alignment search tool”
BSA	: sığır serum albumin (“bovine serum albumin”)
CaCl ₂	: kalsiyum klorür
CaM	: kalmodulin
cGMP	: siklik guanozin monofosfat
CN ⁻	: siyanid
cNOS	: konstitütif nitrik oksit sentaz
Ct	: anlamlı artışın saptandığı çevrim sayısı
CuSO ₄	: bakırsülfat
DAF-2	: 4,5-diaminfluoresan
DAF-2T	: 4,5-diaminfluoresan triazol
DD	: farklılık gösterimi (“differential display”)
DD RT-PZR	: farklılık gösterimi ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (“differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction”)
DEPC	: dietil pirokarbonat
dNTP	: deoksinükleozid trifosfat
DTT	: ditiotreitol
E	: verim (“efficiency”)
EDRF	: endotelyumdan türevlenen gevşetici faktör (“endothelium - derived relaxing factor”)
EDTA	: etilen diamin tetra-asetik asit
eNOS	: endotelyal nitrik oksit sentaz
EtBr	: etidyum bromür
FAD	: flavin adenin dinükleotid
FMN	: flavin mononükleotid
GTP	: guanozin trifosfat
GZ PZR	: gerçek zamanlı PZR (“real time PCR”)

H ₂ O ₂	: hidrojen peroksit
HEPES	: 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
iNOS	: teşvik edilebilen (uyarılabilen) NOS
L-NAME	: <i>N</i> ^G -nitro-L-arjinin metil ester
µl	: mikrolitre
µM	: mikromolar
M	: molar
MAPK	: mitojenlerle aktifleşen protein kinaz
MEA	: malt özütü katı besi ortamı
MgCl ₂	: magnezyum klorür
ml	: mililitre
mM	: milimolar
MMA	: minimal katı besi ortamı
MML	: minimal sıvı besi ortamı
MOPS	: morfolinopropansulfonik asit
N	: normalite
Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆	: sodyum tartarat
Na ₂ CO ₃	: sodyum karbonat
NADPH	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH	: sodyum hidroksit
NCBI	: “National Center for Biotechnology Information”
nm	: nanometre
nNOS	: nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: nitrik oksit
NO ⁺	: nitrozonyum iyonu
NO ₂	: nitrit
NO ₃	: nitrat
NOS	: nitrik oksit sentaz
NTC	: kalıp içermeyen kontrol
ODQ	: 1H-[1,2,4]oksadiazolo[4,3-a]kinoksalin-1
PAK	: p21 ile aktifleşen kinaz (“p21-activated kinase”)
PI 3-K	: fosfoinositid 3-kinaz
PKC	: protein kinaz C

PMSF	: fenilmetilsülfonil florür
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
RDA	: temsili fark analizi (“representational difference analysis”)
RFU	: bağıl fluoressans birimi (“relative fluorescence unit”)
S.E.	: standart hata (“standart error”)
S.E.M	: ortalamanın standart hatası (“standard error of the mean”)
SAGE	: gen anlatımının seri analizi (“serial analysis of gene expression”)
sGC	: sitosolik guanilil siklaz
SH	: dışlayıcı melezleme (“subtractive hybridization”)
SIN	: septum başlangıç ağı (“septum initiation network”)
SNP	: sodyum nitropurisid
SSH	: dışlayıcı melezlemenin baskılanması (“suppression subtractive hybridization”)
TBE	: tris, borik asit, EDTA içeren tampon
TEMED	: tetrametiletilendiamin
YEA	: maya özütli zengin katı besi ortamı
YEL	: maya özütli zengin sıvı besi ortamı

ÖZET

Schizosaccharomyces pombe'DE GEN ANLATIMINDAKİ NİTRİK OKSİDE BAĞIMLI DEĞİŞİMLERİN ARAŞTIRILMASI

Memeli hücrelerinde önemli fizyolojik olayların düzenlenmesinde rol oynadığı bilinen nitrik oksidin (NO) memeliler dışında, prokaryotlardan gelişmiş yapıli ökaryotlara kadar çok çeşitli canlı türünde de bazı fizyolojik işlevleri üstlenebildiği ve bu organizmalarda nitrik oksit sentazınine (NOS) benzer aktivite göstererek NO oluşumunu katalizleyen enzimlerin varlığı gösterilmiştir. Moleküler düzeydeki özellikleri bakımından memeli hücrelerine benzerlik gösterdiği için uygun bir model organizma olarak kabul edilen *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde ise NOS aktivitesinin varlığı bilinmemekte ve NO'nun fizyolojik işlevleri hakkında çok sınırlı bilgi bulunmaktadır.

Bu çalışmada, *S. pombe*'de NOS aktivitesinin var olup olmadığının belirlenmesi, eğer aktivite varsa anlatımları hücre içi NO konsantrasyonundaki artma ve azalma şeklindeki değişimlere duyarlı olan genlerin saptanması ve bu genlerin işlevlerinden yola çıkılarak NO'nun bazı fizyolojik olayların düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak etki gösterip gösteremeyeceğinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada, spektrofotometrik bir yöntemle *S. pombe* ham hücre özütlerinde NOS'unine benzer aktivitenin varlığı ilk kez gösterildi. Anlatımları hücre içi NO düzeyindeki değişimlere duyarlı olabilen genlerin saptamasına yönelik olarak, farklılık gösterimi tekniği ile NOS engelleyicisi olan N^G -nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME) etkisinde bırakılan hücrelerde anlatımları azalan veya duran, NO vericisi olan sodyum nitropurissid (SNP) uygulamasıyla da anlatımları artan cDNA'lar belirlendi. Nükleotid dizilemeleri yapılan cDNA'ların, *S. pombe* genom veri tabanında gerçekleştirilen BLAST analizleriyle PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1*, *pek1*, *sid1*, *wis1*, *ppk14* ve *ubp12* genlerine benzerlik gösterdikleri saptandı. Bu genlerden *pek1*, *sid1* ve *ubp12*'nin NO düzeyindeki değişimlere yanıt olarak anlatımlarında gözlenen değişimler gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle kantitatif olarak doğrulandı.

pek1, *sid1* ve *ubp12* genlerinin bilinen işlevleriyle ilişkili olarak yapılan morfolojik ve fizyolojik düzeydeki bazı denemeler, NO'nun *S. pombe*'de mitoz bölünme, mayoz bölünme, spor oluşumu, programlı hücre ölümü ve hücre bütünlüğünün korunması gibi işlevlerin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini işaret etti. Ayrıca, elde edilen bulgular NO'nun genel olarak hücre bölünmeleri ve stres yanıtı ile ilişkili etkilerinin MAPK sinyal yolundaki bazı bileşenlerin uyarılması aracılığıyla meydana gelebileceğini düşündürdü. Ek olarak, *S. pombe*'de NO'ya duyarlı olduğu belirlenen bu genlerin memelilerdeki homologlarının da benzer işlevlere sahip olmaları, bu mayanın NO'nun hücrelerdeki moleküler düzeydeki etkilerinin araştırılmasında uygun bir model sistem olarak kullanılabileceğini ortaya koydu.

SUMMARY

INVESTIGATION OF NITRIC OXIDE DEPENDENT CHANGES IN GENE EXPRESSION IN *Schizosaccharomyces pombe*

Nitric oxide (NO) which is known to play important regulatory roles in various physiological processes in mammals is also shown to have some physiological functions in broad range of species other than the mammals, and nitric oxide synthase (NOS) like enzymes catalyzing NO production were found in these organisms. Presence of NOS activity has not been reported to date in *Schizosaccharomyces pombe* which is believed to be a convenient model organism since it shares a number of characteristic similarities with the mammalian cells at the molecular level, and very little is known about the physiological roles of NO in this yeast species.

In this study, we firstly aimed to find out whether *S. pombe* cell extracts had NOS activity, then in order to detect the genes which are sensitive to both decreased and elevated intracellular NO levels. We also aimed to investigate if NO could function in regulation of some physiological processes as a signaling molecule in relation with the cellular functions of NO sensitive genes to be detected in *S. pombe* cells.

NOS like activity was detected in the *S. pombe* crude cell extracts for the first time using a spectrofluorometric NOS assay. In order to detect the NO responsive genes, the cDNAs whose expression ratios decreased or repressed upon exposure to a NOS inhibitor N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), and elevated in response to a NO donor sodium nitroprusside (SNP) treatment were determined by employing differential display technique. BLAST analysis of the differentially expressed cDNAs sequences, performed in *S. pombe* genome database, produced significant similarities to PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1*, *pek1*, *sid1*, *wis1*, *ppk14* and *ubp12* genes of *S. pombe*. *pek1*, *sid1* and *ubp12* genes were quantitatively confirmed to be sensitive to the changes in the intracellular NO levels by employing real time polymerase chain reaction.

The data obtained from the experiments regarding the functions of *pek1*, *sid1* and *ubp12* genes addressed to the possibility that NO could have some regulatory roles in mitosis, meiosis, sporulation and apoptosis in *S. pombe*. Moreover, it may also be possible to suggest that the effects of NO on cell divisions and stress response pathways in this yeast are exerted through activation of some MAPK signaling pathway components. In addition, these findings may also imply that *S. pombe* can be used as a convenient model system for investigating the cellular effects of NO at the molecular level, as the NO responsive genes detected in *S. pombe* share similar functions with those of the mammalian homologs.

1. GİRİŞ

Doğal hali gaz formunda olan nitrik oksit (NO) azot ve oksijen atomlarından oluşan diatomik bir serbest radikaldir. Biyolojik işlevleri ilk kez 1980'lerin sonlarında ortaya koyulan NO (Groves ve Wang, 2000), memeli hücrelerinde kan basıncının düzenlenmesi, makrofajlar aracılığıyla gerçekleşen bağışıklık yanıtının oluşturulması, nöronlarda sinyal iletiminin düzenlenmesi vb. süreçlerde düzenleyici bir sinyal molekülü olarak rol oynamaktadır (Tuteja ve diğ., 2004).

Memeliler dışında, prokaryotlardan gelişmiş yapılı ökaryotik organizmalara kadar çok çeşitli canlı türünde NO oluşumunu katalizleyen nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi izoformları ve/veya NOS'a benzer aktivite gösteren enzimlerin varlığı gösterilmiş ve bu enzimlerin işlevine bağlı olarak açığa çıkan NO molekülünün hücrelerde sinyal molekülü olarak rol oynayabildiğine ilişkin kanıtlar da elde edilmiştir (Gorren ve Mayer, 2007).

Fizyolojik süreçlerdeki düzenleyici etkilerini temel olarak NO'ya bağımlı cGMP sinyal yolu üzerinden gösterdiği (Friebe ve Koesling, 2003) bilinen NO'nun, bu yoldan bağımsız olarak farklı sinyal yolları aracılığıyla da etkili olabildiği (Hemish ve diğ., 2003, Cui ve diğ., 2005, Handy ve diğ., 2006) de anlaşılmıştır. Ayrıca, NO'nun sinyal yolları aracılığıyla ve/veya transkripsiyon faktörleriyle olan doğrudan etkileşimleri sonucunda, hücrede yaşamsal öneme sahip ve çoğunluğu hücre çevriminin programlanmasıyla ilişkili (Cui ve diğ., 2005) çok sayıda kilit genin anlatımını da değiştirebildiği gösterilmiştir (Bogdan 2001, Pfeilschifter ve diğ., 2001, Zhou ve Brüne, 2005, Rabkin ve Klassen, 2007).

Hücre için önemli düzenleyici etkiler gösteren NO düzeylerindeki anormal azalma veya artışlar memelilerde bazı metabolik olayları etkileyerek çeşitli hastalıklara da yol açabilmektedir (Wimalawansa, 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarla, NO'nun programlı hücre ölümü (apoptoz) ve tümör oluşumuyla ilişkili süreçlerde de önemli düzenleyici roller üstlenebileceği ortaya koyulmuştur (Mocellin ve diğ., 2007, Coulter ve diğ., 2008). Bu özellikler, aynı zamanda NO'nun hücre içi konsantrasyonunun hassas

bir şekilde kontrol edilerek hücre ve dolayısıyla organizma için uygun düzeylerde tutulmasının çok önemli olduğunu da göstermektedir.

NO'nun hücrede çeşitli süreçleri etkileyebilmesi, işlevlerinin oldukça karmaşık düzenlemeleri kapsayabileceğine işaret etmekte ve bu durum düzenleme mekanizmalarının anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Coulter ve diğ., 2008). NO düzeyindeki dengesizliklere bağlı hastalıkların ve tümör oluşumundaki hem teşvik edici hem de engelleyici yöndeki etkilerin (Mocellin ve diğ., 2007) moleküler temellerinin araştırılmasında, buna bağlı olarak NO'ya dayalı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde de, öncelikle bu molekülün sinyal yolları ve doğrudan gen anlatımı üzerindeki etkilerinin, diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin ve bu süreçlerde rol oynayan kontrol mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi önem taşımaktadır.

Bu bağlamda, son yıllarda hücrelerde NO'ya bağlı etkilerin araştırılması yönünde yapılan çalışmalarda, gelişmiş yapılı organizmalardaki karmaşık moleküler ilişkilerin ve mekanizmaların aydınlatılmasında çok önemli katkılar sağlayan tek hücreli model organizmalar olarak mayalardan da yararlanılmaktadır.

Schizosaccharomyces pombe maya türü genetik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki çeşitli özellikleri açısından özellikle memeli hücrelerine önemli benzerlikler göstermektedir (Schmidt ve diğ., 2007). Ayrıca, genomunda, yaklaşık yarısı kanserleşmeyle ilişkili olmak üzere insanlarda bazı hastalıkların oluşmasında rol oynayan genlere yüksek derecede dizi benzerliği gösteren genler de bulunmaktadır (Wood ve diğ., 2002). Ancak, bu mayada NO'nun çoğunlukla stres etkeni olarak ele alındığı bazı çalışmaların (Kim S. J. ve diğ., 2004, Sahoo ve diğ., 2006, Kim ve diğ., 2008, vb.) dışında, NOS aktivitesinin varlığı ve NO'nun sinyal iletimindeki olası rolleri hakkında hemen hiç bilgi bulunmamaktadır.

Bu çalışmada temel olarak, *S. pombe*'de NOS aktivitesinin var olup olmadığı, eğer aktivite varsa anlatımları hücre içi NO düzeyindeki değişimlere duyarlı olan genlerin saptanması ve bu genlerin bilinen işlevleriyle ilişkili olarak NO'nun bazı fizyolojik olaylarda sinyal molekülü olarak etki gösterip gösteremeyeceği sorularına yanıtlar aranması amaçlandı. Elde edilen bulgular doğrultusunda, NO'nun sinyal molekülü

olarak gen anlatımı ve fizyolojik süreçlerdeki düzenleyici etkilerinin araştırılmasında, *S. pombe*'nin uygun model organizma olarak değerlendirilip değerlendirilemeyeceğinin ortaya koyulması da hedeflendi.

Bu kapsamda gerçekleştirilen çalışmalarda, Sutherland ve diğ. (2004) tarafından geliştirilmiş olan, radyoaktivite uygulaması gerektirmeyen ve oluşan NO'nun doğrudan saptanmasına olanak veren spektrofotometrik bir yöntem kullanılarak *S. pombe* ham hücre özütlerinde NOS benzeri aktivitenin varlığı araştırıldı. Daha sonra, bu organizmada anlatımları hücre içi NO düzeyinde artma ve azalma biçimindeki değişimlere duyarlı olan genlerin saptanmasına yönelik çalışmalar yapıldı. Bu kapsamda bir NOS engelleyicisi olan L-NAME kullanımıyla hücre içi NO konsantrasyonunu azaltıldığı koşulda anlatımı azalırken; bir NO vericisi olan SNP uygulamasıyla NO konsantrasyonu artırıldığında anlatım düzeyleri artan genlerin belirlenmesi için farklılık gösterimi tekniğinden yararlanıldı. İlk kez Liang ve Pardee (1992) tarafından geliştirilmiş olan ve aynı anda ikiden fazla sayıda koşulun eş zamanlı olarak karşılaştırılmasına olanak veren bu teknik özellikle belli koşul altında anlatımları belirgin değişiklik gösteren anahtar genlerin saptanmasında ve yeni genlerin tanımlanmasında DNA çip teknolojisine alternatif olarak kullanılmaktadır.

Farklılık gösterim tekniğinin uygulandığı jellerde kontrol grubuna göre, L-NAME etkisinde bırakılan hücrelerde yoğunluğu azalırken veya yok olurken, SNP uygulamasıyla yoğunlukları arttığı gözlenen bantlar belirlendi. Bu bantlardaki cDNA molekülleri jellerden geri kazanıldıktan sonra nükleotid dizilemeleri yapıldı ve *S. pombe* genom veri tabanında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) dizi benzerlik (BLAST) analizleri gerçekleştirildi.

BLAST analizleri sonucunda, *S. pombe*'de benzerlikleri saptanan olası genlerin anlatımlarının, NO konsantrasyonu değişimlerinden etkilenip etkilenmedikleri, çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan özellikteki SYBR green temeline dayalı, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle (Higuchi ve diğ., 1992) sınılandı. Bu yöntemle anlatım düzeyleri anlamlı olarak değiştiği kantitatif olarak doğrulanan genlerin işlevlerine ilişkin literatür verilerinden bu genlerin hücrelerde rol oynadığı fizyolojik süreçler belirlendi. NO düzeyindeki değişimlere çok duyarlı olan bu genlerin

işlevlerinden yola çıkarak, NO'nun mitoz, mayoz bölünme, spor oluşumu ve apoptoz üzerindeki fizyolojik ve morfolojik düzeydeki olası etkileri, NOS engelleyicisi olan L-NAME ile bir guanilil siklaz engelleyicisi olan metilen mavisi kullanılarak, NO oluşumu ve/veya NO'ya bağlı cGMP sinyal yolunun engellendiği koşullarda dolaylı olarak araştırıldı.

Çalışma kapsamında elde edilen bulgular ve literatür verilerinin birlikte irdelenmesiyle, NO'nun *S. pombe*'de sinyal molekülü olarak hangi fizyolojik süreçlerde iş görebileceği ve varılan sonuçlardan özellikle gen anlatımının düzenlenmesi, apoptoz ve kanserleşme gibi olaylara ilişkin araştırmalarda nasıl yararlanılabileceği tartışıldı.

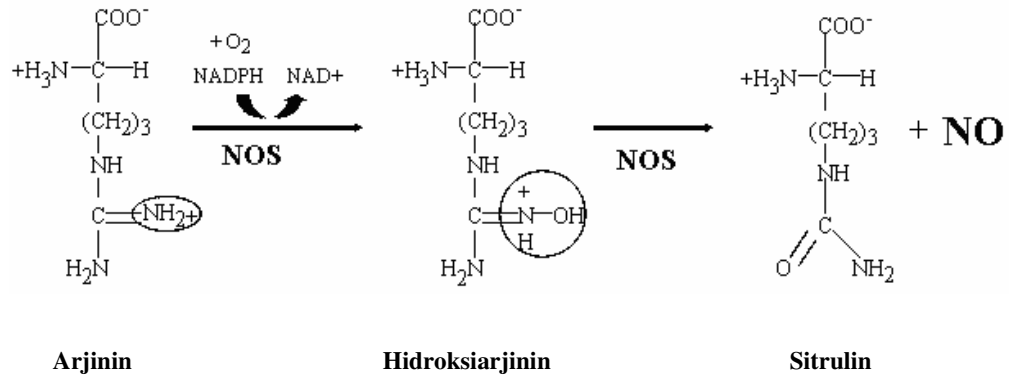
2. GENEL KISIMLAR

2.1 NİTRİK OKSİT (NO) ve NİTRİK OKSİT SENTAHLAR (NOS'LAR)

Nitrik oksit (NO), doğal hali gaz formunda olan azot ve oksijen atomlarından oluşan diatomik bir serbest radikaldır ve yapısında eşleşmemiş bir elektron bulundurması nedeniyle oldukça reaktiftir. Yarılanma ömrü çok kısa olan bu molekül oksijen içeren sulu çözeltilerde hızla oksitlenerek NO₂'ya göre daha kararlı yapıda olan nitrit (NO₂) ve nitrat (NO₃) moleküllerine dönüşebilmektedir. NO, çok yüksek difüzyon hızına sahip olduğundan hücre zarlarından kolaylıkla geçebilmektedir (Tuteja ve diğ., 2004).

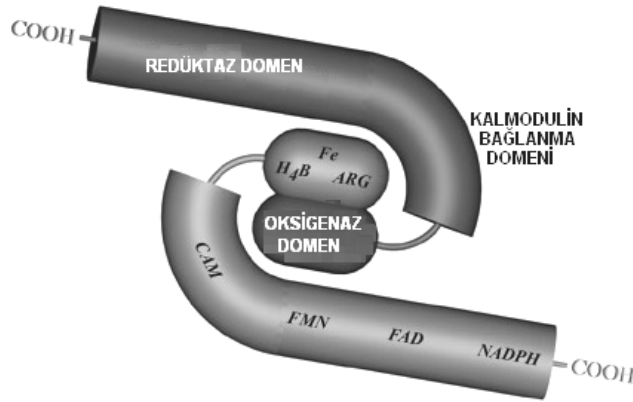
NO'nun kimyasal bir molekül olarak keşfi yaklaşık 200 yıl öncesine kadar uzansa da, bu molekülün hücrelerde oluştuğu ve biyolojik sistemlerde haberci molekül olarak rol oynayabileceği ancak 1980'li yılların sonlarına doğru anlaşılmıştır (Groves ve Wang, 2000).

Knowles ve diğ. (1989) sıçan beyni özütlerinde yaptıkları çalışmada, nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin (EC 1.14.13.39) L-arjinini substrat olarak kullanarak sitrulin ve NO oluşumunu katalizlediğini ilk kez göstermişlerdir. NO sentezi memeli hücrelerinde büyük ölçüde NOS enzimi tarafından kataliz edilen iki aşamalı reaksiyonla meydana gelmektedir (Şekil 2.1.) (Tuteja ve diğ., 2004).



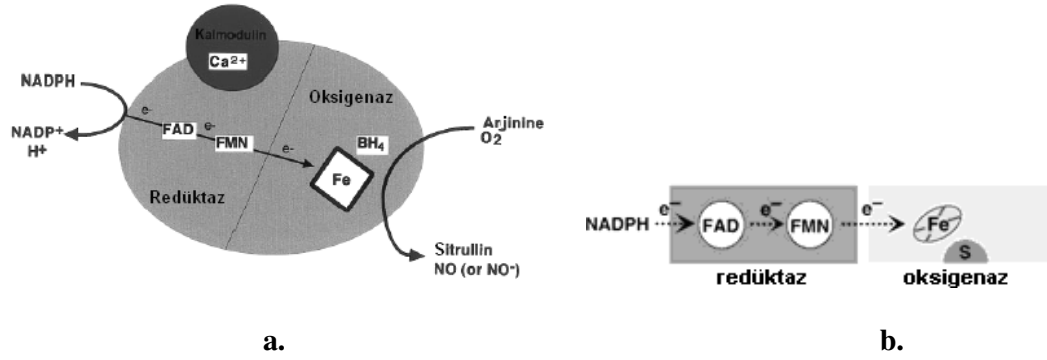
Şekil 2.1. NOS enzimi katalizörlüğünde gerçekleşen NO sentezi.

NOS'un izolasyonu ve yapısal analizi ilk kez sıçan beyninden elde edilen hücre özütlerinde Bredt ve Snyder (1990) tarafından yapılmıştır. NOS enzimi aktif formunda bir homodimerden oluşan dördüncül yapıya sahip olup, her bir NOS monomerine sıkıca bağlı bulunan birer adet kalmodulin (CaM), tetrahidrobiopterin (BH₄), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) kofaktörlerinden oluşur (Alderton ve diğ., 2001) (**Şekil 2.2.**).



Şekil 2.2. NOS enzimi ve yapısına katılan kofaktörlerin şematik görünümü
(<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/no/synthesis.htm>).

NOS enzimi, tiyolat bağlı bir hem grubu taşıması, substratının yapısına bir oksijen atomunun katılması reaksiyonunu (monooksijenaz reaksiyonu) kataliz etmesi, elektron kaynağı olarak NADPH'yı kullanması gibi yapısal ve işlevsel bazı özellikleri bakımından sitokrom P450 enzimlerine benzerlik göstermektedir (**Şekil 2.3.**). Ancak, NOS'un sadece dimerik yapıda aktif olması, aktivitesi için CaM ve BH₄ kofaktörlerini gerektirmesi ve redüktaz domenlerindeki yaklaşık % 60 dizi homolojisi dışında iki enzim grubu arasında dizi benzerliği bulunmaması NOS enziminin sitokrom P450 ailesinin bir üyesi olmadığını göstermektedir (Gorren ve Mayer, 2007).



Şekil 2.3. (a) NOS (Alderton W. K. ve diğ.(2001) (b) sitokrom P450 (Gorren AC, Mayer B. 2007) enzimlerinde elektron akışı.

Memelilerde, ikisi sürekli sentezlenen (konstitütif, cNOS), biri sentezi sitokin ve endotoksinlerle teşvik edilebilen (iNOS) olmak üzere üç çeşit NOS izoformu bulunmaktadır. cNOS'ların damar içi epitel (endotel) hücrelerindeki formu eNOS, çevresel sinir sistemine ait nöronlarda görülen formu ise nNOS olarak adlandırılmaktadır. nNOS ve iNOS memeli hücrelerinde genellikle sitoplazmada yer alırken, eNOS büyük oranda hücre zarına bağlı olarak bulunmaktadır (Pollock ve diğ., 1991). İnsan genomunda NOS izoformlarını (eNOS, nNOS ve iNOS) şifreleyen genler tek kopya olarak farklı kromozomlarda yer almaktadır (Alderton ve diğ., 2001).

Başta makrofajlar olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde bulunabilen ve özellikle bağışıklık yanıtının oluşturulmasıyla ilişkili bazı süreçlerde rol oynadığı bilinen iNOS, yüksek düzeylerde (mikromolar düzeyde) NO sentezleyebilmektedir. CaM afinitesi oldukça yüksek olan iNOS, nNOS ve eNOS'un tersine, çok düşük Ca⁺² konsantrasyonlarında bile yapısına CaM bağlandığında (geri-dönüşümsüz bağlanma) aktifleşebilmektedir. Bu nedenle, aktivite düzeyi hücre içi Ca⁺² artışından bağımsız olan bu NOS izoformunun aktivitesinin temelde transkripsiyon düzeyinde kontrol edildiği düşünülmektedir (Alderton ve diğ., 2001).

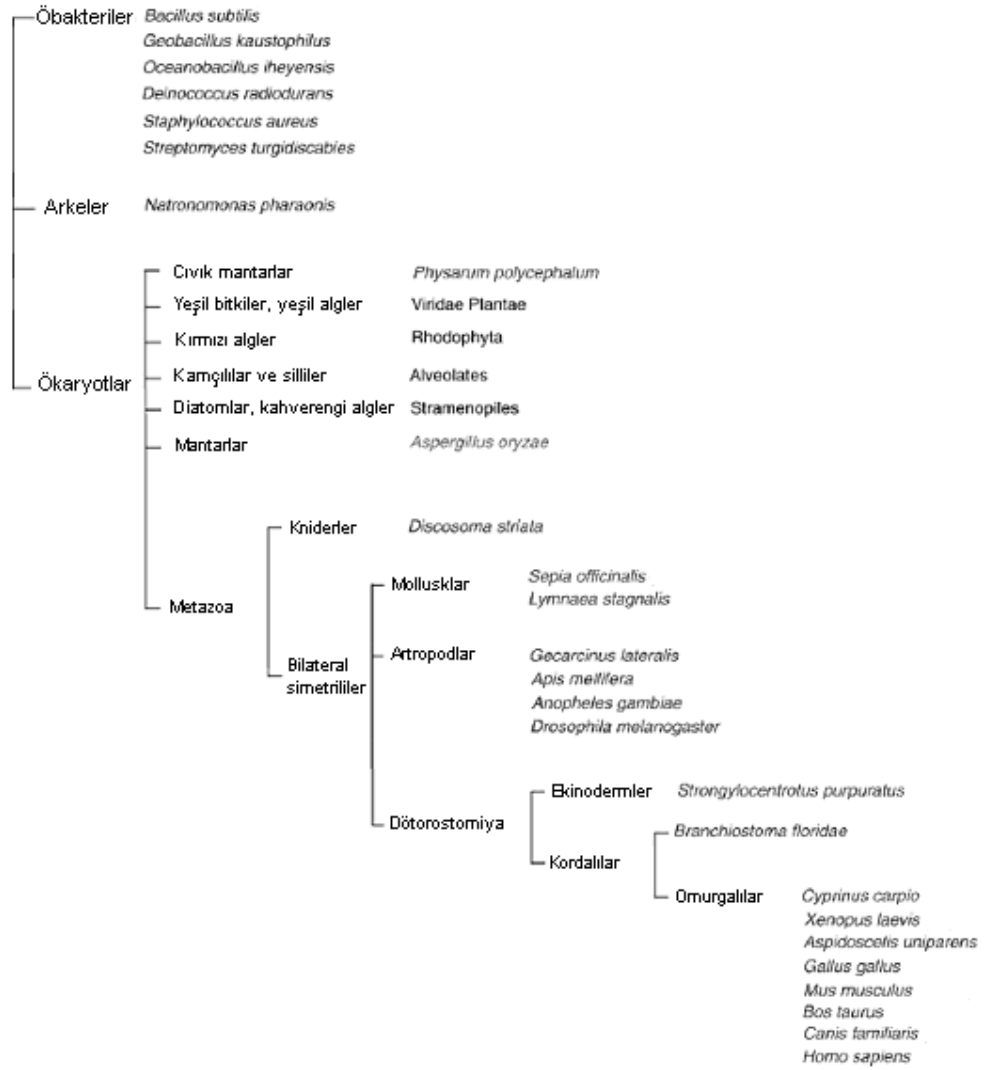
Damar içi epitel hücrelerindeki eNOS esas olarak kan basıncının düzenlenmesi için gerekli NO üretiminde rol oynarken, merkezi ve çevresel sinir sistemi hücrelerinde bulunan nNOS nöronlardaki sinyal iletiminin düzenlenmesinde iş görmektedir (Tuteja ve diğ., 2004). nNOS ve eNOS izoformlarının aktivite düzeyleri Ca⁺² konsantrasyonuna bağımlı şekilde kontrol edildiğinden, hücre içi Ca⁺² düzeyindeki artışla birlikte

CaM aktifleşerek NOS dimerlerine geri dönüşümlü olarak bağlanıp bu enzimlerin aktifleşmesini sağlamaktadır (Stuehr, 1999).

NOS'un veya NOS'unlike benzer aktiviteye sahip enzimlerin varlığı memeliler dışında başka canlı gruplarında da gösterilmiştir. Prokaryotlardan *Nocardia* türleri (Chen ve Rosazza, 1995), *Salmonella typhimurium* (Choi ve diğ., 2000), *Bacillus subtilis* (Adak ve diğ., 2002), *Staphylococcus aureus* (Hong ve diğ., 2003) vb çeşitli bakteri türlerinde NOS'unlike benzer aktivite gösteren enzimler izole edilerek yapıları araştırılmıştır.

Ökaryotlarda, NOS enzimi aktivitesiyle ilgili çalışmalar genellikle hayvanlar aleminde yoğunlaşmakla birlikte diğer canlı gruplarında da konuya ilişkin araştırmalar bulunmaktadır. *Saccharomyces cerevisiae* maya türünde (Kanadia ve diğ., 1998), *Physarum polycephalum* (Golderer. ve diğ., 2001), *Phycomyces blakesleeianus* (Maier ve diğ., 2001), *Colletotrichum coccodes* (Wang ve Higgins, 2005) gibi bazı mantar türlerinde ve bazı bitkilerde (Rio ve diğ., 2004) NOS'unlike benzer aktivite gösteren enzimlerin varlığı gösterilmiştir. Bazı böcek (Muller U., 1997) ve yumuşakça (Huang ve diğ., 1997, Palumbo, 2005) türleri gibi omurgasızların yanı sıra çok çeşitli omurgalılarda (Gorren ve Mayer, 2007) NOS izoformları izole edilmiş ve bu enzimleri şifreleyen genler tanımlanmıştır.

Farklı organizmalara ait NOS'ların protein veritabanlarındaki benzerlik analizleri sonuçlarına göre, Gorren ve Mayer, (2007) tarafından oluşturulan ve NOS'ların doğadaki dağılımını gösteren şema **Şekil 2.4.**'de verilmiştir.



Şekil 2.4. NOS veya benzer aktiviteye sahip enzimlerin doğadaki dağılımı (Gorren ve Mayer, 2007)'den

Şekil 2.4.'de görüldüğü gibi, NOS'a benzer proteinler üç canlı domeninde de bulunmaktadır. Bununla birlikte, *Aspergillus oryzae* dışında diğer mantarlar, algler ve bitkilerdeki NOS'unlike benzer aktiviteye sahip proteinler yapısal bakımdan hayvanlardaki NOS'lara dizi homolojisi göstermediğinden, bu enzimin tüm türlerde evrensel olarak varlığından söz edilemeyeceği yönünde görüşler de vardır (Gorren ve Mayer, 2007).

Canlı sistemlerde NO oluşumu büyük ölçüde NOS'lar aracılığıyla sağlanmakla birlikte, özellikle bitkilerde nitritin karotenoidler tarafından (Cooney ve diğ., 1994) veya asidik ortamlarda indirgenmesi (Stöhr ve Ulrich, 2002), nitrifikasyon / denitrifikasyon çevrimlerinde yan ürün oluşumu (Wojtaszek, 2000) ve hidrojen peroksidin L- arjininle etkileşimi (Nagase ve diğ., 1997) gibi enzimatik olmayan çeşitli yollardan da NO çıkışı olabileceği gösterilmiştir.

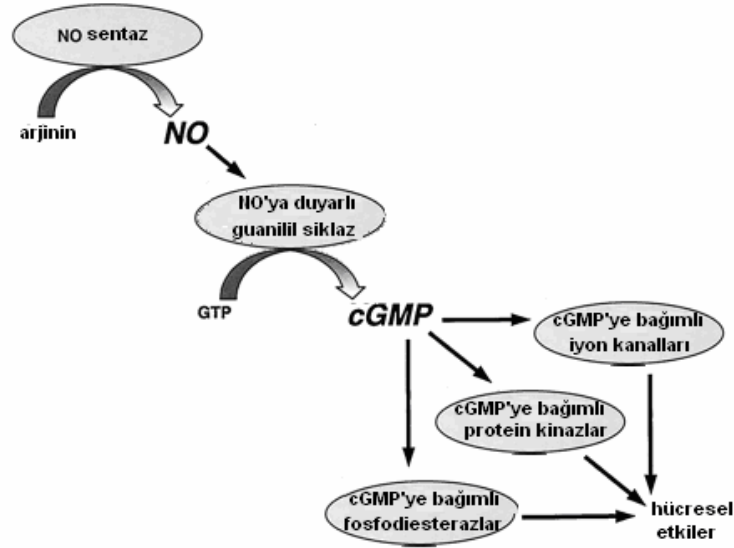
2.2. NO'NUN SİNYAL MOLEKÜL OLARAK İŞLEVLERİ

Ignarro ve diğ. (1987)'nin yaptıkları çalışmalarla, endotel hücrelerinden salınarak damarların gevşemesine neden olan ve endotelyumdan türevlenen gevşetici faktör ("endothelium-derived relaxing factor", EDRF) adı verilen bir molekülün NO olduğunun anlaşılmasıyla, bu molekülün biyolojik önemi moleküler düzeyde ilk kez ortaya koyulmuştur. Bu tarihten sonra, NO'nun biyolojik işlevlerine ilişkin çalışmalar hız kazanmış ve memelilerde kan basıncının düzenlenmesi, nöronal sinyal iletimi, bağışıklık sisteminin aktifleştirilmesi, programlı hücre ölümü gibi önemli süreçlerde düzenleyici rol oynadığı anlaşılmıştır. Bu bağlamda, NO'nun memeli hücrelerinde bir sinyal molekül olarak öneminin aydınlatılması yönündeki yoğun çalışmalarından dolayı R. Furchgott, L. Ignarro ve F. Murad Fizyoloji ve Tıp alanındaki 1998 yılı Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir (<http://nobelprizes.com/nobel/medicine/>).

Fizyolojik süreçlerdeki etkilerini temel olarak NO'ya bağımlı cGMP (NO/cGMP) sinyal yolu üzerinden gösterdiği (Friebe ve Koesling, 2003) bilinen NO'nun, farklı sinyal yolları aracılığıyla da etkili olabildiği gösterilmiştir (Handy ve diğ., 2006, Hemish ve diğ 2003, Cui ve diğ., 2005). NO/cGMP yolundan bağımsız olan etkilerin genel olarak NO'nun proteinlerde meydana getirdiği translasyon sonrası değişimlerle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Handy ve diğ., 2006). Ayrıca, NO'nun bazı transkripsiyon faktörleri ve mRNA'ya bağlanan proteinlerde yapısal değişimlere yol açarak gen anlatımının düzenlenmesinde doğrudan etkili olabildiği de anlaşılmıştır (Bogdan 2001, Osajca ve diğ., 2007.).

2.2.1. NO'nun cGMP Sinyal Yoluna Etkisi

NO/cGMP sinyal yolunda, NO'nun memeli hücrelerindeki en önemli reseptörünün GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü kataliz eden, nitrik okside duyarlı guanilil siklaz (NO'ya duyarlı GC) (ya da sitosolik guanilil siklaz, sGC) olduğu kabul edilmektedir. Hücrede NO sentezi arttığında, geçiş metalleriyle çok kolay reaksiyona girebilen NO'nun, NO'ya duyarlı GC'nin yapısındaki Fe^{+2} içeren hem grubuna bağlandığı ve enzimin katalitik aktivitesini yaklaşık 200 kat artırdığı bilinmektedir. NO etkisiyle cGMP düzeyinde meydana gelen artışa yanıt olarak da, başta cGMP'ye bağımlı kinazlar olmak üzere, cGMP-geçişli iyon kanalları, cGMP ile düzenlenen fosfodiesterazlar gibi çeşitli yapı ve moleküllerin aktivite düzeyleri değişmektedir (**Şekil 2.5.**). NO/cGMP sinyal yolunun memelilerde özellikle düz kasların gevşemesi, sinaptik iletinin düzenlenmesi ve platelet agregasyonunun engellenmesi gibi önemli süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir (Friebe ve Koesling, 2003).



Şekil 2.5. NO/cGMP sinyal yolu (Friebe ve Koesling, 2003).

2.2.2. NO'nun cGMP'ye Bağımlı Olmayan Sinyal Yollarına Etkisi

NO'nun cGMP'den bağımsız sinyal yollarını etkilemek üzere proteinlerde translasyon sonrası yapısal değişimler meydana getirdiği bilinmektedir (Leon ve diğ., 2008). Bu değişimlerden, S-nitrozillenme olarak adlandırılan ve sistein bakiyelerindeki tiyol gruplarına NO eklenmesinin fosforillenmeye benzer bir sinyal etkisi yarattığı düşünülmektedir. Ancak, rastlantısal biçimde olmayan S-nitrozillenmenin, fosforillenme ve ubiquitinlenme gibi süreçlerden farklı olarak enzimlerden bağımsız şekilde meydana geldiği vurgulanmaktadır (Leon ve diğ., 2008). Örneğin, geri dönüşümlü olarak gerçekleşebilen S-nitrozillenmenin bazı proteinlerin işlevini değiştirerek yeni protein-protein etkileşimlerine olanak sağlayabildiği belirtilmektedir (Handy ve diğ., 2006). S-nitrozillenmenin de cGMP sinyal yolundan bağımsız olarak çok sayıda iyon kanalının işlevinin düzenlenmesinde etkili olabildiği ortaya koyulmuştur (Blaise, 2005).

S-nitrozillenmenin yanı sıra NO'nun, proteinlerin tirozin bakiyelerine üç atomlu bir azot grubu eklenmesinde rol oynayarak tirozin nitratlanması adı verilen bir değişime de neden olabildiği ortaya koyulmuştur (Schopfer ve diğ., 2003). Ayrıca, S-nitrozillenmiş proteinlerin yapısına katılan NO'nun bazı durumlarda glutatyonla yer değiştirerek, bu proteinlerin S-nitrozillenmiş biçimden S-glutatyonlu biçime dönüşebilmektedir. Disülfid bağları aracılığıyla meydana gelen ve geri dönüşebilir biçimde olan tirozin nitratlanması ve S-glutatyonlanmanın, proteinlerin işlevinin düzenlenmesinde rol oynadığı vurgulanmaktadır (Leon ve diğ., 2008). NO'ya bağımlı translasyon sonrası protein değişimlerinin gerçekleşebilmesi için, hücre içi NO konsantrasyonunun NO/cGMP yolundakine göre daha yüksek düzeye ulaşmasının gerekli olabileceği belirtilmektedir (Blaise, 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla NO'nun etkisiyle proteinlerin yapısında meydana gelebilen S-nitrozillenme, tirozin nitratasyonu ve S-glutatyonlanma biçimindeki translasyon sonrası değişimlerin özellikle kanserleşme ve apoptoz süreçlerinde önemli işlevleri olabileceği gösterilmiştir (Leon ve diğ., 2008).

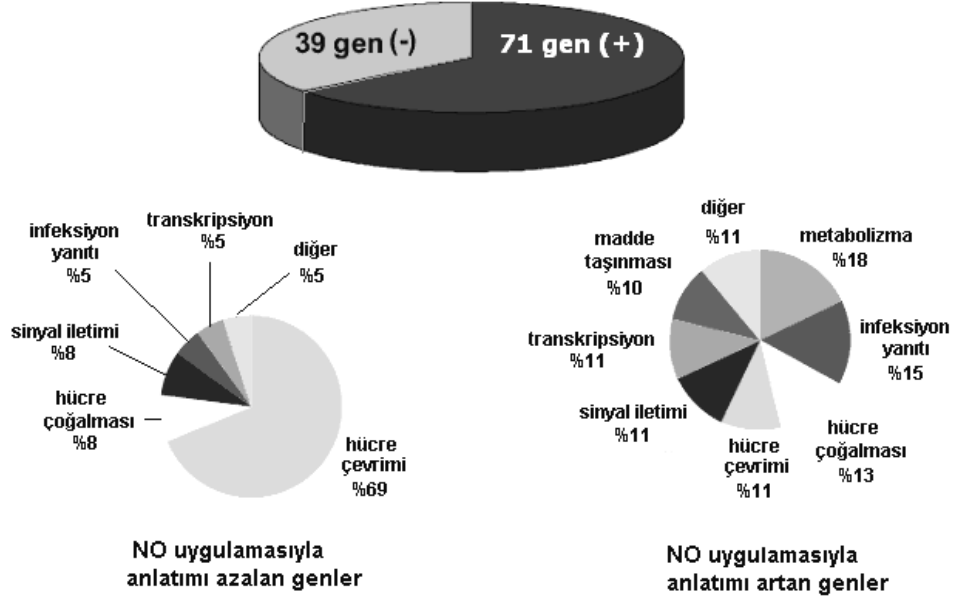
Hemish ve diğ., (2003) NO'nun cGMP'den bağımsız olarak fosfoinositid (PI) 3-kinaz (PI 3-K) ve protein kinaz C (PKC) sinyal yollarını aktiveleştirebildiğini ortaya koymuşlardır. PI 3-K'lar, fosfatidilinositol molekülünü fosforilleyen enzimlerdir. PI 3-K aktivitesinin hemen tüm ökaryotik hücrelerde bulunduğı ve farklılaşma, stres yanıtı gibi çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde etkili olabildiğı gösterilmiştir (Foster ve diğ., 2003). Mayalardan memeli hücrelerine kadar çeşitli türlerde korunmuş olan PKC ailesi proteinleri de memelilerde apoptoz, farklılaşma ve gelişim gibi çeşitli fizyolojik olaylardaki sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Redig ve Platanias, 2007).

2.2.3. NO'nun Gen Anlatımı Üzerinde Doğrudan Etkisi

NO, gen anlatımındaki düzenleyici etkisini NO/cGMP'ye bağımlı olan (Pilz ve Casteel, 2003) veya olmayan (Pfeilschifter ve diğ., 2001) sinyal yolları aracılığıyla gösterebildiğı gibi transkripsiyonda rol oynayan bazı moleküllerle doğrudan etkileşerek de yapabilmektedir. NO'nun, geçiş metalleriyle çok kolay reaksiyona girebilmesi nedeniyle, bazı transkripsiyon faktörlerinin yapısında bulunan çinko-parmak domenleriyle ve mRNA'ya bağlanan düzenleyici proteinlerle etkileşebildiğı bilinmektedir (Bogdan, 2001). Örneğin, Hemish ve diğ., 2003 NO'nun NF- κ B ve p53 gibi bazı transkripsiyon faktörlerini etkileyebildiğini göstermişlerdir. NO'nun etkisiyle meydana gelen ve proteinlerin işlevlerini (aktifleştirme ya da engelleme yönünde) değiştirebilen bu etkileşimlerin memeli hücrelerinde gen anlatımını doğrudan etkileyebildiğı ortaya koyulmuştur (Bogdan 2001, Pfeilschifter ve diğ., 2001). Bu açıdan son yıllarda yapılan çalışmalarla NO'nun gen anlatımının düzenlenmesindeki rolü de önem kazanmaktadır (Zhou ve Brüne, 2005).

Cui ve diğ. (2005) insan monosit hücre kültüründe DNA çip teknolojisi kullanarak gerçekleştirdikleri geniş ölçekli transkriptom analizi sonucunda, NO'nun çoğunluğu hücre çevriminin programlanmasıyla ilişkili çok sayıda genin anlatımı üzerinde etkili olduğunu (**Şekil 2.6.**) ve bu etkinin meydana gelmesinde NO/cGMP yolunun gerekli olmayabileceğini belirlemişlerdir. Ayrıca, bu çalışmada NO'nun gen anlatımının düzenlenmesi sürecindeki etkisinin genellikle stres yanıtıyla ilişkili protein kinazlar ve

mRNA'ya bağlanan proteinlerde meydana getirilen yapısal değişimlerle sağlandığı da vurgulanmaktadır.



Şekil 2.6. İnsan monosit hücre kültüründe NO'nun gen anlatımı üzerindeki etkileri (Cui ve diğ., 2005)

Rabkin ve Klassen (2007) fare kas hücresi kültüründe yaptıkları transkriptom analizinde programlı hücre ölümünde rol oynayan çok sayıda genin anlatımının NO düzeyindeki değişimlerle düzenlenebildiğini göstermişlerdir. Peng ve diğ. (2008) DNA çip teknolojisi kullanarak insan sinir hücresi kültüründe yaptıkları araştırmada NO aracılığıyla meydana gelen programlı hücre ölümünde ubiquitin proteazom sistemiyle ilişkili genlerin anlatımının etkilendiğini saptamışlar ve bu nedenle NO ile tetiklenen nöronal hücre ölümünde proteazomal aktivitenin önemli olduğuna dikkat çekmişlerdir. NO'nun gen anlatımı üzerindeki etkisine ilişkin diğer bir yeni çalışmada da, Kunieda ve diğ. (2008) NOS aktivitesinin engellendiği hayvansal sistemlerde biyolojik saatin ve kan basıncı ritminin kontrolünde rol oynayan genlerin anlatımının baskılandığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca, sinir hücrelerindeki işlevleriyle ilişkili olarak NO'nun, cGMP'ye bağımlı sinyal iletimi ve S-nitrozillenme yollarıyla

nöronlarda farklılaşma, bellek oluşumu ve hücre canlılığının korunması gibi süreçlerde rol oynayan genlerin anlatımı üzerinde etkili olabildiğine dikkat çekilmektedir (Contestabile A., 2008).

Bitkilerde de hücre içi NO düzeyindeki değişimlerin gen anlatımının düzenlenmesindeki rolüne ilişkin bazı çalışmalar bulunmaktadır (Grun ve diğ., 2006). Polverari ve diğ. (2003)'nin *Arabidopsis thaliana*'da gerçekleştirdikleri büyük ölçekli transkripsiyon analizi sonucunda, NO'nun sinyal iletimi, bitki hastalıklarına direnç, hücresel stres yanıtı, fotosentez ve hücrede madde taşınması gibi süreçlerde rol oynayan çeşitli genlerin yanı sıra henüz işlevi bilinmeyen bazı proteinleri şifreleyen genlerin anlatımlarını etkilediği ortaya çıkartılmıştır. Parani ve diğ. (2004), bu bitkide DNA çip teknolojisiyle tüm genom düzeyinde gerçekleştirdikleri anlatım analizinde, aralarında mitojenlerle aktifleşen protein kinazların (MAPK) da bulunduğu çok sayıda protein kinazın NO'ya duyarlı olduğunu göstermişlerdir. Palmieri ve diğ. (2008) de *A. thaliana*'da DNA çipleri kullanımıyla gerçekleştirdikleri diğer bir çalışmada, NO'ya aynı anda yanıt verdikleri bilinen duyarlı genlerin promotörlerinde ortak transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinin varlığını araştırmışlar ve bu faktörlerin bağlanmasıyla ilişkili sekiz farklı ortak dizi ailesinin varlığını ortaya koymuşlardır.

2.3. HÜCRE İÇİ NO DÜZEYİ DENGESİ

Memelilerde normal fizyolojik koşullarda hücre içi konsantrasyonunun 1 μM 'dan daha az olabileceği belirtilen (Krumenacker ve Murad, 2006) NO düzeylerindeki anormal azalma veya artışlar bazı metabolik olayları etkileyerek çeşitli hastalıklara yol açabilmektedir (Wimalawansa, 2008). Hücre içi NO konsantrasyonunun kontrolsüz bir şekilde artması durumunda reaktif azot ve oksijen türlerinin oluşumu hızlanarak hücrelerde önemli hasarlar meydana gelmektedir. Örnek olarak, fazla miktarda NO oluşumu nedeniyle peroksinitrit molekülünün hücre içi konsantrasyonu arttığında nitrosatif strese bağlı lipid peroksidasyonu (Sun ve diğ., 2006) ve DNA zincir kırıkları (Blaise ve diğ., 2005) gibi geri dönüşümsüz hasarlara yol açan değişimler hücreler için öldürücü etkili olabilmektedir. Bu tip değişimlerin memelilerde mitokondrilerde işlev kaybı, apoptoz, doku ölümleri, kalp/dolaşım bozuklukları ve çeşitli nörodejenaratif hastalıklara (Sun ve diğ., 2006) yol açtığı gösterilmiştir. Benzer şekilde NOS

aktivitesindeki kusur ve/veya aşırı derecede NO yıkımı gibi durumlara bağlı olarak hücrelerdeki NO düzeylerinin normalden düşük düzeylerde olması sonucunda ise hipertansiyon, iskemi ve erken doğum gibi fizyolojik bozukluklar görülebilmektedir (Wimalawansa, 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla NO'nun tümör oluşumu ve apoptoz (programlı hücre ölümü) süreçlerinde de rol oynadığı gösterilmiştir. Ancak bu konularla ilişkili olarak yapılan deneylerden elde edilen çelişkili sonuçlar, NO'nun bu süreçlerde karmaşık işlevlere sahip olabileceğine işaret etmektedir (Mocellin ve diğ., 2007). Bazı dokularda tümör oluşumunu teşvik ederken diğer bazılarında yavaşlattığı belirtilmektedir. Ayrıca, tümör oluşumu ile ilişkili bu çift yönlü etkinin hücre içi NO konsantrasyonuna bağlı olduğu da vurgulanmaktadır (Coulter ve diğ., 2008). Örneğin tümörlü dokulardaki NO düzeylerinin normal koşullarda olması gerekenden daha yüksek olduğu ve bu tip dokulara ait hücrelerdeki NOS aktivitesinin engellenmesiyle NO düzeyleri düşürüldüğünde tümör gelişiminin yavaşladığı gösterilmiştir. Bununla birlikte tümörlü dokularda, NO konsantrasyonunun çok yüksek düzeylere ulaşmasının sağlandığı durumlarda ise nitrosatif stres etkisinde kalan hücrelerde programlı ölümlerin başladığı bilinmektedir (Coulter ve diğ., 2008). Benzer şekilde, apoptozla ilişkili olarak yapılan hücre kültürü deneylerinde, hücrelerde sentezlenen NO'nun apoptozu engellediği buna karşılık, nitrosatif stresin apoptozu teşvik ettiği gösterilmiştir. NO'nun apoptoz üzerindeki engelleyici veya teşvik edici etkisinin hücre içi NO düzeyleri, hücrelerin glikolitik kapasitesi ve kullanılan hücre modeli ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Leon ve diğ., 2008).

Hücre içi NO düzeylerindeki değişimlerin yol açtığı önemli fizyolojik etkiler göz önüne alındığında hücre içi NO konsantrasyonunun hassas bir şekilde kontrol edilerek hücre ve dolayısıyla organizma için uygun düzeylerde tutulmasının çok önemli olduğu görülmektedir. Bu dengenin sağlanamadığı durumlarda, NO düzeyinin kontrol edilmesi amacıyla, hücrede NO oluşumunun artmasını sağlayan NO vericileri (donörleri) veya NO sentezinin azalmasına neden olan NOS engelleyicileri (inhibitörleri) kullanılabilmektedir (Low, 2005).

2.3.1. NO Vericileri

NO vericileri, NOS aktivitesinden bağımsız olarak NO üretebilme yeteneğine sahip bileşiklerdir. Farklı etki mekanizmalarına sahip olabilen çeşitli vericiler arasında en iyi bilinenleri organik nitratlardan nitroglicerine, demir-nitrozil komplekslerinden sodyum nitropurissid (SNP) ve S-nitrozotiyollerden S-nitrozo-N-asetil-D,L-penisilamindir (Alsa'doni ve Ferro, 2000).

Bu vericiler arasında sıklıkla tercih edilen SNP, beş adet siyanid (CN^-) anyonuna sahip demir iyonu ve bir nitrozonyum iyonundan (NO^+) oluşan bir bileşiktir (Yamamoto ve Bing, 2000). SNP sulu çözücülerde çözündüğünde, enzimatik indirgenme veya hidroliz olma koşulu gerektirmeden ortama kendiliğinden NO verebilen doğrudan etkili vericilerindendir (Low, 2005). Çoğunlukla deneysel amaçlı çalışmalarda kullanılsa da yüksek tansiyon ve kalp yetmezliği gibi acil klinik durumlarda da uygulanabilen SNP'nin yapısında bulunan tiyosiyanat nedeniyle zararlı yan etkilerinin de olabileceği belirtilmektedir (Low, 2005).

2.3.2. NOS Engelleyicileri

Hücre içi NO konsantrasyonunun düşürülmesinde, NOS aktivitesini engelleyici moleküllerin kullanılması doğrudan ve etkin bir yaklaşımdır. NOS aktivitesi, NO sentezindeki substrat (arjinin) analoglarının kullanılması, NOS alt birimlerinin dimer oluşturmasının veya (BH_4 , CaM gibi) kofaktörlerin NOS'a bağlanmasının engellenmesi gibi çeşitli şekillerde mümkün olabilmektedir (Low, 2005).

Deneysel çalışmalarda NOS aktivitesinin engellenmesinde en çok tercih edilen yaklaşımlardan biri arjinin analoglarının kullanımıdır. L-arjinin molekülünde gerçekleştirilen yapısal değişimlerle elde edilen analoglar arasında sıklıkla kullanılan N^G -nitro-L-arjinin metil ester (L-NAME), substratla yarışması nedeniyle, üç NOS izoformunun aktivitesini de engelleyebilmektedir. NOS engelleyicilerinin deneysel araştırmaların yanı sıra septik şok ve migren tedavisinde kullanılabildiği belirtilmektedir (Low, 2005).

2.3.3. NO/cGMP Yolundaki Etkileyiciler

Hücre içi NO düzeyindeki değişimlere bağlı etkilerin düzenlenmesi amacıyla genelde tercih edilen NOS engelleyicileri veya NO vericilerinin kullanımı gibi doğrudan yaklaşımların yanı sıra NO sinyal yollarında etkili bazı maddeler aracılığıyla NO'nun etkisi dolaylı olarak da kontrol edilebilmektedir. Bu amaçla NO/cGMP sinyal yoluyla (Şekil 2.5.) ilişkili olarak, guanilat siklaz ve/veya fosfodiesterazları hedef alan bazı moleküller araştırmalar ve klinik uygulamalarda kullanılabilmektedir. Örneğin 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Garthwaite ve diğ., 1995) ve metilen mavisi (Martin ve diğ., 1985) gibi cGMP oluşumunu engelleyen bazı maddeler, hücrede NO'ya bağlı oluşan sinyalin hedef moleküllere iletilmesini engelleyerek NO/cGMP sinyal yolunu durdurabilmektedir. Buna karşılık, örneğin Viagra®'nın da hammaddesi olan sildenafil, bir fosfodiesteraz engelleyicisi olarak cGMP'nin yıkım sürecini geciktirmekte ve buna göre NO/cGMP sinyal etkisi süresinin uzatılmasını sağlamaktadır (Boolell ve diğ., 1996).

2.4. MODEL ORGANİZMA OLARAK MAYALAR

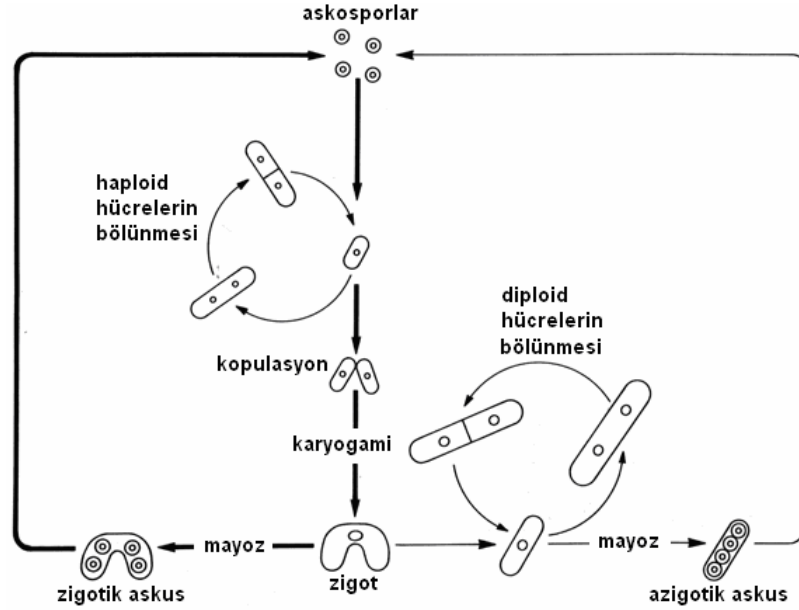
Gelişmiş yapılı canlılardaki moleküler olayların açıklanmasında genellikle daha basit yapılı organizmalar model sistemler olarak değerlendirilmektedir. Bunların arasında mayalar en çok tercih edilen tek hücreli ökaryotik modellerdir. Mayalardan en sık *Saccharomyces cerevisiae* kullanılmakla birlikte genetik, biyokimyasal ve moleküler düzeydeki çeşitli özellikleri açısından memeli hücrelerine benzerlik göstermesi bakımından son yıllarda *Schizosaccharomyces pombe* de çok uygun bir model organizma olarak önem kazanmıştır.

2.4.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Mantarların *Ascomycota* sınıfında bulunan *Schizosaccharomyces pombe* vejetatif evrede haploid olup, memeli hücrelerindeki gibi, ana hücrenin ortasında bir septum oluşumuyla iki eşit parçaya ayrılarak çoğalmaktadır (Nasim ve diğ., 1989). Bu nedenle “ortadan ikiye bölünen maya” (“fission yeast”) olarak da bilinmektedir. İlk kez Lindner (1893)'in bir Doğu Afrika birasında varlığını saptadığı bu maya türünün yabani ırkı (Osterwalder,

1924) tarafından Güney Fransa'daki üzüm sularından izole edilmiş ve genetik çalışmalarda ilk kez Leupold (1950) tarafından kullanılmıştır.

S. pombe'nin jenerasyon süresi, laboratuvar koşullarında, 30°C'da, kullanılan besi ortamının içeriğine ve hücrelerin genetik yapısına da bağlı olarak 2-4 saat arasında değişebilmektedir. Mitozla vejetatif olarak çoğalan *S. pombe* hücrelerinin kendi aralarında eşleşebilen homotallik (h^{90}) ve karşı eşey tiplerinin eşleşme gösterdiği heterotallik (h^+ ve h^-) ırkları vardır (Gutz ve Doe, 1975). Besin açlığının eşleşmeyi teşvik ettiği koşullarda, karşı eşey tipindeki iki hücrenin kaynaşmasıyla oluşan diploid zigot mayoz bölünme geçirdikten sonra bir askus içinde bulunan 4 adet haploid askospor meydana gelir; askus çeperinin parçalanmasıyla serbest kalan sporlar uygun koşullarda bölünerek haploid klonları meydana getirir (Gutz. ve diğ., 1974) (Şekil 2.7.).



Şekil 2.7. *S. pombe* hücrelerinde haploid ve diploid yaşam çevrimleri (Gutz. ve diğ., 1974)

S. pombe'nin, yaşam çevriminde baskın olarak haploid olması genlerdeki mutasyonların etkilerinin fenotipte kolaylıkla izlenmesine olanak vermektedir. Çok sayıda mutant koleksiyonunun bulunmasının yanı sıra, bazı koşullarda diploid duruma da geçebilmeleri (Gutz. ve diğ., 1974), özellikle alleller arasındaki etkileşimlerin izlenmesi açısından avantajlar sağlamaktadır. Üç kromozoma sahip olan bu maya türünün genom

boyutunun küçük olması da, genlerin yapısal ve işlevsel analizlerine yönelik çalışmalar bakımından diğer bir tercih edilme nedenini oluşturmaktadır (Zhao ve Lieberman, 1995).

13,8 Mb boyutundaki genomunun dizilenmesi tamamlanan *S. pombe*'de 4,824 adet protein şifreleyen gen bulunmaktadır (Wood ve diğ., 2002). Bu organizmada, RNA kırılması, proteinlerin fosforillenmesi, hücre çevriminin kontrolü ve hücre iskeletinin oluşumu gibi gelişmiş yapıli ökaryotlarda önemli işleve sahip bazı genlerin korunduğı ortaya çıkartılmıştır (Yanagida, 2002). Paul Nurse, model sistem olarak *S. pombe*'yi kullanarak yaptığı çalışmalarla, hücre çevriminin düzenlenmesine ilişkin kontrol mekanizmalarının aydınlatılması yönündeki katkılarından dolayı Tıp ve Fizyoloji alanındaki 2001 yılı Nobel ödölünü kazanmıştır (<http://nobelprize.org/nobelprizes/medicine>).

Bunlara ek olarak, genlerinin % 43'ünün intron içerdığı ve genlerin yukarı kısımlarında uzun kontrol dizilerinin bulunduğı belirlenmiştir (Yanagida, 2002). Ayrıca *S. pombe* genomunda, yaklaşık yarısı kanserleşmeyle ilişkili olmak üzere insanlarda bazı hastalıkların oluşmasında rol oynayan genlere yüksek derecede dizi benzerliği gösteren genlerin varlığı da saptanmıştır (Wood ve diğ., 2002). Ek olarak, kromozom yapısı memelilerdekine benzerlik gösteren bu mayada telomer boylarının düzenlenmesine ilişkin sürecin de benzer şekilde meydana geldiğı belirtilmektedir (Pitt ve diğ., 2008)

S. pombe ve *S. cerevisiae*'nin, taksonomik olarak aynı sınıfta (Ascomycota) yer almalarına karşılık, evrimsel açıdan birbirlerine çok yakın olmadıkları belirlenmiştir. Örneğin, *S. pombe*'de memeli mRNA'larındaki intronların doğru biçimde kesilebildiğı, memeli genlerine ait promotörlerin ve poli(A) sinyallerinin tanınabildiğı buna karşılık, *S. cerevisiae*'de bu olayların tam işlevsel olmadığı anlaşılmıştır (Zhao ve Lieberman, 1995). Bu iki maya türüne ilişkin transkriptom ve proteom düzeyindeki karşılaştırmalar sonucunda da gen anlatımları bakımından önemli derecede farklılıklar gösterebilecekleri ve moleküler düzeydeki bazı özellikleri bakımından *S. pombe*'nin memeliler için daha uygun bir model olabileceğı ortaya koyulmuştur (Schmidt ve diğ., 2007).

Bu bağlamda, *S. pombe* İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki bir çalışma grubu tarafından da yaklaşık 30 yıldır moleküler genetik ve biyoteknoloji alanlarındaki çeşitli konuların araştırılmasından yoğun biçimde kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar genel olarak purin nukleotidleri biyosentezinin genetik düzenlenmesi (Oraler, 1984, Oraler ve diğ., 1990, Karaer ve diğ., 2006), heterolog gen anlatımı (Arda ve diğ., 2000, Günel ve diğ., 2006, Palabıyık ve diğ., 2006, 2008), glukoz baskılaması (Kıg ve diğ., 2005), ağır metal metabolizması (Topal Sarıkaya ve diğ., 2001, 2006, Tarhan ve diğ., 2007), oksidatif stres yanıtı (Pekmez ve diğ., 2008) gibi konuları kapsamaktadır.

2.4.2 Maya ve Bazı Mantar Türlerinde NO'ya Bağlı Etkiler

S. cerevisiae'de NOS'unlike benzer bir aktivitenin varlığı ilk kez Kanadia ve diğ. (1998) tarafından gösterilmiş ve hücre özütlerinde saptanan bu aktivitenin L-NAME uygulamasıyla önemli ölçüde engellendiği belirlenmiştir. Shinyashiki ve diğ. (2000), *S. cerevisiae* hücrelerinde bakır metabolizmasıyla ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan Ace1'in metalleri bağlayan tiyol gruplarında NO tarafından kimyasal değişimlerin meydana getirilebildiği ve bu nedenle NO'nun hücrelerdeki metal dengesinin sağlanmasında önemli roller üstlenebileceğini saptamışlardır. Domitrovic ve diğ. (2003)'nin aynı mayada yaptıkları çalışmada ısı şoku ve hidrostatik basınç gibi bazı çevresel stres koşullarına karşı verilen hücresel yanıtta hücrelerin hayatta kalabilmesi için NO'nun sinyal molekülü olarak rol oynayabileceğine dikkat çekilmiştir. *S. cerevisiae*'de DNA çip teknolojisi kullanarak gerçekleştirilen bir araştırmada ise, NO stresi uygulanan hücrelerde anlatımları etkilendiği saptanan 700'den fazla genden 117'sinin nitrosatif strese çok duyarlı olduğu anlaşılmıştır. Bu genlerden DNA onarımı ve hücre içi madde taşınmasıyla ilgili olanların NO etkisiyle anlatımının artarken özellikle hücre solunumu ile ilgili süreçlerde rol oynayan proteinleri şifreleyenlerin anlatımlarının baskılandığı ortaya konulmuştur (Horan ve diğ., 2006). Bunlara ek olarak *S. cerevisiae*'de H₂O₂ ile apoptozun teşvik edildiği hücrelerde NOS benzeri enzim aktivitesine bağlı olarak üretilen NO'nun hücrelerde apoptoz sinyali oluşumu için gerekli olduğu da gösterilmiştir (Osório ve diğ., 2007) (Almeida ve diğ., 2007).

S. pombe'de ise NOS aktivitesinin varlığı şimdiye kadar ortaya konulmamıştır. Bu maya türünde genelde NO'nun stres etkeni olarak ele alındığı bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Kim H. G. ve diğ. (2004) *S. pombe*'de glutatyon S-transferaz II, Kim S. J ve diğ. (2004) de glutatyon sentezi reaksiyonunun ilk aşamasını kataliz eden gamma-glutamilsistein sentetaz enzimlerini şifreleyen genlerin anlatımlarının SNP ile oluşturulan nitrozatif stres koşullarında artış gösterdiğini belirlemişlerdir.

S. pombe'de apoptoz, mitoz süreçleriyle ilişkili olduğu ortaya koyulan Pbh1 proteinini şifreleyen genin (Rajagopalan ve Balasubramanian, 1999) anlatımının NO'nun yüksek konsantrasyonlarıyla yaratılan nitrosatif stres ve azot açlığı ile düzenlenebildiği ortaya koyulmuştur (Sahoo ve diğ., 2006). Aynı şekilde, Kang ve diğ. (2007) DNA onarımı ve apoptoz süreçlerinde rol oynadığı bilinen *rad9* geninin anlatımının da aynı stres faktörleri etkisinde düzenlenebildiğini göstermişlerdir. Bunlara ek olarak, hücrel stres yanıtının oluşması ile ilgili bir transkripsiyon faktörünü şifreleyen *pap1* geninin (Toone ve diğ., 1998) anlatımının SNP ile oluşturulan nitrozatif stresle düzenlenebildiği saptanmıştır (Kim ve diğ., 2008). Ancak, bu maya türünde NO'nun hücrelerde normal fizyolojik koşullarda memelilerdekine benzer şekilde sinyal iletimi ile ilgili rolü olup olamayacağı hakkında bilgi bulunmamaktadır.

Maya grubu organizmaların dışında, *Physarum polycephalum* (Werner-Felmayer ve diğ., 1994, Golderer ve diğ., 2001), *Neurospora crassa* (Ninnemann ve Maier, 1996), *Candida albicans* (Abaitua ve diğ., 1999), *Phycomyces blakesleeianus* (Maier ve Hecker, 2001) ve *Colletotrichum coccodes* (Wang ve Higgins, 2005) gibi bazı mantar türleri ile yapılan çalışmalarda NO'nun spor oluşumu ve vejetatif gelişim süreçlerinde sinyal molekülü olarak etkili olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir.

Golderer ve diğ. (2001) *Physarum polycephalum*'dan NOS'unkine benzer aktivite gösteren bir enzimi izole edip saflaştırmışlardır. Bu enzimin hayvanlardaki NOS izoformlarına en fazla %39 benzerlik gösterdiği ancak NOS kofaktörlerinin bağlanması için gerekli olan memelilerdeki motiflerin korunduğu ortaya koyulmuştur.

2.5. GEN ANLATIMI ANALİZLERİ

Son yıllarda oldukça çok sayıda organizmaya ait genom projelerinin tamamlanmasıyla da bağlantılı olarak giderek önemi artan gen anlatımı analizleri, hücre moleküler biyolojisinin yanı sıra tıp ve biyoteknoloji gibi uygulamalı alanların gelişiminde büyük katkılar yapmaktadır. Özellikle belli koşullarda anlatımları değişen genlerin saptanmasıyla, sinyal yolları gibi önemli biyolojik süreçlerdeki kilit genlerin saptanmasına ve işlevleri henüz bilinmeyen yeni genlerin ortaya çıkartılmasına imkan sağlamaktadır. Ayrıca hastalıklı ve normal dokulardaki aktif genlerin karşılaştırılarak hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımların ortaya koyulması gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Ek olarak biyoteknolojik yöntemlerle geliştirilen yeni ilaçların hedef moleküller üzerindeki etkilerinin incelenmesine de olanak sağlamaktadır.

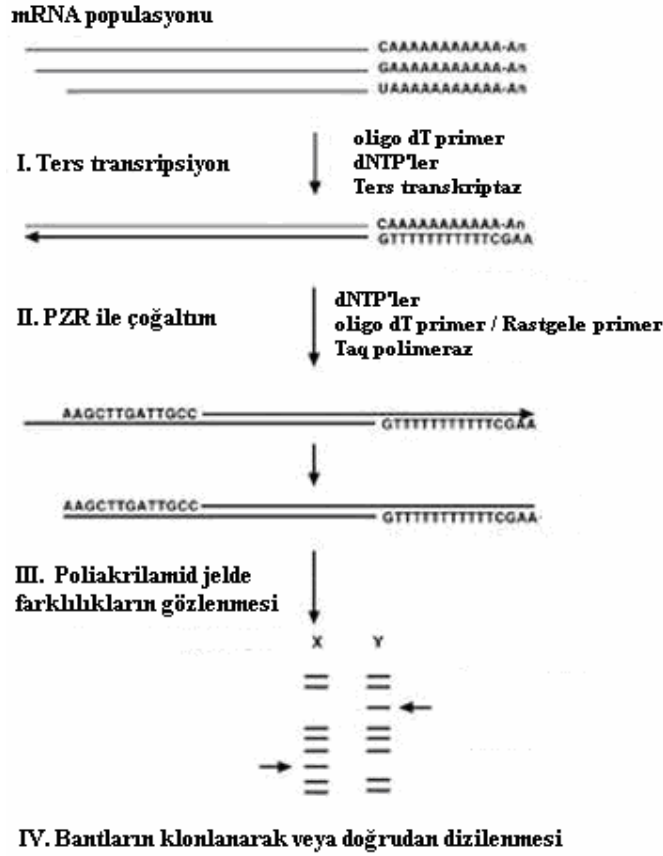
Gen anlatımı sürecine ilişkin en belirleyici analiz yöntemlerinin başında transkripsiyon düzeyindeki analizler yer almaktadır. Transkripsiyon düzeyindeki değişimlerin araştırılması amacıyla geliştirilen yöntemlerden belli bir anda tüm genlerin anlatımlarının incelenmesine olanak veren DNA çip (mikrodizilim) teknolojisi günümüzde en çok ilgi uyandıranlardan tekniklerdendir (Stein ve Liang, 2002). Ancak, oldukça pahalı olan bu teknolojiye alternatif olarak farklı analiz yöntemleri de (**Tablo 2.1.**) güncel olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında, özellikle yeni genlerin tanımlanmasına ve aynı anda ikiden fazla sayıda koşulun etkisinin karşılaştırılmasına olanak vermesi nedeniyle araştırmacılar tarafından en çok tercih edilenlerden biri, temeli mRNA'lardaki farklılıkların ters transkriptaz uygulamasını izleyen polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gösterimi ("mRNA differential display reverse transcriptase polymerase chain reaction", DD RT-PCR) olan, kısa adıyla farklılık gösterimi ("differential display", DD) tekniğidir.

Liang ve Pardee, (1992) tarafından geliştirilmiş olan DD tekniğinin temeli özetle,

- Gen anlatımlarındaki farklılığın gösterilmesi amaçlanan örneklerden izole edilen total RNA molekülleri kalıp olarak kullanılarak tek ya da daha fazla sayıda baz değişkenli oligo-dT primerleriyle ters transkripsiyon reaksiyonu yapılması

- Oligo-dT primerler ile rastgele (“arbitrary”) primer kombinasyonları oluşturularak, cDNA’ların kalıp olarak kullanıldığı PZR ile mRNA’lara ilişkin cDNA kopyalarının sayısının artırılması
- Farklı reaksiyon ürünlerinin (cDNA’ların) poliakrilamid jel elektroforeziyle ayrılması
- Poliakrilamid jellerde karşılaştırılan örneklerde farklılık gözlenen bantlardaki DNA’ların jelden geri alındıktan sonra klonlanarak veya doğrudan dizilenerek farklılığın gözlemlendiği cDNA moleküllerine ilişkin dizi bilgisinin elde edilmesi (Alternatif olarak dizileme işlemine geçilmeden önce farklılığın doğrulanması amacıyla jelden geri kazanılan bantlardaki cDNA molekülleri prob olarak kullanılarak “dot” melezleme gibi bir teknikle ön kontrol da yapılabilir.)
- Anlatımlarında değişiklik olduğu saptanan genlerin anlatım profillerindeki farklılığın Northern melezleme veya nicel (kantitatif) PZR gibi yöntemlerle doğrulanması

aşamalarından oluşmaktadır (**Şekil 2. 8.**).



Şekil 2.8. Farklılık gösterimi tekniğinin temel aşamaları.

Tekniğin orijinalinde, poliakrilamid jellerdeki farklılıkların gözlenmesi amacıyla radyoaktif işaretli cDNA'lar kullanılmakla birlikte, işaretleme göreceli olarak daha az duyarlı etidyum bromür veya gümüş nitratla boyama ile de yapılabilmektedir. Ayrıca, daha sonraki yıllarda geliştirilen cDNA'ların floresan boya ile işaretlenmesi tekniği (Ito ve Sakaki, 1997), farklılıkların oldukça duyarlı biçimde saptanmasına olanak vermesinin yanı sıra radyoaktif işaretlemeye güvenli bir alternatif oluşturmaktadır.

DD tekniği, aynı amaçla kullanılan diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında öne çıkan bazı üstünlükleri ve olumsuz yönleri **Tablo 2.1.**'de verilmiştir (Stein ve Liang, 2002).

Tablo 2.1. Farklılık gösterimi tekniğinin diğer tekniklerle karşılaştırılması (Stein ve Liang, 2002). DD (“Differential Display”, farklılık gösterimi), SH (“Subtractive Hybridization”, dışlayıcı melezleme), RDA (“Representational Difference Analysis”, temsili fark analizi), SSH (“Suppression Subtractive Hybridization”, dışlayıcı melezlemenin baskılanması), SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”, gen anlatımının seri analizi).

Teknik	Karşılaştırılabilen örnek sayısı	Saptanabilen değişim	Saptanabilen fark düzeyi	Yanlış pozitif oranı	Yeni gen bulma olasılığı	Gerekli RNA miktarı	Maliyet
DD	Çok sayıda	Artma-azalma	≥ 1.1 kat	Yüksek	Evet	$\leq 5 \mu\text{g}$ total RNA / 240 reaksiyon	Düşük-orta
SH	İki	Tek yönlü	>10 kat	Düşük	Evet	$1-5 \mu\text{g}$ poli-A RNA / reaksiyon	Düşük
RDA	İki	Tek yönlü	>15 kat	Düşük	Evet	$1-5 \mu\text{g}$ poli-A RNA / reaksiyon	Düşük
SSH	İki	Tek yönlü	>10 kat	Düşük	Evet	$1-5 \mu\text{g}$ poli-A RNA / reaksiyon	Düşük
SAGE	Çok sayıda	Artma-azalma	Tüm farklılıklar	Yok	Hayır	$\leq 5 \mu\text{g}$ total RNA / örnek	Düşük-orta
DNA mikro dizilimi	İki (normalizasyonla ikiden fazla olabilir)	Artma-azalma	>2 kat	Yok	Genelde hayır	$10 \mu\text{g}$ poli-A RNA / çip	Yüksek

Tablo 2.1.'de görüldüğü gibi, DD tekniğinin diğerlerine göre üstün olan özellikleri arasında duyarlılığının yüksek olması, daha az miktarda RNA'nın yeterli olması, hem artma hem de azalma şeklindeki değişimlerin aynı anda araştırılmasına olanak vermesi sayılabilir. Buna karşılık, yanlış pozitif olarak saptanan anlatım değişikliklerinin görülme oranının yüksek olması ise bu yöntemin en olumsuz özellikleri olarak belirtilmektedir. Çip teknolojisi ile karşılaştırıldığında ise DD tekniğinin maliyetinin daha düşük olması, işlevi bilinmeyen yeni genlerin ortaya çıkartılma olasılığının yüksek olması ve çok sayıda örnek çalışabilme olanağı sağlaması gibi özellikleri bakımından daha üstün olduğu belirtilmektedir; ancak yanlış pozitiflerin yüksek oranda görülebilmesi çiplere göre en olumsuz yönünü oluşturmaktadır.

2.5.1. Dizi Benzerliği Karşılaştırmaları

DD tekniğinin uygulanması sonucunda poliakrilamid jellerde farklılık gösterdiği saptanan bantlardaki DNA molekülleri jellerden geri kazanılıp nükleotid dizileri saptandıktan sonra, belirlenen cDNA dizilerinin ilgili organizmanın hangi genlerine ait olabileceğinin araştırılması amacıyla genom veri tabanlarında dizi benzerliği karşılaştırmaları yapılabilmektedir.

Çok sayıda organizmaya ait genom bilgilerinin artması sonucunda gen ve protein veri bankalarında biriken büyük ölçekli verilerin işlenmesine ve analizine olanak veren biyoinformatik uygulamaları kapsamında sıklıkla kullanılan araçlardan biri, Altschul ve diğ. (1990) tarafından geliştirilen, nükleotid ve/veya amino asit dizisi karşılaştırmalarının hızlı ve kolay yapılmasına olanak sağlayan BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) yazılımıdır.

Ancak, DD tekniğinde yanlış pozitif olarak gözlenen anlatım farkları yüksek oranda ortaya çıkabildiğinden, BLAST analizleri sonucunda saptanan hedef genlerin anlatımlarındaki değişimlerin ek deneysel çalışmalarla test edilerek doğrulanması gerekmektedir (Stein ve Liang, 2002).

2.5.2. Gen Anlatımı Profillerinde Saptanan Değişimlerin Doğrulanması

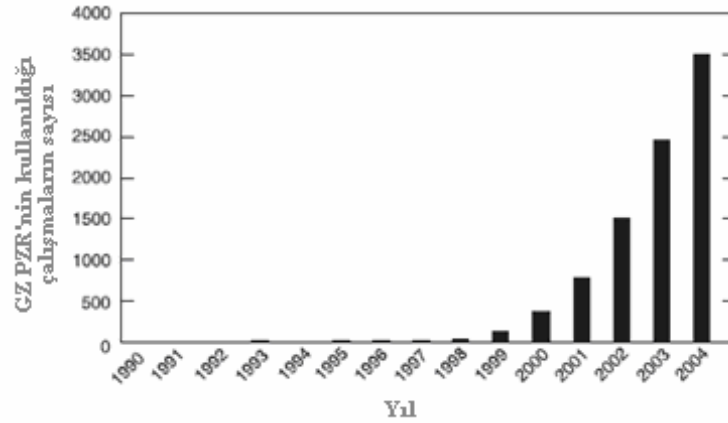
DD tekniğinin uygulandığı poliakrilamid jellerde saptanan değişimlerden giderek dizi analizleri sonucunda belirlenen gen(ler)in anlatım(lar)ındaki farklılıkların doğrulanması amacıyla kullanılan yöntemler arasında dot / Northern melezleme, nicel PZR, *in situ* melezleme ve RNaz korunması gibi çeşitli uygulamalar yer almaktadır (Stein ve Liang, 2002).

Bu yöntemlerden, nicel PZR kapsamındaki, gerçek zamanlı PZR (GZ PZR) (“real-time PCR”, RT-PCR) göreceli olarak daha güvenilir ve duyarlı olması nedeniyle genellikle diğer tekniklere tercih edilmektedir (Rajeevan ve diğ., 2001).

2.5.3. Gerçek Zamanlı PZR Tekniği

Gerçek zamanlı PZR (GZ PZR) tekniğinin temeli, Mullis ve Faloona (1987) tarafından geliştirilen PZR'ye dayanmaktadır. GZ PZR tekniği ile özgün bir DNA dizisinin başlangıçtaki konsantrasyonunun veya bir örnekteki farklı dizilerin konsantrasyonlarının birbirlerine göre oranlanması mümkün olmaktadır (Valasek ve Repa, 2005).

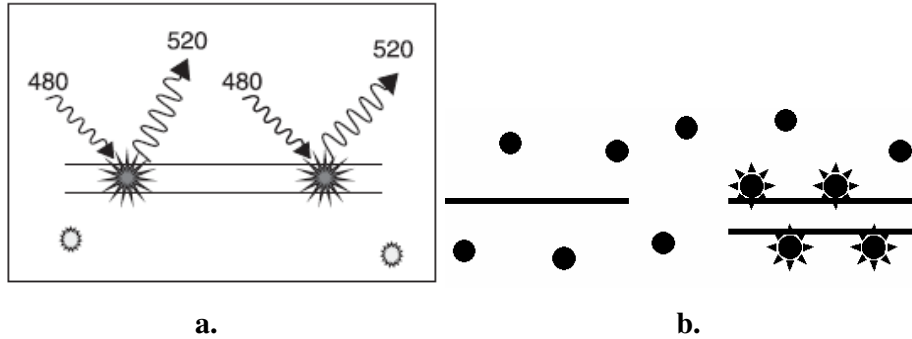
Higuchi ve diğ. (1992) UV ışık altında gerçekleştirdikleri reaksiyonda PZR karışımına etidyum bromür ekleyip, DNA'nın çoğalmasıyla birlikte artan fluoresan ışımayı bir kamerayla kaydederek ilk GZ PZR uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. İlk uygulamanın ardından hızla geliştirilen bu teknik hem bilimsel hem de ticari bakımdan çok önemli bir konuma gelmiştir. GZ PZR tekniği kullanımıyla gerçekleştirilen bilimsel çalışmaların sayısına ilişkin, 2004 yılına kadar olan süreyi kapsayan, grafik **Şekil 2.9.**'da görülmektedir (Valasek ve Repa, 2005). Şekilde görüldüğü gibi bu tekniğin kullanımı özellikle 2000'li yıllardan sonra hızlı bir artış göstermiştir.



Şekil 2.9. GZ PZR tekniğinin kullanımındaki artışı gösteren grafik (Valasek ve Repa, 2005).

Günümüzde GZ PZR uygulamalarında, DNA miktarındaki artışın saptanması aşamasında temel olarak, dizi özgünlüğü göstermeksizin sadece çift zincirli DNA'ya bağlanan boyaların kullanımı veya dizi özgünlüğü gösteren problardan yararlanılması şeklinde iki farklı yaklaşım bulunmaktadır.

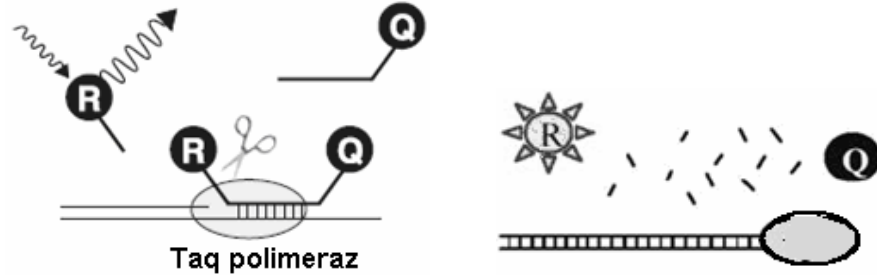
Çift zincirli DNA'ya bağlanan floresan özellikteki “SYBR green I”, GZ PZR'de en sık kullanılan boyalardandır. SYBR green özgün olarak ortamdaki çift zincirli DNA moleküllerindeki küçük oluk bölgesine bağlanmaktadır (Wittwer ve diğ., 1997). 480 nm dalga boyundaki ışığı absorplayıp 520 nm dalga boyunda ışık olarak yayan (**Şekil 2.10.a.**) SYBR green çift zincirli DNA'ya bağlandığında serbest haline oranla yaklaşık 1000 kat daha şiddetli ışımaya yayabilmektedir (**Şekil 2.10.b.**). Buna göre, kalıptaki hedef DNA konsantrasyonu ne kadar fazlaysa ardışık PZR çevrimleri sırasında o kadar çok ürün birikmekte ve ölçülebilir düzeyde floresan ışımaya da o kadar erken saptanmaktadır (Valasek ve Repa, 2005). Buna göre, çoğalmanın saptandığı çevrim sayıları arasındaki farklardan yararlanılarak örneğin, genlerin anlatım düzeyleri arasındaki farklar karşılaştırılabilmektedir.



SYBR green temeline dayalı GZ PZR yönteminde dizi özgünlüğü söz konusu olmadığından floresan şiddetindeki artışın hedef dizinin çoğalmasından kaynaklandığının doğrulanması gerekmektedir. Bu amaçla, reaksiyon sonunda PZR'de çoğaltılan ürünün erime eğrisinde, tek bir diziye ait tepe noktası (pik) elde edilmelidir.

Örneğin, kullanılan primer konsantrasyonunun fazla gelmesi veya uygun olmayan primerlerin tasarlanması gibi bazı durumlarda SYBR green, primer dimerlerine de bağlanarak fluoresan şiddetinde artışa neden olabilmektedir.

Dizi özgünlüğü gösteren problemlerin kullanıldığı GZ PZR’de tekniğin uygulanmasına ilişkin farklı yaklaşımlar bulunmakla (Wong ve Medrano, 2005) birlikte bunların hepsi hedef dizilere özgün oligonükleotidlerin kullanılması bakımından temelde benzerlik göstermektedir. Örneğin, çalışmalarda en çok tercih edilen problemlardan olan TaqMan hidroliz problemleri, iki farklı fluorofor (fluoresan özellikte) işaret taşıyan oligonükleotidlerdir. Fiziksel olarak yakın mesafede bulunduklarında, engelleyici olarak (“quencher”) kullanılan fluorofor, muhbir (“reporter”) olarak kullanılanın yaydığı ışığı absorplayarak fluoresans ışımının meydana gelmesini engellemektedir. Ancak DNA polimeraz 5’ eksonükleaz aktivitesiyle, PZR sırasında TaqMan probu hidroliz ettiğinde, engelleyici fluorofor muhbir olandan uzaklaşır ve ışığı yaymaya başlar (Şekil 2.11.). Buna göre PZR çevrimleri sırasında meydana gelen özgün DNA dizisindeki çoğalma ile fluoresans artışı arasındaki orantıdan hedef dizinin başlangıçtaki konsantrasyonu hakkında bilgi edinilebilmektedir (Valasek ve Repa, 2005).



Şekil 2.11. TaqMan hidroliz problemlerinin çalışma ilkesi (Valasek ve Repa, 2005)

Prob temelli GZ PZR uygulamaları duyarlılık açısından daha üstün olsa da özellikle genlerin göreceli anlatım düzeylerinin karşılaştırılmasının amaçlandığı çalışmalar için SYBR green temeline dayalı GZ PZR yöntemi güvenilir ve uygun bir seçenek olarak değerlendirilmektedir (Rajeevan ve diğ., 2001). SYBR green temeline dayalı GZ PZR'nin, maliyet açısından işaretli problara göre çok daha uygun olması da en önemli tercih nedenlerindendir (Ponchel ve diğ., 2003).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA

Çalışmada, mantarların Ascomycota sınıfına ait olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder *liquifaciens* maya türünün yabani ırkı (972 h⁻) kullanıldı. Buna ek olarak, çalışmanın bir bölümünde gerçekleştirilen çaprazlamalarda bu türün farklı eşey tipindeki yabani ırkı da (975h⁺) kullanıldı. Çalışma materyali İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki *S. pombe* kültür koleksiyonundan elde edildi.

3.2. BESİ ORTAMLARI

Organizmanın üretilmesi ve saklanması amacıyla maya özütü zengin besi ortamı (YEL veya YEA), prototrofluk kontrolleri ve özel bazı deney koşullarının sağlanabilmesi amacıyla minimal besi ortamı (MML veya MMA), çaprazlama denemelerinin gerçekleştirilmesinde ise malt özütü besi ortamı (MEA) kullanıldı. Çalışmada kullanılan besi ortamlarının içerikleri **Tablo 3.1.** ve **Tablo 3.2.**'de verildi.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan besi ortamları

Besi ortamı	İçerik
Maya özütü zengin sıvı besi ortamı (YEL)	Maya özütü 5 g/l Glukoz 30 g/l
Maya özütü zengin katı besi ortamı (YEA)	YEL besi ortamına Agar eklendi 20 g/l
Minimal sıvı besi ortamı (MML)	Stok A ₂ * 100 ml/l Stok 3a* 1 ml/l Stok 3b* 1 ml/l Glukoz 10 g/l Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 1 g/l
Minimal katı besi ortamı (MMA)	MML besi ortamına Agar eklendi 20 g/l
Malt özütü katı besi ortamı (MEA)	Malt özütü 30 g/l Agar 20 g/l

Tüm besi ortamları otoklavda 121°C'da (1 atmosfer basınçta) 20 dakika tutularak steril edildi.

(* İçerikleri Tablo 3.2.'de verildi)

Tablo 3.2. MML besi ortamının hazırlanmasında kullanılan stok çözeltiler

Stok	İçerik (mg/l)
A ₁	H ₃ BO ₄ 5.40
	CuSO ₄ . 5H ₂ O 0.40
	KCl 1.00
	FeCl ₃ . 6H ₂ O 2.00
	MnSO ₄ . 4H ₂ O 5.30
	Na ₂ HPO ₄ . 2H ₂ O 1.95
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O 4.00
A ₂	KH ₂ PO ₄ 100
	MgSO ₄ . 7H ₂ O 50
	NaCl 10
	CaCl ₂ . 6H ₂ O 15
	(NH ₄) ₂ SO ₄ 500
	Stok A ₁ 0.10
3a	Kalsiyum pantotenat 10
	Nikotinik asit 100
	Mezo-inositol 100
3b	Biotin 100 (% 50 etanol içerisinde)

3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

S. pombe'nin üretimi, genotipik kontrolü ve saklanması Gutz ve diğ., (1974)'nin önerdikleri yöntemler kullanıldı. Silika jel içinde 4°C' da saklanan stok kültürlerden alınan örnekler YEA'da 30°C' da yaklaşık 3 gün üretildi. Kültürlerden öze ile alınan örnekler MMA'ya azaltma yöntemi ile ekildi. MMA'da üreyebilme yeteneklerine göre prototrof oldukları doğrulanan tek düşmüş kolonilerden rastgele seçilen birkaçı eğri YEA besi ortamlarına aktarıldı ve 30°C' da yaklaşık 3 gün tutularak saf kültürler elde edildi. Saf kültürler 4°C' da saklandı ve çalışma boyunca 3-6 ayda bir saflık kontrolleri yapılarak pasajları yenilendi.

3.4 L-NAME VE SNP UYGULAMASI

Özgün bir NOS engelleyicisi olan L-NAME'nin stok çözeltisi 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edildikten sonra besi ortamlarına veya tampon çözeltilere belirlenen konsantrasyonlarda eklendi.

NO vericisi olarak kullanılan SNP'nin stok çözeltisi de 0,22µm filtreden geçirilerek steril edildikten sonra besi ortamlarına veya tampon çözeltilere belirlenen konsantrasyonlarda eklendi. Denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı.

3.5. L-NAME'NİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Eğri YEA'da üretilen kültür sulandırılarak MML'ye ekim yapıldı (10^6 hücre/ml). Çalkalamalı etüvde 30°C'da 180 devir/dakika hızda logaritmik evreye ulaşana kadar inkübasyona bırakıldı. Hücreler çöktürülerek saf su ile yıkandı ve yeniden MML'de süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonlarına final konsantrasyonu 25, 50, 75 ve 100 mM olacak şekilde L-NAME eklendi, L-NAME eklenmeyen kültür ise kontrol olarak kullanıldı. Çalkalamalı etüvde 30°C'da 180 devir/dakika hızda 1 saat tutulan kültürlerden örnekler alınarak YEA'ya yaklaşık 100 hücre/petri düşecek şekilde ekim yapıldı. 30°C'da 3 gün bekletilen petrilere oluşan koloni sayıları belirlendi. Değerlendirmeler, kontrol grubuna ait petrilere oluşan ortalama koloni sayısının L-NAME uygulamalı petrilereki ortalama koloni sayıları ile karşılaştırılmasıyla yapıldı.

3.6. SNP'NİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Eğri YEA'da üretilen kültür sulandırılarak MML'ye ekim yapıldı (10^6 hücre/ml). çalkalamalı etüvde 30°C'da 180 devir/dakika hızda logaritmik evreye ulaşana kadar üretilen hücreler çöktürülerek saf su ile yıkandı ve yeniden MML'de süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonlarına final konsantrasyonu 0.1, 0.5 ve 1 mM olacak şekilde SNP eklendi. SNP eklenmeyen hücre süspansiyonu kontrol grubu olarak kullanıldı. Süspansiyonlar 30°C'da 180 devir/dakika hızda 1 saat bekletildikten sonra hücre sayımı yapılarak sulandırım serileri hazırlandı. YEA'lı petrilere yaklaşık 10^3 , 10^4 ve 10^5 hücre içeren damla ekimler yapıldı. Petrilere 30°C'da 3 gün bekletilerek üreme durumları gözlemlendi. Değerlendirmeler, kontrol grubuna ait üreme yoğunluğunun SNP uygulaması yapılmış olanları ile karşılaştırılarak göreceli olarak yapıldı.

3.7. NO VE cGMP DÜZEYİNDEKİ AZALMANIN HÜCRELERDEKİ ETKİLERİ

Hücre içi NO konsantrasyonunun azaltılması amacıyla L-NAME'nin 100 mM'lık konsantrasyonu kullanıldı. cGMP konsantrasyonunun azaltılması için, bir sitoplazmik guanilil siklaz engelleyicisi olan metilen mavisi (Masaki ve Kondo, 1999) kullanıldı. Metilen mavisinin, Padilla ve diğ., (1998) tarafından *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinin yaşam yeteneğini azaltmadığı belirlenmiş olan 0,1 mM'lık konsantrasyonu uygulandı. NO ve cGMP konsantrasyonlarındaki azalmanın hücredeki morfolojik ve fizyolojik düzeydeki bazı etkileri gözlemlendi. Denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı.

3.7.1. Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler

Logaritmik evredeki *S. pombe* hücreleri, L-NAME veya metilen mavisi içeren YEA'lara yayma ekim yöntemiyle yaklaşık 250 hücre/petri olacak şekilde ekildi. Kontrol olarak L-NAME veya metilen mavisi eklenmemiş YEA petrilere ekim yapıldı. 30°C'de 3 gün bekletildikten sonra oluşan kolonilerden alınan örnekler lam-lamel arası preparat yapılarak hücre morfolojileri incelendi.

3.7.2. Mayoz Bölünme ve Spor Oluşumu Üzerindeki Etkiler

Eğri YEA'larda üretilen karşıt eşey tipindeki (972 h⁻ ve 975 h⁺) hücrelerden öze ile eşit miktarlarda alınarak, L-NAME veya metilen mavisi içeren ve kontrol olarak herhangi bir madde eklenmemiş eğri MEA besi ortamlarında karıştırıldı. 25°C'de bekletilen hücre karışımlarından 3. ve 12. günlerde alınan örneklerden lam-lamel arası preparatlar hazırlanarak mikroskop altında hücre morfolojileri, askus ve spor oluşumları incelendi.

3.7.3. Stres Yanıtı ve Apoptoz Üzerindeki Etkiler

Bu amaçla, temeli Osorio ve diğ. (2007) tarafından *S. cerevisiae*'de yapılmış olan bir çalışmaya dayanan bir yöntem uygulandı. Eğri YEA'larda üretilen hücrelerden 10^6 hücre/ml olacak şekilde MML'ye ekim yapılarak logaritmik evredeki hücre kültürü elde edildi. Hücreler çöktürölüp steril saf su ile yıkandıktan sonra L-NAME veya metilen mavisi içeren MML'de süspansiyon haline getirildi. Bunlara ek olarak herhangi bir madde eklenmemiş olan MML ile iki hücre süspansiyonu daha hazırlanarak (kontrol grupları) tüm hücreler 30C'de 180 devir/dakika hızda, 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda hücreler yıkanarak YEL'de süspansiyon haline getirildi ve kontrollardan bir tanesi dışında hepsine final konsantrasyonu 2 mM (yaklaşık % 50 öldürücü doz) (Pekmez, 2004) olacak şekilde hidrojen peroksit eklendi. Hücre süspansiyonları 180 devir/dakika hızda, 30°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda hücreler yıkandı ve YEA içeren petrilere yaklaşık 250 hücre/petri olacak şekilde yayma ekim yapıldı. 30°C'de 3 gün bekletilen petrilere oluşan koloniler sayılarak kontrol ve deney gruplarındaki ortalama canlı hücre sayıları belirlendi. Sonuçlar hidrojen peroksit içermeyen kontrol grubuyla karşılaştırılarak, hidrojen peroksit uygulamasıyla apoptozun teşvik edildiği hücrelerde L-NAME ve metilen mavisinin yaşam yeteneği üzerindeki etkileri değerlendirildi. Denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı.

3.8. NOS AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

NOS aktivitesinin saptanmasında Sutherland ve diğ. (2004) tarafından geliştirilen spektrofotometrik bir yöntem kullanıldı. Hücrede NO oluşumunun doğrudan ölçülmesine olanak veren bu yöntemin temeli, oksijen varlığında NO'nun 4,5-diaminfluoresan (DAF-2) molekülüne geri dönüşümsüz olarak bağlanması sonucunda fluoresan özellikteki 4,5-diaminfluoresan triazol (DAF-2T) molekülünün oluşmasına dayanmaktadır. Buna bağlı olarak, birim zamandaki fluoresans artışı ortamdaki NO artışıyla doğru orantılı olmaktadır.

3.8.1. Protein İzolasyonu

YEL besi ortamında logaritmik evrenin ortasına kadar üretilmiş 100 ml kültürden santrifüjlemeyle toplanan hücreler 500µl izolasyon tamponunda (50 mM Tris-HCL pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.5 mM fenilmetilsülfonil florür, 1 mM iodoasetamid, 1 µM löpeptin, 1 µM pepstatin A) süspansiyon haline getirildi ve cam boncuklar (asitte yıkandıktan sonra steril edilmiş, 0.5 mm çaplı) aracılığıyla buz üzerinde mekanik olarak parçalandı. Lizat 4°C’de 10.000 devir/dakika hızda, 10 dakika santrifüjlenerek hücresel kalıntılar çöktürüldü ve üst sıvı alındı.

3.8.2. Protein Konsantrasyonun Saptanması

Ham hücre özütlerindeki protein konsantrasyonu, Waterborg (2002) tarafından biraz değiştirilmiş olan Lowry yöntemi ile tayin edildi. Yöntemin uygulanmasında kullanılan çözeltiler **Tablo 3.3.**’de verildi.

Tablo 3.3. Protein konsantrasyonunun belirlenmesinde kullanılan çözeltiler

Çözeltiler	İçerik
Baz çözeltisi	2 N NaOH
A	% 2 (w/v) Na ₂ CO ₃
B	% 1 (w/v) CuSO ₄ .5H ₂ O
C	% 2 (w/v) Na ₂ C ₄ H ₄ O ₆ . 2H ₂ O
Kompleks oluşturma reaktifi	100 ml A: 1 ml B: 1ml C
Folin belirteci	1 N Folin-Ciocalteau

Protein konsantrasyonu saptanacak örneğin 0.1 ml’sine 0.1 ml baz çözeltisi eklendi. 10 dakika kaynar su banyosunda bekletilen karışım oda sıcaklığına gelene kadar soğutuldu. Üzerine 1 ml kompleks oluşturma reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Bu süre sonunda karışım üzerine, tüp karıştırıcıda, hızlı bir şekilde 100 µl Folin belirteci eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. Örneğe ait 550 nm dalga boyundaki absorbans değeri okundu. Protein konsantrasyonu, standart çözeltilerin absorbans değerine göre oluşturulmuş grafikten elde edilen denklem kullanılarak

hesaplandı. Steril saf su ile hazırlanan sığır serum albumini (“Bovine Serum Albumin”, BSA) çözeltilerinin (250, 500, 1000, 2000, 4000 µg/ml) 550 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri “GraphPad Ver.4” yazılım programı kullanılarak standart grafik haline dönüştürüldü. Hücre özütlemlerindeki protein konsantrasyonları, standart grafikten elde edilen denkleme göre hesaplandı ve ölçümlerde kör olarak parçalama tamponu kullanıldı.

3.8.3. NOS Aktivitesinin Ölçülmesi

Ham hücre özütlemlerindeki NOS aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle ölçülmesi amacıyla **Tablo 3.4**’de verilen karışım hazırlandı (Sutherland ve diğ., 2004).

Tablo 3.4. NOS aktivitesinin spektrofotometrik ölçümünde kullanılan reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon bileşenleri	Hacim /200 µl
Reaksiyon tamponu*	178.4 µl
Ham hücre özütü	20 µl (yaklaşık 0.2 µg protein)
DAF-2	1.6 µl (12µM)

* 5 mM 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetasulfonik asit (HEPES), 20 mM Tris-HCl, 2mM L-arjinin, 0.8 mM ditiotritol (DTT), 0.4 mM etilen diamin tetra-asetik asit (EDTA), 0.8 µM nikotin amid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), 1 mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 10 µg/ml kalmodulin, 0.8 µM flavin mononükleotid (FMN), 6 µM tetrahidrobiyopterin (BH₄), 0.8 µM flavin-adenin-dinükleotid (FAD), 0.2 mM fenilmetilsülfonil florür (PMSF), 0.4 mM iodoasetamid, 0.4 µM löpeptin ve 0.4 µM pepstatin A

Karışımlar, spektrofotometrik ölçüm için özel olarak üretilmiş 96 kuyucuklu kaplarda karanlık koşullarda hazırlandı. 72 saniyelik aralıklarla 15 dakika boyunca spektrofotometrede (“Bio-Tek”, FLx800) 510 nm’deki uyarım (eksitasyon) ve 530 nm’deki yayım (emisyon) değerlerindeki değişim izlendi. Hücre özütü eklenmemiş, DAF-2 ve reaksiyon tamponundan oluşan karışım kör olarak kullanıldı.

Deneyler **Tablo 3.5.**’de belirtilen 6 farklı seri ile ve 4 tekrarlı olarak yapıldı. Elde edilen değerler, bağıl floresans biriminin (“relative fluorescence unit”, RFU) zamana bağlı

değişimi olarak izlendi. Bağlı değerler, ölçülen fluoressan şiddeti değerlerinin $t = 0$ 'da kaydedilen fluoressan şiddetlerine oranlanmasıyla hesaplandı (Wright ve diğ., 2006). Deneylerden elde edilen sonuçların istatistik analizi “Graphpad Ver. 4” yazılımı ile ANOVA (varyans analizi) yöntemi uygulanarak yapıldı.

Tablo 3.5. NOS aktivitesinin spektrofotometrik yöntemle belirlenmesinde kullanılan deney serileri

Deney serisi	Deney serisinin içeriği
Kontrol	Reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2
25 mM L-NAME	Reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2, 25 mM L-NAME
50 mM L-NAME	Reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2, 50 mM L-NAME
75mM L-NAME	Reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2, 75 mM L-NAME
100 mM L-NAME	Reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2, 100 mM L-NAME
(-) CaCl_2 , CaM ve BH_4	CaCl_2 , CaM ve BH_4 içermeyen reaksiyon tamponu, hücre özütü, DAF-2

3.9. KÜLTÜR ORTAMINDA NO ÇIKIŞININ SAPTANMASI

Hücrelerde birim zamanda meydana gelen NO oluşumuyla, NO'nun oksitlenme ürünlerinden olan, nitrit (NO_2) birikimi arasında doğru orantı bulunduğundan (Berkels ve diğ., 2001), SNP uygulamasıyla oluşan ve hücre dışına çıkan NO düzeyi kültür ortamındaki NO_2 birikiminin belirlenmesiyle dolaylı olarak saptandı. Yöntemin temeli, NO_2 'nin, sülfonilamid ve N-(1-naftil)-etilendiamin dihidroklorür ile reaksiyona girerek oluşturduğu kırmızı renkli bir diazo boyar maddenin 550 nm dalga boyundaki absorpsiyonunun kolorimetrik olarak ölçülmesine (“Griess Assay”) dayanmaktadır (Green ve diğ., 1982). Deneyler, ticari bir kit (Cayman Chemicals, “Griess Assay Reagent”) kullanılarak ve üretici firmanın önerdiği şekilde yapıldı.

YEA besi ortamında üretilmiş 3 günlük kültür sulandırılarak 10^6 hücre/ml olacak şekilde 100 ml MML'ye ekim yapıldı. Çalkalamalı etüvde 30°C 'da 180 devir/dakika

hızda tutulan kültür logaritmik evreye ulaştığında hücreler çöktürülerek saf su ile yıkandı ve yeniden MML’de süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonundan 10’ar ml alınarak üzerlerine değişik konsantrasyonlarda (0.1, 0.5 ve 1 mM) SNP eklendi; SNP eklenmeyen hücre süspansiyonu kontrol grubu olarak kullanıldı. Süspansiyonlar 30°C’da 180 devir/dakika hızda 1 saat bekletildikten sonra hücreler santrifüjlemeyle çöktürülerek üst sıvılarda 550 nm dalga boyunda absorbans ölçüldü. Ölçümlerde kör olarak MML kullanıldı. Deneyler üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

Elde edilen absorbans değerleri, NaNO₂’nin çeşitli konsantrasyonları ile hazırlanan standart grafik yardımıyla “µg/ml NO₂” şekline dönüştürüldü. Standart grafik “KC Junior” yazılımı kullanılarak oluşturuldu.

3.10. FARKLILIK GÖSTERİMİ

Anlatımları hücre içi NO konsantrasyonlarındaki değişimlerden etkilenen genlerin belirlenebilmesi amacıyla Liang ve Pardee (1992) tarafından geliştirilen farklılık gösterimi (DD) tekniği kullanıldı.

3.10.1. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunda ticari bir kit (Roche, “High Pure RNA Isolation Kit”) kullanıldı ve işlemler üretici firma tarafından belirtilen şekilde gerçekleştirildi. Hücrelerin parçalanmasında, üretici firmanın önerisi olan litikaz enzimi uygulamasıyla birlikte (0.5 mm çaplı cam boncukla) mekanik yöntem de kullanıldı.

Eğri YEA’da üretilmiş 3 günlük kültür sulandırılarak 50’şer ml’lik 3 adet MML’ye ekim (10⁶ hücre/ml) yapıldı. Çalkalamalı etüvde 30°C’da 180 devir/dakika hızda tutulan kültürler logaritmik evrenin ortalarına ulaştığında kültürlerden birine final konsantrasyonu 100 mM olacak şekilde L-NAME (**L**), diğerine ise 1 mM olacak şekilde SNP eklendi (**S**). Kültürlerden biri de kontrol (**K**) olarak kullanıldı. Kültürler (**L**, **S** ve **K**) 30°C’da 180 devir/dakika hızda 1 saat inkübasyona bırakıldı.

Kültürlerin 10'ar ml'si 3000 devir/dakika hızda santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Çökeltiler 200'er µl fosfat tamponunda (PBS) süspansiyon haline getirildi ve üzerlerine 10 ünite litikaz (0.5 mg/ml stoktan 10 µl) eklenerek 30°C'da 15 dakika bekletildi. Litikaz uygulamasının ardından tüpler buza alındı ve hücre süspansiyonlarına yarı hacmi kadar asitte yıkandıktan sonra steril edilmiş cam boncuk eklenerek hücreler 2 dakika mekanik olarak da parçalandı.

Lizat 4°C'de 5.000 devir/dakika hızda, 2 dakika santrifüjlenerek hücre kalıntıları çöktürüldü. Üst sıvı yeni santrifüj tüplerine aktararak üzerine 400 µl lizis/bağlanma tamponu eklendi ve 15 saniye karıştırıldı. Karışım, bir toplama tüpünün içine oturtulmuş olan filtreli tüpe aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Filtreden toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. Filtreli tüpe 90 µl DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µl DNazI içeren karışım eklenerek 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu-I eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu-II eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 15 saniye santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı yeniden atıldıktan sonra bu kez filtreli tüpe 200 µl yıkama tamponu-II eklendi ve 15.000 devir/dakika hızda 4 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp, 1.5 ml'lik boş bir mikro santrifüj tüpünün içine oturtulduktan sonra 50 µl yıkama tamponu-II eklendi ve 10.000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj tüpüne geçen ve total RNA çözeltisini içeren sıvı küçük hacimlere bölünerek -80 °C'de saklandı.

Örneklerdeki RNA konsantrasyonlarının belirlenmesi amacıyla, nükleazsız steril ultra saf su ile 100 kez sulandırılan örneklerin 260nm'deki absorban değerleri ölçüldü ("Microquant" spektrofotometre, Biotech). RNA konsantrasyonunun hesaplanmasında "RNA (µg/ml)= A260 x sulandırım kat sayısı x 40" formülü kullanıldı (Maniatis ve diğ., 1982).

3.10.2. RNA'nın Elektroforetik Analizi

Total RNA moleküllerinin bütünlüğü % 1'lik agaroz-formaldehit jel elektroforezi ile değerlendirildi. RNA molekülleri MOPS tamponu kullanılarak denatüre edici koşulda incelendi (Maniatis ve diğ., 1982).

Elektroforez işleminde kullanılan tamponlar ve bileşenleri **Tablo 3.6.**'de verildi.

Tablo 3.6. Agaroz-formaldehit jel sisteminde kullanılan tamponlar ve bileşenleri

Tampon	İçerik	Miktar
20x MOPS tamponu (pH 7.0) (Tampon pH'sı 1N NaOH kullanarak ayarlandı ve otoklavda steril edildi)	MOPS (morfolinopropan sülfonik asit)	400 mM
	Sodyum asetat	160 mM
	EDTA	20 mM
RNA denatürasyon tamponu	Formamid	10 ml
	Formaldehit	3.5 ml
	10x MOPS tamponu	1.5 ml
Yürütme tamponu	10x MOPS	30 ml
	Formaldehit	5.4 ml
	DEPC'li saf su	264.6 ml

RNA moleküllerinin elektroforezinde kullanılacak jeli hazırlamak üzere, 0.4 g agaroz 31 ml DEPC'li saf su içinde mikrodalga fırında depolimerize edildikten sonra 50-60°C'ye kadar soğutuldu. Üzerine 2 ml 20x MOPS, 7 ml formaldehit ve 2 µl EtBr (10 mg/ml stok çözeltisinden) eklenerek karıştırıldı. Önceden hazırlanmış jel kasetine, dökülerek soğumaya bırakıldı.

RNA örneklerinin 7'şer µl'si 7 µl denatürasyon tamponuyla karıştırıldıktan sonra 3 µl jel yükleme tamponu eklenerek jele yüklendi. 60 V gerilim ve yaklaşık 40 mA akımda 45 dakika elektroforez uygulandı.

3.10.3. cDNA Sentezi

RNA moleküllerinden cDNA sentezi yapılmasında ticari bir kit (Fermentas, “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit”) kullanıldı ve işlemler üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyonlarda 3 farklı oligo-dT primeri (tek baz değişkenli, “one-base anchored” oligo d-T) kullanıldı. Kullanılan oligo d-T primerlerinin dizileri (Tawe ve diğ., 1998) **Tablo 3.7.**’da verildi. Buna göre, 3 farklı koşuldan (K, S ve L) izole edilen total RNA örnekleri için toplam 9 farklı sentez reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünlerinden rastgele alınan örneklerin 4’er μ l’si % 2’lik agaroz jelde kontrol edildi.

20 μ l’lik sentez reaksiyonu için: 1 μ g RNA ve 0.5 μ M oligo d-T primerden oluşan karışımın hacmi steril ultra saf su ile 12 μ l’ye tamamlanarak 70°C’de 5 dakika bekletildi. Daha sonra buz dolu kaba alınan karışımın üzerine 4 μ l 5X reaksiyon tamponu, 1 mM dNTP karışımı ve 20 ünite ribonukleaz engelleyicisi eklenerek 37°C’de 5 dakika bekletildi. Son olarak karışımın üzerine 200 ünite ters transkriptaz eklendikten sonra karışım 70°C’de 10 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Ardından buzda soğutulan örnekler -20°C’de saklandı.

Tablo 3.7. cDNA sentezinde kullanılan oligo-dT primerlerinin dizileri

tek baz değişkenli oligo d-T primerler	H-T11A	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3'
	H-T11C	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTC-3'
	H-T11G	5'-AAGCTTTTTTTTTTTTG-3'

3.10.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

K, L ve S koşulları için 3 farklı oligo-dT ile gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda elde edilen toplam 9 farklı cDNA'nın 8 farklı rastgele ("arbitrary") primer (HAP1-8) ile kombinasyonu sonucunda 72 farklı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) reaksiyonu yapıldı. Rastgele primerlerin tasarımı ve PZR uygulamaları Tawe ve diğ. (1998)'e göre gerçekleştirildi. Kullanılan, rastgele primerlerin nükleotid dizileri **Tablo 3.8.**'de verildi.

Tablo 3.8. PZR reaksiyonlarında kullanılan rastgele primerlerin dizileri

	Primer adı	Primer dizisi (5'-3')
13-merlik rastgele primerler	H-AP1	5'-AAGCTTGATTGCC-3'
	H-AP2	5'-AAGCTTCGACTGT-3'
	H-AP3	5'-AAGCTTTGGTCAG-3'
	H-AP4	5'-AAGCTTCTCAACG-3'
	H-AP5	5'-AAGCTTAGTAGGC-3'
	H-AP6	5'-AAGCTTCGACCAT-3'
	H-AP7	5'-AAGCTTAACGAGG-3'
	H-AP8	5'-AAGCTTTTACCGC-3'

Ön denemelerle optimize edilmiş 20 µl'lik PZR reaksiyonu için, nükleazsız steril ince çeperli PZR tüpüne: 50 mM Taq tamponu (KCl), 2 µM dNTP karışımı, 0.5 µM oligo dT primer, 0.5 µM rastgele primer, 1.5 mM MgCl₂, 2 µl kalıp cDNA ve 1 ünite Taq polimeraz eklenerek oluşturulan karışım nükleazsız steril ultra saf su ile 20 µl'ye tamamlandı. PZR aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

94°C 30 saniye (ön denatürasyon)

94°C 30 saniye (ön denatürasyon)	} x40
40 °C 2 dakika (primerlerin bağlanması)	
72 °C 30 saniye (polimerizasyon)	

72°C 5 dakika (son)

Reaksiyon ürünlerinden rastgele alınan örneklerin 4'er µl'si % 2'lik agaroz jelde kontrol edildi.

3.10.5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

PZR ürünlerinin ayrımı için kullanılan poliakrilamid jellerin hazırlanmasında ve elektroforezde Mathieu-Daude ve diğ. (1996)'de açıklanan yöntem temel alındı.

Jel sisteminin hazırlanmasında kullanılacak 0,75 mm'lik aralayıcı ("spacer") ve 0.75 mm'lik 30 kuyucuklu jel tarağı gibi malzemeler iyice yıkanıp saf su ile durulandıktan sonra kağıt havlu ile kurulandı. Cam plakalar (28x16.5 cm) deterjanla ılık suda yıkandıktan sonra bol su ile durulandı, ardından saf su ile tekrar durulanıp kağıt havlu ile kurulandı; daha sonra sırasıyla % 70 etanol ve saf su ile tekrar silinip kurulandı. Cam plakanın jel dökülecek yüzeyi, jelin cama yapışmasını engelleyen bir madde olan "Sigma Cote" ile silindi.

Aralayıcılar ve cam plakalar birleştirildikten sonra **Tablo 3.9.**'te belirtildiği şekilde hazırlanan % 6'lık alt jel çözeltisi kaset sistemine döküldü. Alt jel polimerize olduktan sonra üst jel de benzer şekilde döküldü. Elektroforezde yürütme tamponu olarak 1X TBE kullanıldı.

Tablo 3.9. Poliakrilamid jel elektroforezinde kullanılan çözelti ve tamponlar

Üst jel	Alt jel	5X TBE tamponu (500 ml)
15 ml ultra saf su	30 ml ultra saf su	27 g Tris base
3 ml akrilamid karışımı*	12 ml akrilamid karışımı*	13.76 g borik asit
2.5 ml 1M Tris (pH 6.8)	15 ml 1.5M Tris (pH 8.8)	10 ml 500 mM EDTA (pH 8)
200 µl % 10APS**	500 µl gliserol	Ultra saf su ile 500 ml'ye tamamlandı
10 µl TEMED	200 µl % 10APS**	
	15 µl TEMED	
* 29.3 g akrilamid + 0.8g bis-akrilamid / 100 ml ultra saf su		
** 0.1 g amonyum persulfat/ 1 ml ultra saf su, eklenmeden hemen önce taze hazırlandı		

12 µl PZR ürün örneği 4 µl bromofenol mavili yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra PZR aletinde 95°C'de 5 dakika denatüre edildi. Ardından hemen buza alınan örnekler Hamilton şırıngasıyla jelin ceplere yüklendi. Güç kaynağı 120 V gerilime ayarlandıktan sonra sabit gerilim altında 15 saat elektroforez işlemi uygulandı.

3.10.6. Gümüş Boyama

Elektroforez sona erdiğinde jel, cam plakalar arasından çıkartılıp bir yıkama kabına alındıktan sonra sırasıyla aşağıda belirtilen işlemlerden geçirildi (Tullo ve Sbisà, 2002).

% 10 etanol, % 1 asetik asit içeren çözeltide 40 devir/dakika hızda oda sıcaklığında 10 dakika, % 1.5 nitrik asit çözeltisiyle oda sıcaklığında 40 devir/dakika hızda 3 dakika ve son olarak ultra saf su ile 1 dakika çalkalandı. Ardından, 4 °C'ye soğutulmuş % 0.2 gümüş nitrat çözeltisiyle oda sıcaklığında 40 devir/dakika hızda 45 dakika bekletildikten sonra yeniden ultra saf su ile 10 saniye yavaşça çalkalanarak yıkandı. Daha sonra, % 3 sodyum karbonat ve % 0.2 formaldehit içeren çözelti içinde 1-2 dakika süreyle bantlar belirinceye kadar yavaşça çalkalandı. Bantların gözlenmesinden sonra önce % 5 asetik asit çözeltisiyle 1 dakika ve ardından ultra saf su ile 1 dakika yıkandı.

3.10.7. Jelden Geri Kazanım ve İkinci Çoğaltım

Poliakrilamid jellerden cDNA'ların geri kazanılması Abbaszadegan ve diğ. (2000)'e göre yapıldı. İstenen bantı içeren jel kısımları steril bistüri ile kesilip çıkartılarak 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındıktan sonra plastik pipet ucuyla ezilerek parçalandı ve üzerlerine 150µl fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) eklendi. Karışımlar 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15 dakika kaynatıldı. Ardından tüpler 14 000 dev/dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Üst sıvılar yeni tüplere aktararak üzerlerine 3.5 hacim % 100 etanol ve 1/10 hacim 2.5 M sodyum asetat (pH 5.2) eklendi. -70°C'de 30 dakika bekletilen tüpler 15 000 dev/dak. hızda 10 dakika santrifüjlendi. Çökeltilerin üzerine 100 µl % 75 etanol eklendikten sonra 15 000 dev/dak. hızda 5 dakika santrifüjlendi. Çökelti kuruduktan sonra 15 µl ultra saf suda çözündürüldü.

Geri kazanılan bantlardaki DNA moleküllerinin çoğaltılması amacıyla bu çözeltilerin 5'er µl'si kalıp olarak kullanılarak PZR gerçekleştirildi. PZR koşulları, **Bölüm 3.10.4.**'deki PZR reaksiyonu ile tamamen aynı olup sadece tekrar sayısı 35 olacak şekilde ayarlandı. PZR ürünleri agaroz jelde (% 2) kontrol edildi ve DNA içerdiği saptanan örnekler agaroz jelde saflaştırıldı.

3.11. NÜKLEOTİD DİZİLEMESİ VE DİZİ BİLGİLERİNİN ANALİZİ

Poliakrilamid jelden geri alınan ve agaroz jelde saflaştırılan DNA moleküllerinin nükleotid dizilemeleri İontek A.Ş. tarafından yapıldı. Dizileme sonuçları "Chromas pro" yazılım programı kullanılarak incelendi. Sonuçlar ayrıca grafik şeklinde (sinyal pikleri olarak) de incelenerek dizileme bilgilerinin en güvenilir olduğu aralıklar belirlendi. Buna göre, dizileme sırasında cihaz tarafından tam algılanamamış noktaların (N) bulunmadığı ve nükleotidlere ait sinyallerin en net ve kuvvetli olduğu ardışık en az 100 nükleotidlik bölgeler seçildi.

Kontrola göre farklılık gösterdiği saptanan nükleotid dizilerinin, *S. pombe*'nin hangi gen veya proteinlerine ait olabileceğinin araştırılması amacıyla "Basic Local Alignment Search Tool" (BLAST) yazılımı kullanılarak dizi benzerliği analizleri gerçekleştirildi

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Bu kapsamda, *S. pombe* genom veri tabanında nükleotid/nükleotid karşılaştırması (“DNA versus DNA”) için BLASTN ve nükleotid dizisinin translasyonunun karşılaştırması (“translated DNA versus translated DNA”) için de BLASTX analizleri yapıldı. Referans olarak, BLASTN analizlerinde mRNA dizileri, BLASTX analizlerinde ise bilinen tüm *S. pombe* protein dizileri kullanıldı. BLAST analizlerinde çok tekrarlı bölgeler gibi, rastgele eşleşme olasılığının yüksek olduğu bölgelerin elenmesi amacıyla taramalar, “düşük özgünlüğe sahip bölgeleri maskeleyme” (“mask low complexity regions”) seçeneği ile yapıldı.

Benzerliklerin önem derecelerinin değerlendirilmesinde “bit skoru” ve “E değeri” (“expectation” veya “expected value”) dikkate alındı. Bu kapsamda, 50 ve üstü değerde bit skoru üretilen (Altschul ve diğ., 1997), 10^{-4} ’ten daha küçük E değerine sahip olan benzerlikler (Pertsemlidis ve Fondon, 2001, Villarreal ve diğ., 2005) önemli kabul edilerek sadece bu sonuçlar değerlendirmeye alındı.

3.12. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

Farklılık gösterimi tekniği uygulanarak anlatımlarında farklılık olduğu belirlenen genlerin anlatım profillerindeki değişimlerin test edilerek doğrulanması amacıyla SYBR green temeline dayalı kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ PZR) yöntemi uygulandı. GZ PZR uygulamaları, İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE) Genetik Anabilim Dalı laboratuvarındaki “Light Cycler 2.0” (Roche) cihazı kullanılarak yapıldı.

GZ PZR uygulamasında sonuçların normalizasyonu için referans gen olarak *S. pombe*’nin aktin (*act1*) geni kullanıldı (Xue-Franzén ve diğ., 2006).

3.12.1. cDNA Kalıpları

Kontrol (K), 100 mM L-NAME uygulanmış (L) ve 1 mM SNP etkisinde bırakılmış (S) deney serileri için **Bölüm 3.10.1. ve 3.10.3.**'de açıklandığı şekilde sırasıyla mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. İşlemler farklı zamanlarda üç kez tekrarlanan aynı deney koşullarında gerçekleştirildi.

cDNA sentezinde **Bölüm 3.10.3**'den farklı olarak tek baz değişkenli oligo dT primerleri yerine, hücrede bulunan tüm mRNA moleküllerinin kopyalarının sentezi için eşit yarışma şansı yaratılması amacıyla kitte (Fermentas “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit”) bulunan genel oligo-dT₁₈ primeri kullanıldı.

3.12.2. Primerler

Primer dizilerinin tasarımında “Light Cycler Probe Design Software 2” yazılımından yararlanıldı. Buna göre, aktin geninin ve BLAST analizleri sonucunda saptanan diğer genlerin *S. pombe* genom veri tabanından elde edilen tam dizi bilgisine göre SYBR green yöntemi için en uygun olabilecek primerler aşağıda belirtilen ölçütlere göre saptandı.

Primerlerin yaklaşık 20 bç uzunluğunda, % GC değerlerinin 40-50 aralığında ve Tm değerlerinin 60°C dolayında olmasına, primerlerin birbirlerinin tamamlayıcısı olmamalarına ve PZR ürünlerinin yaklaşık 100-150 bç uzunluğunda olmasına dikkat edildi. Ek olarak, kalıp olarak kullanılacak cDNA ürünlerinin, mRNA'nın 3'-poli A kuyruğundan başlayarak sentezlenmesi ve kitteki ters transkriptazın sınırlı aktivite göstermesi bakımından PZR ile çoğaltılacak hedef bölgenin, genin 5' ucuna çok yakın olmamasına da dikkat edildi. Ayrıca, “Light Cycler Probe Design Software 2” yazılımı aracılığıyla genom veritabanlarında belirlenen primer çiftleri için taramalar yapılarak, seçilen primerlerin hedef gene özgünlüğü doğrulandı. Seçilen primerlere ilişkin bilgiler **Tablo 3.10.**'da verildi. Tasarlanan primerlerin sentezi İontek A.Ş. tarafından gerçekleştirildi.

Tablo 3.10. GZ PZR yönteminde kullanılan primerler

Gen adı	Primer dizileri	GC (%)	Tm (°C)	Ürün boyu (bp)
act1	F: ACTATGTATCCCGGTATTGCC R: GACAGAGTATTTACGCTCAGG	47.6 47.6	60.6 59.6	108
wis1	F: TAGACTTCCATCTTCGTTTCCT R: TATGGCATCGCACAGAGTT	40.9 47.4	59.6 60.2	108
byr1	F: GGACTTCAACTTATATGTCTCCTG R: GTGGCAAGTTCAATAATGCTG	41.7 42.9	59.6 59.7	100
ppk14	F: TCATTTGTCTGGCACAGAAGA R: GAAAGGAGTCGTGGCATATAG	45 47.6	60.2 60.2	126
pek1	F: TGCCTATTGAATTGCTCTCGTA R: TCCAGGACGACGAGTTT	40.9 52.9	60 60.1	137
sid1	F: GCAGCGCTCATCTTTAGAAT R: ATGCAGTCTGTTGTCTGG	45 50	59.8 60.2	103
SPCC553.12c	F: TTATGCATCCACTGCGG R: ACGGCGATAAACGTAGG	52.9 52.9	52.5 51.8	105
ubp12	F: GGTCTTGAGGCGGTCATTA R: TTCTTCAGGACATACAGGAGT	55 42.9	60 59.9	102
SPBC17A3.09c	F: ATCGACAGAGCTTTCAAGTCA R: ATAGTTCTGTGCTCAAGGG	45 50	60.3 60.2	101

3.12.3. Reaksiyon Koşulları

Reaksiyonlar ticari bir kit (Roche, “LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I”) kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaksiyon karışımı: 2.5 mM MgCl₂, 0,5 µM primer (ileri ve geri), 2µl enzim karışımı (“fast start DNA master mix”) ve 4 µl cDNA sentez reaksiyonundan elde edilen ürün (kalıp DNA) içerecek şekilde hazırlanıp final hacim ultra saf H₂O ile 20µl’ye tamamlandı. Tüm reaksiyon bileşenleri önceden 4°C’de soğutulmuş kılcal tüplerde hazırlandı. Negatif kontrol (kalıp içermeyen kontrol, NTC) olarak kalıp DNA yerine aynı hacimde ultra saf su eklenmiş olan reaksiyon karışımı kullanıldı

Reaksiyon koşulları ve cihaz ayarları kitte önerildiği biçimde, kullanılan primerlerin Tm değerleri ve uzunluğu gibi bazı özellikler dikkate alınarak sağlandı. Buna göre, uygulama aşamaları aşağıda belirtilen şekilde gerçekleştirildi.

Ön-İnkübasyon: 95°C 10 dakika

Çoğaltma : 45 çevrim (analiz modu: kantifikasyon)

95°C 10 saniye

53°C 7 saniye

72°C 5 saniye

Veri toplama modu: sadece çoğaltma sonunda (“acquisition mode:single”)

Erime (denatürasyon) eğrisi: 1 çevrim (analiz modu: erime eğrisi, “melting curve”)

95°C 5 saniye

48°C 5 dakika

95°C 5 saniye

Sıcaklık değişim hızı: 0.1 C/s

Veri toplama modu: sürekli

Soğutma: 40°C 30 saniye

3.12.4. Sonuçların Analizi

Genlerin anlatım düzeylerindeki değişimler, her bir reaksiyonun o andaki verimine bağlı olarak, deney grupları (K, S ve L) için elde edilen Ct (“crossing threshold”) değerlerinin, referans gen (aktin) için aynı koşullarda (K, S ve L) ölçülen Ct değerlerine oranlanması temeline dayanan PFAFFL denkleminde (Şekil 3.1.) göre hesaplandı (Pfaffl, 2001). Ct değerleri, “Light Cycler, Roche” cihazına ait yazılım tarafından CP (“crossing point”) olarak gösterilmektedir. Üç tekrarlı olarak yapılan deneylerden elde edilen sonuçların istatistik analizi “Graphpad Ver. 4” yazılımı ile eşleştirmeli T-testi uygulanarak yapıldı.

$$\text{oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta\text{Ct hedef (kontrol-deney)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{Ct ref (kontrol-deney)}}}$$

Şekil 3.1. PFAFFL denklemi.

E: PZR'nin verimi. Her bir PZR için ayrı ayrı hesaplanmakta olup teorik olarak 2 olması gerekir.

$\Delta\text{Ct hedef}$: Hedef gen için, kontrol ve deney koşullarında saptanan Ct (anlamli artışın saptandığı çevrim sayısı) değerlerinin farkı.

$\Delta\text{Ct referans}$: Referans gen olarak kullanılan gen için, kontrol ve deney koşullarında saptanan Ct değerlerinin farkı.

Reaksiyonların uygun biçimde gerçekleştiğinin doğrulanması amacıyla, “zemin gürültüsü” (“noise band”) olarak saptanan fluoresan ışımada şiddeti çıkartıldıktan sonra yaklaşık 15-25. çevrimlerde ölçülebilir düzeyde anlamli bir ışımada artışının saptanmasına (Karlen ve diğ., 2007), 10 ve 100 kez sulandırılan örneklerde yaklaşık 3 çevrimlik (Ct) farkın ($2^n=10$, $n=3.3$) gözlenmesine (Ponchel ve diğ., 2003), kullanılan yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanan reaksiyon verimlerinin (“efficiency”, E) yaklaşık 2 dolaylarında olmasına (Pfaffl, 2001) ve kalıp içermeyen kontrolde (NTC) fluoresans artışının saptanmamasına (Valasek ve Repa, 2005) dikkat edildi. Ayrıca, PZR çevrimlerinde saptanan fluoresans artışının hedef dizinin çoğalmasından kaynaklandığının doğrulanması amacıyla da reaksiyon sonunda yazılım tarafından otomatik olarak oluşturulan erime eğrilerinde her bir reaksiyon için tek bir pikin varlığı kontrol edildi (Pfaffl, 2001, Valasek ve Repa, 2005). Ek olarak bazı örneklere ait reaksiyon ürünleri agaroz jele de yüklenerek hedef diziyle aynı boyuttaki tek bantların varlığı kontrol edildi.

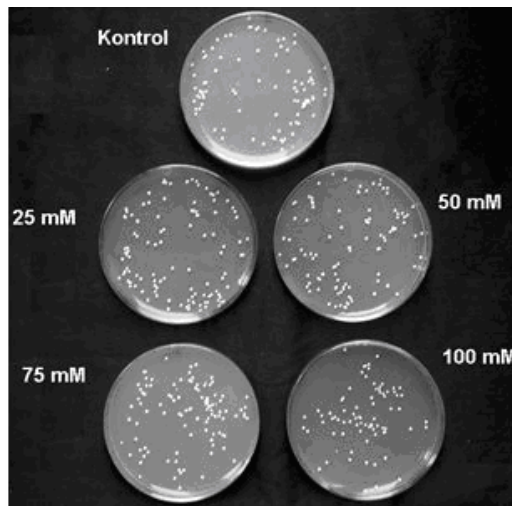
4. BULGULAR

4.1. L-NAME VE SNP'İN HÜCRELERİNİN YAŞAM YETENEĞİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Hücre içi nitrik oksit (NO) konsantrasyonlarındaki değişimlerin gen anlatımı üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, öncelikle nitrik oksit sentazın (NOS) özgün engelleyicisi olan L-NAME ile NO vericisi olan SNP'nin çalışmada uygulanacak dozlarını belirlemek üzere L-NAME ve SNP'nin çeşitli konsantrasyonlarıyla 1 saatlik uygulamanın *S. pombe* hücrelerinin yaşam yetenekleri üzerindeki etkileri araştırıldı.

4.1.1. L-NAME'nin Hücrelerin Yaşam Yetenekleri Üzerindeki Etkisi

Bölüm 3.4.1.'de açıklandığı şekilde ve üç tekrarlı olarak yapılan denemeler sonucunda L-NAME'nin 25-100 mM'lık konsantrasyonları ile 1 saatlik uygulamaların hücrelerin yaşam yetenekleri üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı saptandı (**Şekil 4.1.** ve **Tablo 4.1.**).



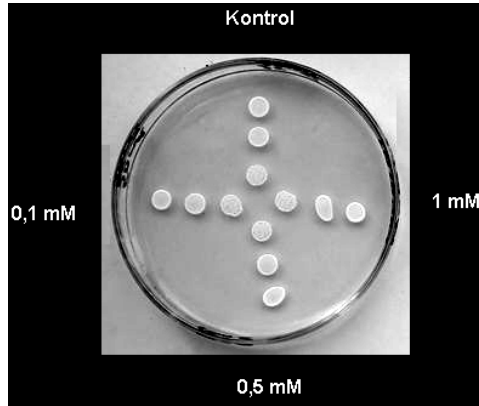
Şekil 4.1. L-NAME'nin çeşitli konsantrasyonlarının hücrelerin yaşam yetenekleri üzerine etkisi

Tablo 4.1. L-NAME'nin çeşitli konsantrasyonlarının ortalama koloni sayısına etkisi

	Kontrol	25mM	50mM	75mM	100mM
Ortalama koloni sayısı/petri	90±16	96±15	105±17	101±12	93±17

4.1.2. SNP'nin Hücrelerin Yaşam Yetenekleri Üzerindeki Etkisi

SNP'nin hücrelerin yaşam yetenekleri üzerindeki etkisi damla ekim yapılarak gözlemlendi. **Bölüm 3.4.2.**'de açıklandığı şekilde ve 3 tekrarlı olarak yapılan denemeler sonucunda, üreme yoğunluklarında kontrole göre fark gözlenmediğinden, SNP'nin 0,1-1 mM'lık konsantrasyonları ile 1 saatlik uygulamaların hücrelerin yaşam yetenekleri üzerinde indirgeyici etkisinin olmadığı gözlemlendi (**Şekil 4.2.**).

**Şekil 4.2.** SNP'nin çeşitli konsantrasyonlarının hücrelerin yaşam yetenekleri üzerindeki etkisi

4.2. NOS AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ

S. pombe ham hücre özütlerinde NOS enzimi aktivitesinin varlığı spektrofotometrik yöntem kullanılarak araştırıldı.

4.2.1. Protein Konsantrasyonu Tayini

Bölüm 3.5.1.'de açıklandığı şekilde yapılan işlemler sonucunda elde edilen ham hücre özütlerindeki ortalama protein konsantrasyonu 10 ($\pm 0,2$) μg protein/ml olarak hesaplandı.

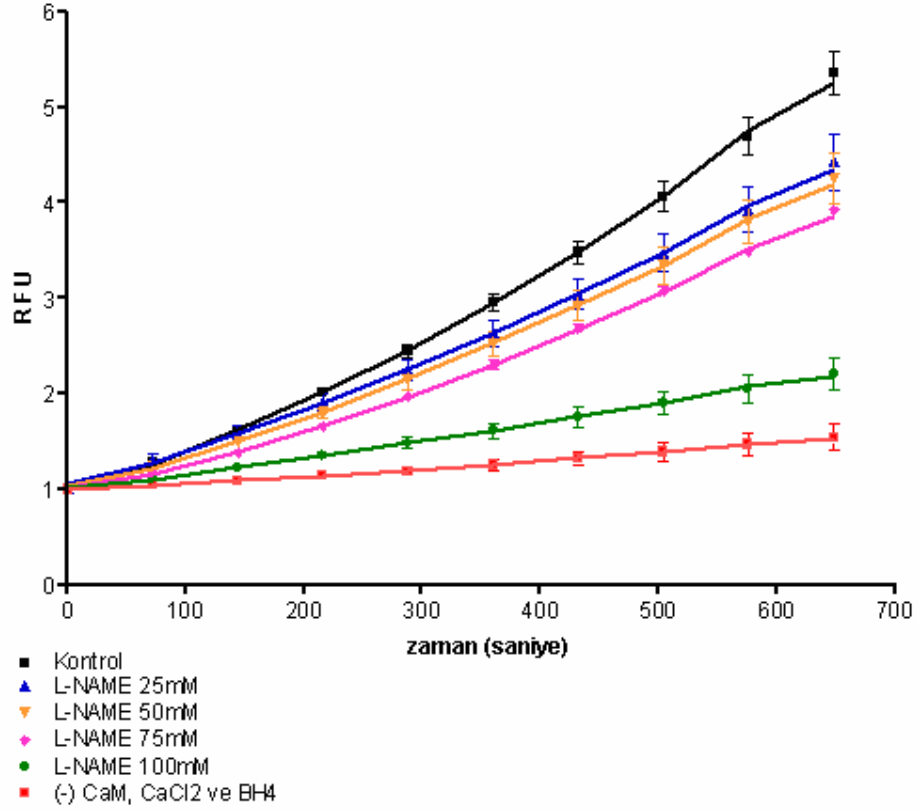
4.2.2. NOS Aktivitesinin Ölçülmesi

NOS enzimi aktivitesi için gerekli olan kofaktörlerden FAD, NADPH, FMN, Ca^{+2} , CaM ve BH_4 ile NOS substratı (L-arjinin) ve DAF-2 içeren reaksiyon tamponuna, *S. pombe* ham hücre özütleri eklendiğinde, DAF-2 ve reaksiyon tamponundan oluşan (hücre özütü eklenmemiş) köre karşı yapılan ölçümlerde bağıl DAF2T-fluoresans şiddetinde zamana bağlı olarak artış olduğu gözlemlendi (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.3.**).

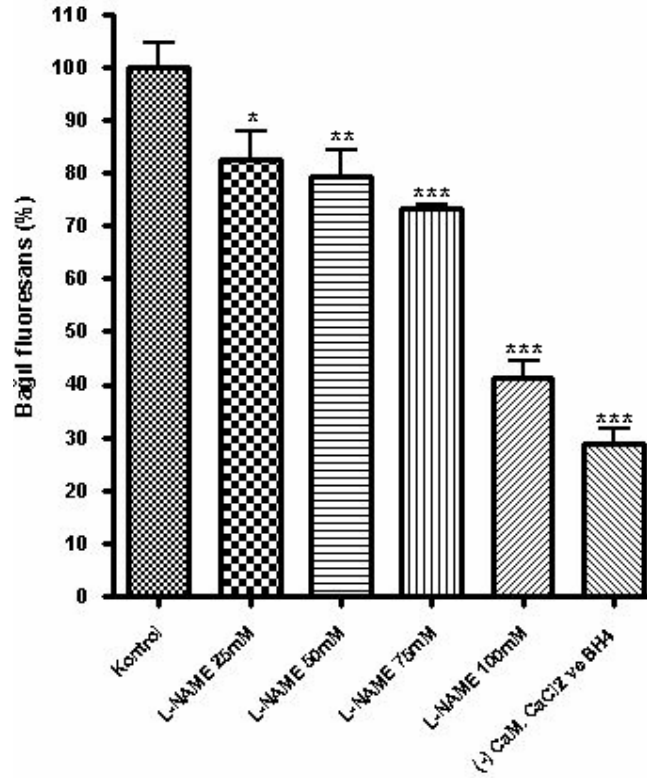
Bununla birlikte, NOS aktivitesi için belirleyici kofaktörlerden olan BH_4 ve CaM reaksiyon tamponundan çıkartıldığında ölçülen fluoresans şiddetinin, bu kofaktörleri içeren kontrol grubuna göre çok daha düşük olduğu bulundu. (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.3.**). Özellikle reaksiyonlardaki son ölçüm (648. saniyede) değerleri dikkate alındığında kofaktörlerin bulunmadığı gruptaki bağıl fluoresans değerinin kontroldakinin ancak %30'u kadar olduğu ortaya çıktı (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.4.**).

Tablo 4.2. Spektrofluorometrik ölçümlerde elde edilen bağıl floresans değerleri.

Zaman (saniye)	Bağıl floresans değerleri (RFU)					
	KONTROL	L-NAME 25mM	L-NAME 50mM	L-NAME 75mM	L-NAME 100mM	KOFAKTÖR (-)
0	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00	1,00 ±0,00
72	1,28 ±0,01	1,30 ±0,07	1,24 ±0,02	1,17 ±0,04	1,11 ±0,01	1,04 ±0,01
144	1,62 ±0,02	1,58 ±0,08	1,50 ±0,05	1,39 ±0,04	1,23 ±0,03	1,08 ±0,01
216	2,02 ±0,05	1,90 ±0,09	1,81 ±0,06	1,66 ±0,05	1,36 ±0,04	1,14 ±0,03
288	2,45 ±0,06	2,25 ±0,11	2,15 ±0,10	1,97 ±0,05	1,48 ±0,06	1,19 ±0,04
360	2,95 ±0,09	2,63 ±0,13	2,53 ±0,13	2,31 ±0,06	1,62 ±0,08	1,26 ±0,06
432	3,48 ±0,12	3,04 ±0,15	2,92 ±0,16	2,67 ±0,05	1,76 ±0,10	1,33 ±0,07
504	4,06 ±0,16	3,48 ±0,20	3,34 ±0,19	3,07 ±0,05	1,90 ±0,12	1,39 ±0,10
576	4,69 ±0,19	3,93 ±0,24	3,79 ±0,23	3,49 ±0,04	2,06 ±0,15	1,47 ±0,12
648	5,35 ±0,24	4,42 ±0,29	4,26 ±0,26	3,92 ±0,04	2,22 ±0,17	1,55 ±0,14



Şekil 4.3. *S. pombe* ham hücre özütlğinde bağıl floresans şiddeti değişimleri. Hata çubukları 4 tekrarlı yapılan deneylerden elde edilen ortalama değerlerin standart hatalarını (S.E.M) göstermektedir.



Şekil 4.4. *S. pombe* ham hücre özütlerinde, DAF2T oksidasyonu reaksiyonunda 648. saniyede kontrole göre floresans değişim oranları. % floresans oranları kontrol grubunun ortalama bağıl floresans değeri % 100 kabul edilerek hesaplandı. * $P < 0,05$ ** $P < 0,01$ ve *** $P < 0,001$

Bunlara ek olarak, birim zamanda meydana gelen bağıl floresans miktarındaki değişimler özgün NOS engelleyicisi olan L-NAME (25, 50, 75 ve 100 mM) varlığında da izlendi. **Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.3.**'de görüldüğü gibi L-NAME'nin 100 mM'lık konsantrasyonunun NOS aktivitesi üzerinde, L-NAME eklenmemiş kontrol grubuna göre, reaksiyonun ilerlemesine paralel olarak artan bir engelleyici etki gösterdiği belirlendi. Örneğin, 648. saniyede aktivitede yaklaşık % 60 oranında azalma saptandı (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.4.**). 25-75 mM'lık L-NAME konsantrasyonlarının da engelleyici etki gösterdiği ancak bu etkinin yaklaşık % 25 oranlarında sınırlı kaldığı gözlemlendi (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.4.**).

Deney serilerinin kontrol grubuna göre gösterdiği farklılıkların istatistik açıdan anlamlı olup olmadığı varyans analizi (ANOVA) yöntemiyle kontrol edilerek gözlenen farklılıkların istatistiksel bakımdan anlamlı olduğu doğrulandı (**Şekil 4.4.**) (Wright ve diğ., 2006).

Elde edilen bulgular doğrultusunda *S. pombe* hücre özütlerinde NOS benzeri bir aktivitenin var olduğu ve 100 mM'lık L-NAME'nin bu aktivite üzerinde kontrol grubuna göre yaklaşık % 60 oranında engelleyici etki gösterdiği saptandı.

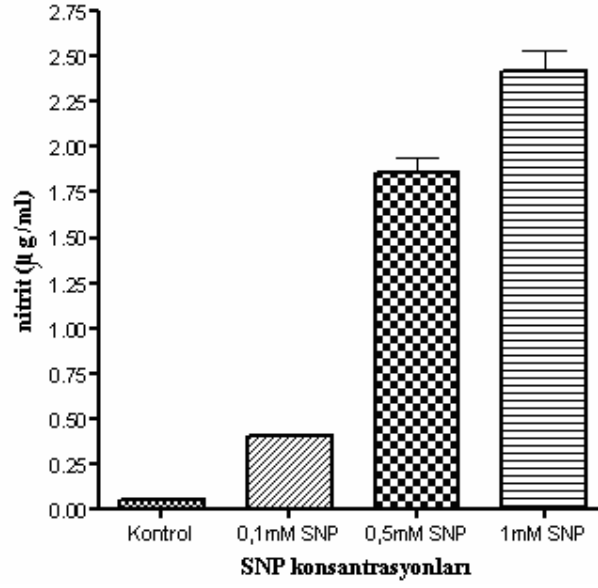
4.3. SNP'NİN NO₂ BİRİKİMİNE ETKİSİ

SNP'nin hücrelerdeki NO çıkışını arttırıcı etkisi, NO'nun oksitlenme ürünlerinden olan NO₂'nin ortamdaki birikiminin ölçülmesiyle dolaylı olarak belirlendi. Bu kapsamda, SNP'nin 1 saat uygulanan 0.1, 0.5 ve 1 mM'lık konsantrasyonlarının ortamdaki NO₂ birikimi üzerindeki etkisi **Bölüm 3.9.**'da açıklandığı şekilde ve 3 tekrarlı olarak yapılan deneylerle belirlendi.

Nitrit birikimine ilişkin ortalama değerler (µg/ml) Tablo 4.3.'de verildi. Uygulanan SNP konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak ortamdaki NO₂ konsantrasyonunun da artış gösterdiği saptandı. Örneğin, 1 mM'lık SNP uygulamasının, ortamdaki NO₂ birikimini kontrole göre yaklaşık 50 kat artırdığı belirlendi (**Tablo 4.3. ve Şekil 4.5.**).

Tablo 4.3. SNP'nin ortamdaki NO₂ birikimine etkisi. Üç tekrarlı deneylerin ortalamalarına ait standart hatalar (S.E.) tabloda belirtildi.

NO ₂ (µg/ml)	SNP konsantrasyonları			
	Kontrol (0mM)	0,1mM	0,5mM	1mM
	0.048 ±0.005	0.4077 ±0.02	1.858 ±0.2	2.423 ± 0.25



Şekil 4.5. Çeşitli SNP konsantrasyonlarının kültür ortamındaki NO₂ birikimine etkisi. Hata çubukları üç farklı deneyin ortalamalarına ilişkin standart hataları göstermektedir.

4.4. NO KONSANTRASYONLARINDAKİ DEĞİŞİMLERE DUYARLI GENLERİN SAPTANMASI

S. pombe'de anlatımları hücre içi NO konsantrasyonlarındaki değişimlerden etkilenen genlerin belirlenmesinde farklılık gösterimi (DD) tekniği uygulandı. Hücre içi NO konsantrasyonlarında değişim meydana getirmek üzere, **Bölüm 4.4.1.** ve **4.4.2.**'de elde edilen bulgular doğrultusunda, hücrelerin yaşam yeteneği üzerinde olumsuz etki yapmaksızın hücre içi NO konsantrasyonunda anlamlı değişimlere yol açan L-NAME'nin 100 mM ve SNP'nin 1 mM'lık konsantrasyonları kullanıldı.

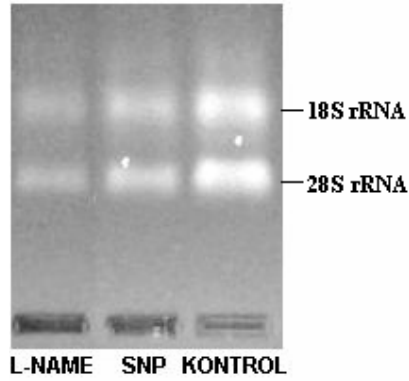
4.4. 1. Total RNA Konsantrasyonları

100 mM L-NAME (L), 1 mM SNP (S) etkisinde bırakılan ve herhangi bir uygulama yapılmamış olan kontrol (K) grubunu oluşturan örneklerden **Bölüm 3.10.1.**'de açıklandığı şekilde total RNA izolasyonu yapıldı. Örneklerle ait spektrofotometrik ölçümlerden elde edilen total RNA konsantrasyonları **Tablo 4.4.**'de verildi

Tablo 4.4. Kontrol ile SNP ve L-NAME etkisinde tutulan örneklerdeki total RNA konsantrasyonları

	Absorbans (OD ₂₆₀)	RNA konsantrasyonu (µg/ml)
Kontrol	0,162	1200
1mM SNP	0,1	800
100 mM L-NAME	0,079	632

Elde edilen total RNA moleküllerinin kalitesi % 1 formaldehit-agaroz jelde kontrol edildi ve izolasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği belirlendi (**Şekil 4.6.**).



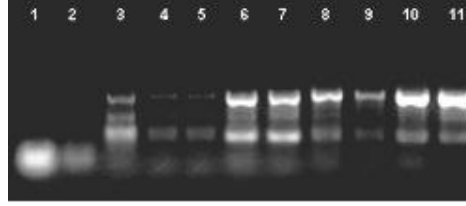
Şekil 4.6. Total RNA örneklerinin formaldehit-agaroz jel elektroforezi görüntüleri

4.4.2. cDNA Sentezi

K, S ve L koşullarındaki hücrelerden izole edilen total RNA molekülleri kalıp olarak kullanılarak 3 oligo-dT primeri (oligo dT-A, oligo dT-C ve oligo dT-G) ile **Bölüm 3.10.3.**'de açıklandığı şekilde 9 farklı cDNA sentezi reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünlerinden rastgele alınan örnekler % 2'lik agaroz jelde kontrol edildi.

Her bir cDNA sentez reaksiyonu sonucunda çeşitli boyutlardaki bantların oluştuğu gözlemlendi. Negatif kontrol olarak kullanılan, RNA kalıbı içermeyen ya da ters transkriptaz eklenmemiş olan örneklerle gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda ise

bantlar oluşmadı. cDNA sentez reaksiyonları sonrasında yapılan agaroz jel elektroforezine ilişkin bir örnek **Şekil 4.7.**'de verildi.



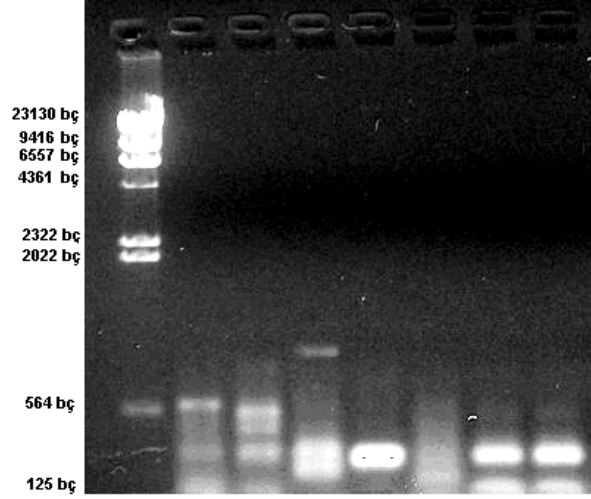
Şekil 4.7. cDNA sentezi ürünlerinden bazılarının agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri. (1) ters transkriptaz içermeyen, (2) RNA kalıbı içermeyen kontrollar. (3-11) K, L ve S koşullarında elde edilen cDNA bantları

cDNA ürünleri için kullanılan simgelerde önce hangi deney koşuluna ait olduğu, ardından 3 çeşit oligo dT'den hangisi ile elde edildiği belirtildi. Örneğin, 1 saatlik L-NAME uygulanan örnekten oligo dT-C ile elde edilen cDNA ürünü **LC** olarak, SNP etkisinde bırakılan **SC** ve kontrol grubu **KC** olarak adlandırıldı.

4.4.3. Rastgele ve Oligo dT Primerlerle PZR

K, L ve S koşulları için 3 farklı oligo-dT ile gerçekleştirilen reaksiyonlardan elde edilen toplam 9 farklı cDNA sentezi ürününün 8 çeşit rastgele primer (HAP1-8) ile kombinasyonu, **Bölüm 3.10.4.**'de açıklandığı şekilde, 72 ayrı PZR gerçekleştirildi.

Reaksiyon ürünlerinin bazılarından alınan örnekler % 2'lik agaroz jelde kontrol edildi. PZR sonucunda boyutları çoğunlukla 125-1000 bp arasında değişen çeşitli bantların olduğu gözlemlendi. Agaroz jel elektroforezi sonrasındaki görüntülere ait bir örnek **Şekil 4.8.**'de verildi.

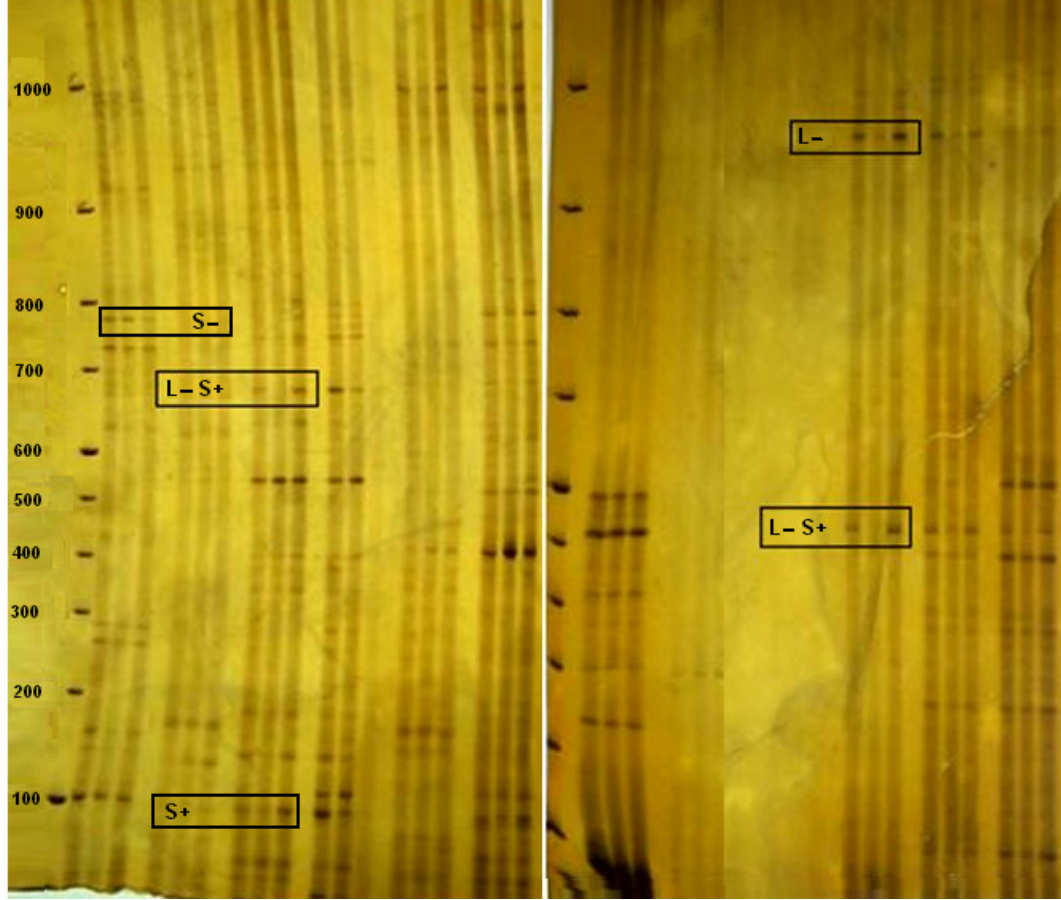


Şekil 4.8. PZR ürünlerinden rastgele alınan bazı örneklerin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri

PZR ürünlerinin adlandırılmasında, cDNA ürünlerine (**Bölüm 4.4.2.**'de açıklandığı şekilde) verilen simgelere ek olarak, 8 çeşit rastgele primerden (HAP1-8) hangisiyle birlikte kullanıldığı dikkate alındı. Örneğin, 1 saatlik L-NAME uygulanan örnekten oligo dT-C ile elde edilen cDNA ürünü HAP-1 ile birlikte kullanılmışsa **LC1**, SNP etkisinde bırakılan **SC1** ve kontrol grubu **KC1** olarak adlandırıldı.

4.4.4. PZR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforeziyle Ayrımı

Farklılık gösterimi tekniği kapsamında, oligo-dT, A, C ve G / HAP1-8 primer kombinasyonlarının 3 değişik koşul (K, L, S) için kullanılmasıyla elde edilen 72 farklı PZR ürününün tamamı için elektroforez uygulaması **Bölüm 3.10.5.**'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. Gümüş nitrat ile yapılan boyama sonucunda poliakrilamid jellerde elde edilen görüntülere ve farklılık gösterdiği saptanan bazı bantlara ilişkin örnekler **Şekil 4.9.**'da verildi.



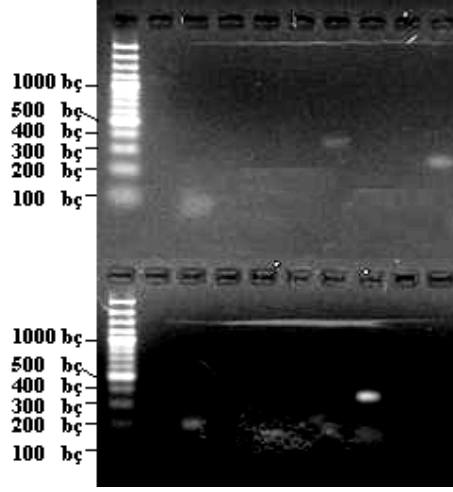
Şekil 4. 9. PZR ürünlerinin poliakrilamid jeldeki görünüşleri. Örnekler kuyucuklara sırasıyla, solda K, ortada L ve sağda S olacak şekilde yüklendi. Farklılık gösteren bantlardan bazıları çerçeve içine alındı. L-(L’de yok olan veya azalan), L+(L’de beliren veya artan), S-(S’de yok olan veya azalan), S+(S’de beliren veya artan) simgeleri K’ya göre gözlenen değişimleri ifade etmektedir. DNA boyut belirteci olarak, 100-1000 bp aralığını kapsayan, “Sigma P1473 PCR 100 bp Low Ladder” kullanıldı.

Çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmak üzere, NO düzeyi değişimlerinde kontrole göre farklılık gösterdiği saptanan (yok olan veya ortaya çıkan ya da yoğunluğu belirgin şekilde değişen) bantlardan boyutları 200 bp’nin üzerinde olanlar seçildi.

4.4.5. cDNA Parçalarının Jelden Geri Kazanımı

Kontrole (K) göre L-NAME (L) ve SNP (S) uygulanan deney koşullarında farklılık gözlenen DNA bantları poliakrilamid jelden kesilerek geri alındı ve **Bölüm 3.10.8.**’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilen PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz jele (% 2)

yüklenip geri alınarak saflaştırıldıktan sonra tekrar agaroz jelde (% 2) varlıkları kontrol edildi (**Şekil 4.10.**).



Şekil 4.10. Saflaştırılmış cDNA örneklerinin agaroz jeldeki görünümüne ait örnek.

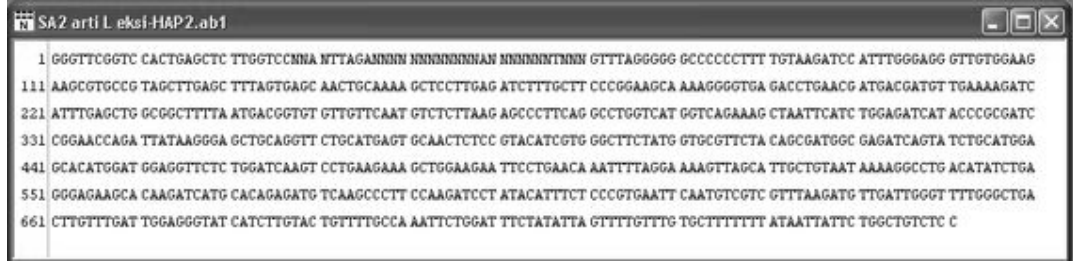
Çalışmada, NO konsantrasyonundaki artma ve azalma şeklindeki iki yönlü değişimlere duyarlı gen(ler)in belirlenmesi amaçlandığından, L-NAME etkisinde tutularak hücre içi NO konsantrasyonu düşürüldüğünde anlatımları kontrole göre belirgin olarak azalırken (veya tamamen baskılanırken), SNP etkisinde tutularak hücre içi NO konsantrasyonu yükseltildiğinde anlatımları kontrole göre belirgin şekilde artan genlerin saptanması hedeflendi. Buna göre, poliakrilamid jellerde K'ya göre farklılık gösteren cDNA bantları arasında L-NAME uygulamasıyla yoğunluğu K'ya göre azalır ya da yok olurken SNP uygulamasıyla artan (L- S+) değişimlerin öncelikle seçilmesine özen gösterildi. Ancak, DD tekniğinde yanlış pozitif çıkma olasılığının yüksek olması (**Tablo 2.1.**) ve çalışmada öncelikle seçilen (L- S+) bantlarının sayısının fazla olmaması nedeniyle, ek olarak (L-) veya (L+) ya da (S-) veya (S+) şeklinde çok belirgin değişimlerin gözlendiği bantlar da seçim kapsamına alındı.

Buna göre, 72 PZR ürününün tamamının poliakrilamid jellerde incelenmesi sonucunda, L-NAME ve SNP uygulanan deney koşullarında kontrole göre farklılık gösterdiği saptanan toplam 161 bant seçildi. Ancak, bu bantlardaki cDNA'ların 112 tanesi poliakrilamid jelden geri alma işlemleri veya PZR ürünlerinin agaroz jelde saflaştırılması sırasında kaybedildiğinden, nükleotid dizilemeleri için toplam 49 adet banttan cDNA molekülleri elde edildi.

4.5. DİZİ BİLGİLERİNİN ANALİZİ

Dizileme işlemi uygulanan 49 cDNA örneğinin 14 tanesinden (dizilemeyi yapan İntek A.Ş. tarafından verilen bilgiye göre) konsantrasyonlarının yeterli olmaması nedeniyle dizileme bilgisi elde edilemedi. 35 örneğin dizileme sonucunun analizi **Bölüm 3.11.**'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi.

Dizi benzerliği (BLAST) analizlerinde kullanılmak üzere sinyallerin en net ve kuvvetli olduğu ardışık en az 100 nükleotidlik bölgeler seçildi. Dizileme bilgilerinin analizine ilişkin bir örnek olarak, HAP2/oligo dT-A primer kombinasyonlarıyla elde edilmiş ve S koşulunda artarken L koşulunda azalan banttaki (S2A+ L2A-) cDNA'lara ait nükleotid dizisi için yapılan seçim işlemleri ve sonuçlar **Şekil 4.11.(a - c).**'de verildi.

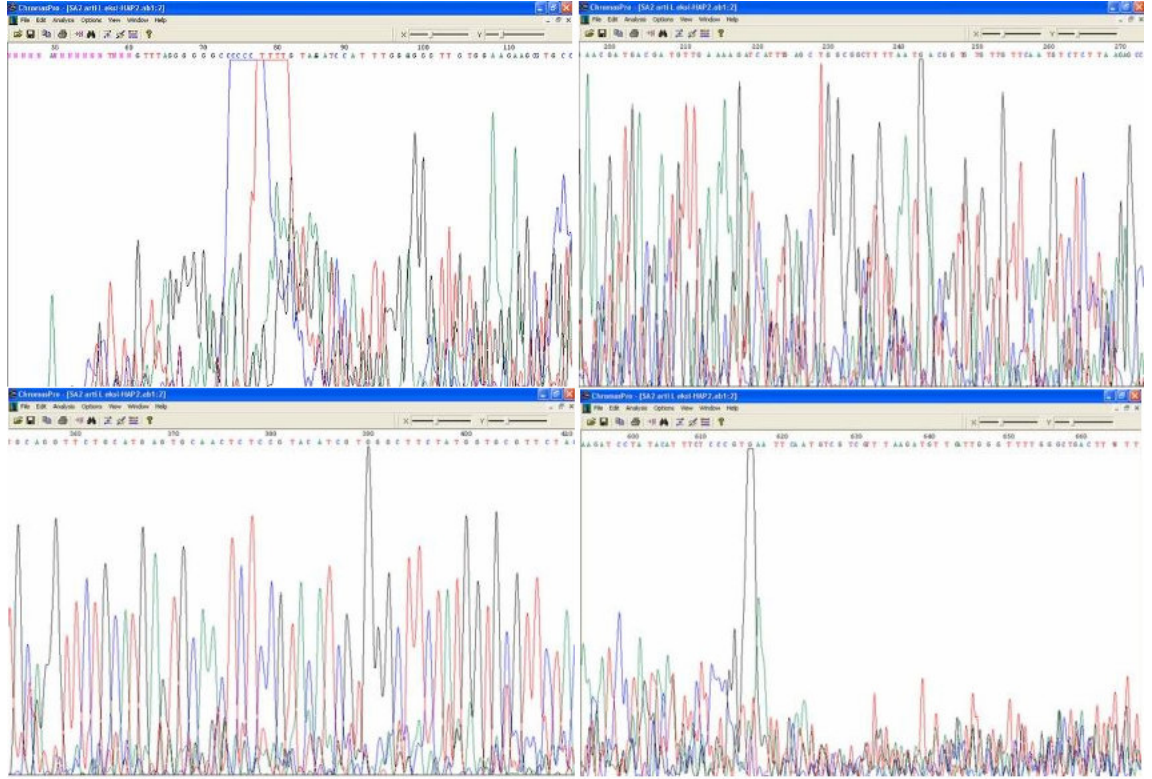


```

1  GGGTTCGGTC CACTGAGCTC TTGGTCCMNA NITAGANNNN NNNNNNNNN NNNNNNNNNN GTTAGGGGG GCCCCCCTTT TGTAAAGATCC ATTTGGGAGG GTTGTGGAAG
111 AAGCGTGCCG TAGCTTGAGC TTTAGTGAGC AACTGCAAAA GCTCCTTGAG ATCTTTGCTT CCGGGAAGCA AAAGGGGTGA GACCTGAACG ATGACGATGT TGAAAAGATC
221 ATTTGAGCTG GCGGCTTTTA ATGACGGTGT GTTGTTCAAT GTCTCTTAAG AGCCCTTCAG GCCTGGTCAT GGTGAGAAAG CTAATTCATC TGGAGATCAT ACCCGCGATC
331 CGGAACCAGA TTATAAGGGA GCTGCAGGTT CTGCATGAGT GCAACTCTCC GTACATCGTG GGCTTCTATG GTGCGTTCTA CAGCGATGGC GAGATCAGTA TCTGCATGGA
441 GCACATGGAT GGAGGTTCTC TGGATCAAGT CCTGAAGAAA GCTGGAAGAA TTCTGAACA AATTTTAGGA AAAGTTAGCA TTGCTGTAAT AAAAGGCCTG ACATATCTGA
551 GGGAGAAGCA CAAGATCATG CACAGAGATG TCAAGCCCTT CCAAGATCCT ATACATTTCT CCCGTGAATT CAATGTCGTC GTTTAAGATG TTGATTGGGT TTTGGGCTGA
661 CTGTTTGTAT TGGAGGGTAT CATCTTGTAC TGTTTGCCA AATTCGGAT TTCTATATTA GTTTTGTTG TGTCTTTTT ATAATTATTC TGGCTGTCTC C

```

Şekil 4.11. (a) (S2A+ L2A-) örneğine ait dizileme sonucu



Şekil 4.11. (b) (S2A+ L2A-) örneğinin dizilenmesi sırasında cihazda kaydedilen sinyallere ilişkin grafik. Bu örnekte, sinyallerin en kuvvetli olarak 120-550. nükleotid aralığında kaydedilmiştir.

```

SA2 arti L ekşi-HAP2.ab1

1 GGGTTCCGTC CACTGAGCTC TTGCTCCNNA NITAGANNNN NNNNNNNNAN NNNNNNNNNN GTTtaggggg GCCCCCTTT TGTAAATCC ATTTGGGAGG GTTGTGGAAG
111 AAGCGTGCC TAGCTTGAGC TTTAGTGAGC AACTGCAAAA GCTCCTTGAG ATCTTTGCTT CCGGAAGCA AAAGGGGTGA GACCTGAAGC ATGACGATGT TGAAGAAGTC
221 ATTTGAGCTG GCGGCTTTTA ATGACGGTGT GTTGTTCAAT GTCTTTAAG AGCCCTTCAG GCTGGTCAT GGTGAGAAAG CTAATTCATC TGGAGATCAT ACCCGGATC
331 CGGAACCAGA TTATAAGGA GGTGACGTT CTGATGAGT GCAACTCTCC GTACATCTGT GGTCTTATG GTGGCTTCTA CAGCGATGGC GACATCAGTA TCTGCATGGA
441 GCACATGGAT GGAGGTTCTC TGGATCAAGT CCGAAGAAA GCTGGAAGAA TTCTGGAACA AATTTTAGGA AAAGTTAGCA TTCTGTAAAT AAAAGGCTG ACATATCTGA
551 GGGAGAAGCA CAAGATCATG CACAGAGATG TCAAGCCCTT CCAAGATCTC ATACATTTCT CCGTGAATT CAATGTGTC GTTTAAGATG TTGATTGGGT TTTGGGCTGA
661 CTGTTTGTAT TGGAGGGTAT CATCTGTAC TGTTTTGCCA AATCTGGAT TCTATATTA GTTTTGTG TGCTTTTTT ATAATTATTC TGGCTGTCTC C

```

Şekil 4.11. (c) *S. pombe*'nin genom veri tabanında kullanılmak üzere seçilen dizi aralığı (120-550. nükleotidler). Sinyallerin en kuvvetli olduğu aralıktaki dizi taralı olarak gösterildi.

4.5.1. Dizi Bilgilerinin Genom ve Protein Veri Tabanlarındaki Benzerlik Analizleri

35 farklı örneğe ilişkin seçilen nükleotid dizilerinin, *S. pombe*'nin hangi gen veya gen ürünlerine (proteinlere) ait olabileceğinin araştırılması amacıyla “National Center for Biotechnology Information” (NCBI)'daki *S. pombe* genom ve protein veri bankalarında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) **Bölüm 3.11.**'de açıklandığı şekilde BLASTN ve BLASTX analizleri gerçekleştirildi. Referans olarak, BLASTN analizlerinde mRNA dizileri, BLASTX analizlerinde de bilinen tüm *S. pombe* protein dizileri kullanıldı.

Seçilen dizinin NCBI'ya ait *S. pombe* genom veri tabanındaki BLASTN veya BLASTX programına girişi yapıldı. Veri tabanında saptanan benzerliklerde, **Bölüm 3.11**'de belirtildiği gibi, sadece E değeri $\leq 10^{-4}$ olan benzerliklere ilişkin sonuçların gösterilmesi ve düşük özgünlüğe sahip dizi bölgelerinin filtrelenmesi seçenekleri tercih edildi (**Şekil 4.12.**). Buna göre örnek olarak verilen (S2A+ L2A-) dizisi için BLASTX programında elde edilen benzerlik sonuçları **Şekil 4.13.**'de verildi.

Adres <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?taxid=4896>

Search Map Viewer Go Clear

BLAST
 Overview
 FAQs
 News
 Manual
 References
 Retrieve results

Genome Project

BLAST *Schizosaccharomyces pombe* Sequences

☒ Enter an accession, gi, or a sequence in FASTA format:

```
GGGGTGAGACCTGAACGATGACGATGTTGAAAAATCATTGAGCTGGCGGCTTTTAATGACGG
TGTGTTGTTCAATGTCTCTTAAAGAGCCCTTCAGGCCTGGTCATGGTCAGAAAAGCTAATTCATCT
GGAGATCATACCCGCGATCCGGAACAGATTATAAGGGAGCTGCAGGTTCTGCATGAGTGCAAC
TCTCCGTACATCGTGGGCTTCTATGGTGCGTTCTACAGCGATGGCGAGATCAGTATCTGCATGG
AGCACATGGATGGAGGTTCTCTGGATCAAGTCCTGAAAGAAAGCTGGAAGAATTCCTGAACAAAT
TTTAGGAAAAAGTTAGCATTGCTGTAATAAAAGGCCTGACATATCTGA
```

☐ Or, choose a file to upload
 Gözet...

Set subsequence: (optional)
 From: To:

Database:
 RefSeq protein 5003 sequences

Program:
 BLASTX: Compare a nucleotide sequence against a protein database

Optional parameters

Expect	Filter	Descriptions	Alignments
0.0001	low complexity	100	100

Şekil 4.12. (S2A+ L2A–) dizisinin *S.pombe* genom veri bankasında BLASTX programına uygulanması.

NCBI/BLAST/Formatting Results - 7WNXA52P014

[Return to current design](#) [Formatting options](#) [Download](#)

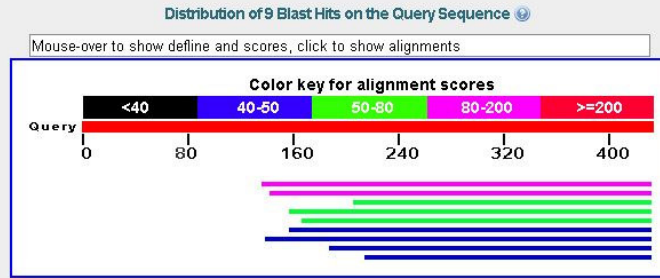
lcl3894 (431 letters)

Query ID lcl3894
Description None
Molecule type nucleic acid
Query Length 431

Database Name gp/4896.9517//4896_refp
Description Schizosaccharomyces pombe RefSeq protein
Program BLASTX 2.2.18+ [Citation](#)

Other reports: [Search Summary](#) [Taxonomy reports](#)

▼ Graphic Summary



▼ Descriptions

Sequences producing significant alignments:			Score (Bits)	E Value	
ref NP_593026.1 	MAP kinase kinase Byr1 [Schizosaccharomyces ...		101	3e-23	UG
ref NP_595457.1 	MAP kinase kinase Wis1 [Schizosaccharomyces ...		86.3	1e-18	UG
ref NP_596795.1 	MAP kinase kinase Pkl1 (PMID 10365961) [Schi...		70.5	9e-14	UG
ref NP_593564.1 	PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces...		58.2	4e-10	UG
ref NP_596340.1 	serine/threonine protein kinase Cdc7 [Schizo...		50.4	9e-08	UG
ref NP_594517.1 	PAK-related kinase Ppk11 [Schizosaccharomyce...		49.3	2e-07	UG
ref NP_001018849.1 	aurora-B kinase Ark1 [Schizosaccharomyces...		43.9	9e-06	UG
ref NP_593005.1 	MEK kinase (MEKK) Mkh1 (PMID 9199286) [Schiz...		43.1	1e-05	UG
ref NP_593557.1 	MAP kinase kinase kinase Wis4 [Schizosacchar...		41.6	4e-05	G

▼ Alignments ☐ Select All [Get selected sequences](#) [Distance tree of results](#)

>[ref|NP_593026.1|](#) [UG](#) MAP kinase kinase Byr1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=340

GENE ID: 2542137 byr1 | MAP kinase kinase Byr1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] ([Over 10 PubMed links](#))

Score = 101 bits (252), Expect = 3e-23
Identities = 49/98 (50%), Positives = 67/98 (68%), Gaps = 0/98 (0%)
Frame = +2

Query 137 SMSLKSPSGLVMVRKLIHLEIIPAIRNQIIREQLVHECNSPYIVGFYGFYSDGEISIC 316
++SL + M RK +++ ++ QI+REL VLH C SPYIVGFYGFY IS+C
Sbjct 79 AVSLVKHRNIFMARKTVYVGSDSLQKQILRELGLVHHCSPYIVGFYGFYQYKNISLC 138

Query 317 MEHMDGGSGLDQVLKKAQRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
ME+MD GSLLD +L++ G IP ILGK+ +++KGL YL
Sbjct 139 MEYMDGGSLLDAILREGGPIPLDILGKIINSMVKGLIYL 176

>[ref|NP_595457.1|](#) [UG](#) MAP kinase kinase Wis1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=605

GENE ID: 2541055 smf2 | MAP kinase kinase Wis1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] ([Over 10 PubMed links](#))

Score = 86.3 bits (212), Expect = 1e-18
Identities = 45/96 (46%), Positives = 62/96 (64%), Gaps = 1/96 (1%)
Frame = +2

Query 143 SLKSPSGLVMVRKLIHLEIIPAIRNQIIREQLVHECNSPYIVGFYGFYSDGEISICME 322
+L P+G+ M K I L + A NQII EL +LH+ SPYIV FYGAF+ +G + ICME
Sbjct 337 ALHQPTGVTMALKEIRLSLEBATFNQIIMELDILHKAVSPYIVDFYGAFFVREGSVFICME 396

Query 323 HMDGGSGLDQVLKKAQRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
+MD GS+D+ L G E +L + + AV++GL L
Sbjct 397 YMDAGSMDK-LYAGGIKDEGLARTAYAVVQGLKTL 431

Şekil 4.13. (S2A+ L2A-) dizisine ilişkin BLASTX analizi sonuçları.

Şekil 4.13.'de gösterilen (SA2+ LA2-) dizisine ilişkin BLASTX sonuçları incelendiğinde, bit skoru ≥ 50 olanlar arasında, en önemli benzerliğin ilk sırada gösterilen Byr1 adlı bir protein kinaz (MAPK) için elde edildiği saptandı. Bu proteinin biyolojik işlevleri ve hücrede hangi süreçlerde rol oynadığına ilişkin veri tabanından ulaşılan bilgiler **Şekil 4.14.**'de gösterildi. Ek olarak, bu proteinin etkileştiği bilinen diğer proteinleri şifreleyen genler de **Şekil 4.15.**'de verildi.

□ 1: **byr1 MAP kinase kinase Byr1** [*Schizosaccharomyces pombe*]
 GeneID: 2542137 updated 06-Jul-2008

Summary ↑ ?

Gene name	byr1
Primary source	GeneDB:SPAC1D4.13
Locus tag	SPAC1D4.13
Organism	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (strain: 972h-)
Also known as	ste1; byr1; ste3

Function	Evidence
ATP binding	IEA
MAP kinase kinase activity	TAS PubMed
protein binding	IPI PubMed
protein serine/threonine kinase activity	IEA
Process	Evidence
MAPKKK cascade	IEA PubMed
cell cycle arrest in response to pheromone	TAS PubMed
cellular response to nitrogen starvation	IGI PubMed
protein amino acid phosphorylation	ISS PubMed
signal transduction during conjugation with cellular fusion	IGI PubMed

Şekil 4.14. *S. pombe*'de Byr1 proteininin işlevleri ve hücrede rol oynadığı süreçlere ilişkin bazı veriler.

Interactions ↑ ?

Description	Product	Interactant	Other Gene	Complex	Source	Pubs
Affinity Capture-Western; Two-hybrid	BioGRID:278613	BioGRID:277189	bob1		BioGRID	PubMed
Two-hybrid	BioGRID:278613	BioGRID:277138	byr2		BioGRID	PubMed
Dosage Rescue	BioGRID:278613	BioGRID:276502	moc4		BioGRID	PubMed
Dosage Rescue	BioGRID:278613	BioGRID:278753	ras1		BioGRID	PubMed
Two-hybrid	BioGRID:278613	BioGRID:278934	spk1		BioGRID	PubMed
Dosage Rescue	BioGRID:278613	BioGRID:278173	ste4		BioGRID	PubMed

Şekil 4.15. *S. pombe*'de Byr1 proteininin moleküler etkileşimlerine ilişkin bazı bilgiler

Ayrıca, **Şekil 4.13.**'de gösterilen eşleşme verilerine göre bit skorları ve E değerleri bakımından, Byr1'den sonraki dört benzerliğin de önemli kabul edilebileceği ortaya çıktı. Bu örnekte olduğu gibi birden fazla önemli benzerliğin saptandığı durumlarda, ilgili gen ürünlerinin biyolojik işlevleri ve moleküler etkileşimleri göz önüne alınarak, çalışmanın sonraki aşamalarında özellikle işlev bakımından NO ile ve birbirleriyle ilişkili olabileceği düşünülen genler öncelikle değerlendirmeye alındı.

S. pombe gen ve protein veri tabanlarında yapılan BLASTN ve TBLASTX analizlerinde 35 dizi bilgisinden 8 tanesi için herhangi bir benzerlik saptanamadı. Kalan 27 dizi bilgisine ilişkin elde edilen verilerden 18'i **Bölüm 3.11.**'de belirtilen ölçütlere uymadığından (bit skoru ≥ 50 , E değeri $\leq 10^{-4}$) değerlendirilmeye alınmadı. Buna göre, *S. pombe* genomunda şifrelenen bazı genlere önemli benzerlikler gösterdikleri saptanan 9 farklı dizinin kökeni ve yaklaşık molekül boyutuna ilişkin bilgiler **Tablo 4.5.**'de, bu dizilerin BLASTN ve BLASTX analizlerine ilişkin elde edilen bulgular ise **Tablo 4.6.**'da verildi.

Tablo 4.5. BLAST analizlerinde önemli benzerlikler gösteren dokuz dizinin köken ve yaklaşık molekül uzunluklarına ilişkin veriler

No	Bant simgesi	Kullanılan primer kombinasyonu	Yaklaşık DNA uzunluğu (bp)
1	L5A– S5A+	HAP5 /oligo dT-A	750
2	L2C– S2C+	HAP2 /oligo dT-C	800
3	L5G– S5G+	HAP5 /oligo dT-G	200
4	L6A– S6A+	HAP6 /oligo dT-A	750
5	L6A– S6A+	HAP6 /oligo dT-A	750
6	L2A– S2A+	HAP2 /oligo dT-A	750
7	L1G– S1G+	HAP1 /oligo dT-G	850
8	LC7–SC7+	HAP7 /oligo dT-C	200
9	LC5+	HAP5 /oligo dT-C	300

Tablo 4.6. BLASTN veya BLASTX analizleri sonucunda saptanan önemli benzerliklere ilişkin bulgular (4 ve 5 no'lu örnekler farklı DD jellerine aittir).

1	Gen ve/veya protein adı	İşlevi	Bit skoru	E değeri
L5A-S5A+	ubpl2	protein deubikitinasyonu	blastx 65.9	1.2e-12
	ubpl	Ubikitinine bağmlı proteaz aktivitesi	blastx 54.3	8e-09
2 L2C-S2C+	SPBC17A3.09c (lipoat-protein ligaz A)	protein modifikasyon süreci	blastn 130	4e-31
3 L5G-S5G+	SPCC553.12c	Korunmuş hipotetik mantar proteini	blastn 67.9	2e-12
4 L6A-S6A+	wis1	MAP kinaz	blastx 91.7	5e-20
	byr1	MAP kinaz	blastx 88.6	4e-19
	pek1	MAP kinaz	blastx 66.6	2e-12
	sid1	PAK- (p21 ile aktiveşen kinaz) ile ilişkili kinaz	blastx 59.3	3e-10
5 L6A-S6A+	byr1	MAP kinaz	blastx 79.3	8e-17
	wis1	MAP kinaz	blastx 73.9	4e-15
	pek1	MAP kinaz	blastx 56.2	8e-10
	sid1	PAK- (p21 ile aktiveşen kinaz) ile ilişkili kinaz	blastx 45.8	1e-06
6 L2A-S2A+	byr1	MAP kinaz	blastx 101	3e-23
	wis1	MAP kinaz	blastx 86.3	1e-18
	pek1	MAP kinaz	blastx 70.5	9e-14
	sid1	PAK- (p21 ile aktiveşen kinaz) ile ilişkili kinaz	blastx 58.2	4e-10
7 L1G-S1G+	SPBC17A3.09c (lipoat-protein ligaz A)	protein modifikasyonu	blastn 81.8	2e-16
8 LC7-SC7+	18S RNA	rRNA sentezi	blastn 478	3e-135
9 LC5+	18S RNA	rRNA sentezi	blastn 379	2e-105

Tablo 4.6.'da gösterilen 8 ve 9 numaralı dizilerin BLASTN analizlerinde oldukça yüksek benzerlikler gözlenmekle birlikte, bu diziler rRNA genleri olmaları nedeniyle değerlendirme dışı bırakıldı. Buna göre 1-7 no'lu diziler için elde edilen BLAST sonuçlarına göre, L-NAME uygulamasıyla kontrole göre anlatımı baskılanırken SNP uygulaması ile artış gösteren cDNA'ların 8 adet olası gene (*ubp12*, SPBC17A3.09c, SPCC553.12c, *sid1*, *pek1*, *byr1*, *wis1* ve *ppk14*) karşılık geldiği belirlendi. Bu genlere ilişkin özellikler **Tablo 4.7.**'de özetlendi. Ayrıca, bu dizilere ait BLAST analizlerinden elde edilen ayrıntılı veriler (nükleotid dizileme sonuçları ve BLAST skorları vb.) **EK-1**'de verildi.

Tablo 4.7. BLAST analizi sonuçlarına göre seçilen genlerin adları ile ürünlerinin işlevleri.

Bant simgesi	Gen ve şifrelediği ürün	Ürününün işlevi
L5A-S5A+	<i>ubp12</i> ubikitin C-terminal hidrolaz (Zhou ve diğ., 2003)	Protein deubikitinasyonu (Zhou ve diğ., 2003)
L2C-S2C+ ve L1G-S1G+	SPBC17A3.09c lipoat-protein ligaz A (dizi homolojisi temeline dayalı tahmin) http://www.genedb.org/genedb/pombe/	Protein modifikasyonu http://www.genedb.org/genedb/pombe/
L5G-S5G+	SPCC553.12c Hipotetik protein http://www.genedb.org/genedb/pombe/	Mantarlarda korunmuş, işlevi bilinmiyor http://www.genedb.org/genedb/pombe/
L6A-S6A+ ve L2A-S2A+	<i>sid1</i> serin/treonin kinaz aktivitesi (Guertin ve diğ., 2000)	•Sitokinez, septum oluşumu (Balasubramanian ve diğ., 1998) •Spor oluşumu (Krapp diğ., 2006)
L6A-S6A+ ve L2A-S2A+	<i>pek1</i> MAPK sinyal yolu (Sugiura ve diğ., 1999)	•Hücre şekillenmesi (Aslett ve Wood, 2006) •Sitokinez, iyon dengesinin sağlanması, hücre bütünlüğünün korunması (Madrid ve diğ., 2006)
L6A-S6A+ ve L2A-S2A+	<i>byr1</i> MAPK sinyal yolu (Nadin-Davis ve Nasim, 1988)	Mayoz bölünme ve spor oluşumu (Nadin-Davis ve Nasim, 1990)
L6A-S6A+ ve L2A-S2A+	<i>wis1</i> MAPK sinyal yolu (Toda ve diğ., 1996)	Mitotik hücre çevrimin düzenlenmesi (Warbrick ve Fantes, 1991)
L6A-S6A+	<i>ppk14</i> * Serin/treonin protein kinaz, (dizi homolojisi temeline dayalı tahmin) http://www.genedb.org/genedb/pombe/	Sinyal iletimi ve feromon yanıtı (Aslett ve Wood, 2007)

* E değeri ve bit skoru bakımından seçim ölçütlerine uymamakla birlikte, sinyal iletimi ve feromon yanıtıyla ilişkili olduğundan, diğer genlere işlevsel yakınlığı açısından önemli olabileceği düşünülerek seçildi.

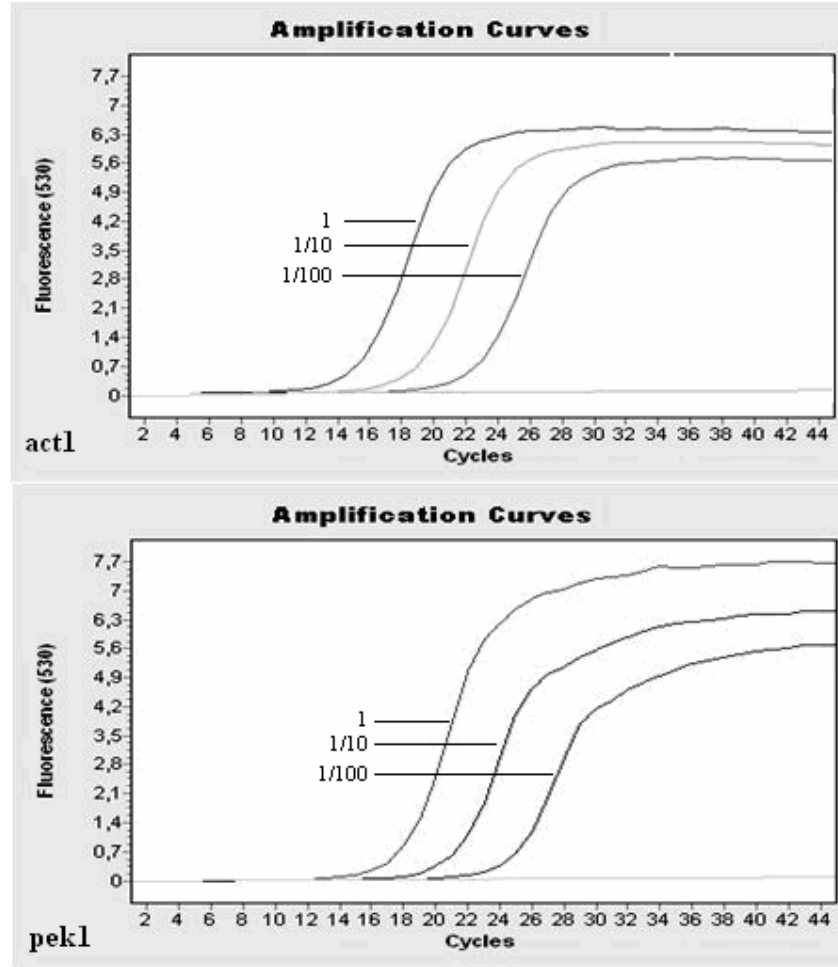
Tablo 4.6. ve 4.7.'de görüldüğü gibi BLAST analizleri sonucunda bazı dizilerin birden fazla gene anlamlı benzerlik gösterdiği (örneğin, “L6A- S6A+” dizisi), bazı genlerin de (örneğin, *pek1* geni) farklı primer kombinasyonları kullanılarak elde edilen cDNA'lara ilişkin farklı dizilerden saptanabildiği gözlemlendi.

4.6. GEN ANLATIMINDA SAPTANAN DEĞİŞİMLERİN GERÇEK ZAMANLI PZR İLE KONTROLÜ

Anlatımları L-NAME uygulamasıyla baskılanırken SNP uygulaması ile artış gösterdiği, DD tekniğiyle, belirlenen ve bazı özellikleri **Tablo 4.7.**'te verilen sekiz genin (*ubp12*, *SPBC17A3.09c*, *SPCC553.12c*, *sid1*, *pek1*, *byr1*, *wis1* ve *ppk14*) anlatım düzeylerindeki değişimlerin sınanması ve nicel olarak değerlendirilmesi, SYBR Green temeline dayalı GZ PZR yöntemiyle, göreceli anlatım düzeyleri karşılaştırılarak yapıldı.

Bu yöntemin uygulanmasında, reaksiyonların uygun biçimde gerçekleştiğinin belirlenmesi ve sonuçların güvenilirliğinin doğrulanması amacıyla **Bölüm 3.12.4.**'de açıklanan ölçütler dikkate alındı. Buna göre, elde edilen bulgular aşağıda verildi.

Referans gen olarak kullanılan aktin (*act1*) genine ve anlatımları karşılaştırılacak genlere ait primerlerin kontrol edilmesi, elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ve reaksiyon koşullarının optimize edilmesi amacıyla kullanılmak üzere K, L ve S koşullarından izole edilmiş cDNA moleküllerinin seri sulandırılmaları (1, 1/10 ve 1/100) hazırlandı. Bu sulandırımalarla gerçekleştirilen reaksiyonlarda, seriler arasında beklenildiği şekilde yaklaşık 3'er çevrimlik bir çoğalma farkı olduğu saptandı; örnek olarak *act1* ve *pek1* genlerine ait çoğalma eğrileri **Şekil 4.16.**'da verildi. Şekilde gösterilen grafikten ortalama Ct farkı *act1* geni için 3.3, *pek1* geni için 3.5 olarak saptandı. Kalıp içermeyen negatif kontrolda (NTC) herhangi bir ürünün oluşmadığı gözlemlendi.

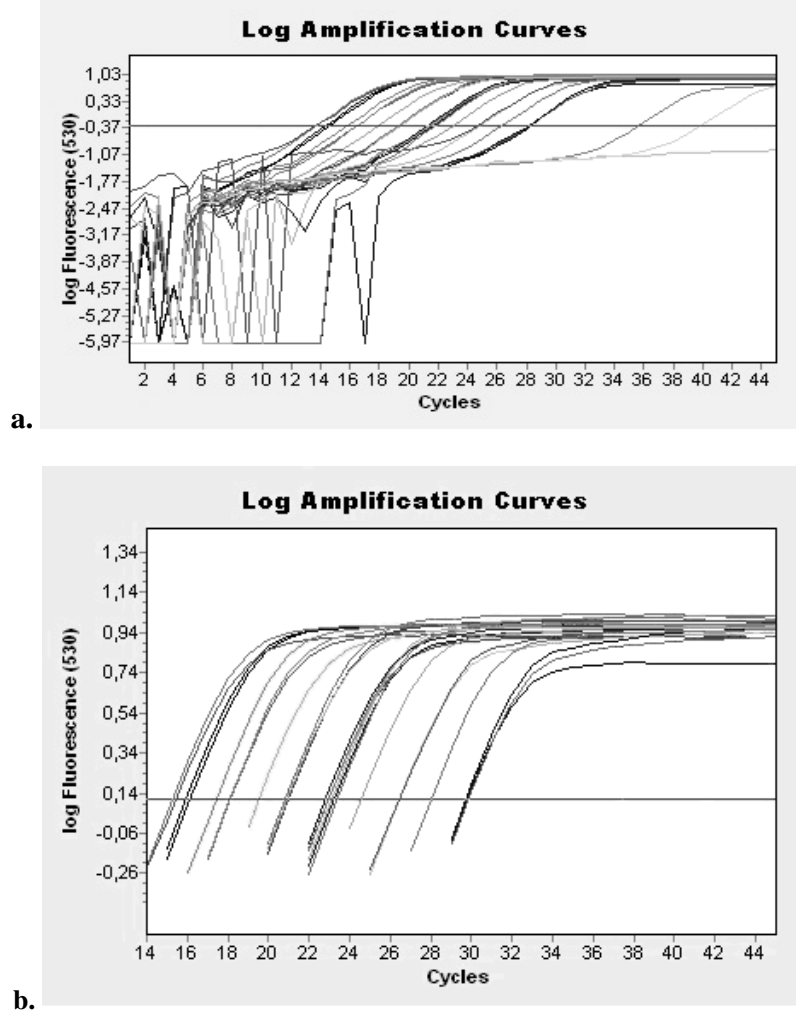


Şekil 4.16. Seri sulandırmalarda (1, 1/10, 1/100) *act1* ve *pek1* genleri için belirlenen Ct değerleri. Düz çizgi olarak gözlenen değerler kalıp içermeyen negatif kontrole (NTC) aittir.

Yapılan tüm PZR'lerin sorunsuz işlediğinin sınanması amacıyla seri sulandırmalar, her bir reaksiyon için yeniden hazırlanıp, çoğalmanın saptandığı çevrimler arasındaki farklar izlendiğinde Ct değerlerinin uygun aralıklarda olduğu belirlendi.

“Zemin gürültüsü” olarak adlandırılan arkaplan fluoresans ışımalarının şiddetine göre, reaksiyon serisindeki tüm genler için çevrimlerdeki çoğalmanın anlamlı kabul edileceği uygunluk noktası (“fit point”) “Light Cycler 2.0” (Roche) cihazına ait yazılım tarafından otomatik olarak saptandı. Zemin gürültüsü ve uygunluk noktasının belirlenmesine ilişkin örnek olarak, *act1* ve *pek1* genlerinin de bulunduğu bir reaksiyon serisi için elde edilen grafikler **Şekil 4.17.a-b'**de verildi. Kaydedilen zemin gürültülerinin şiddetine göre (**Şekil 4.17.a**), bu PZR serisi için çoğalmaların 14.

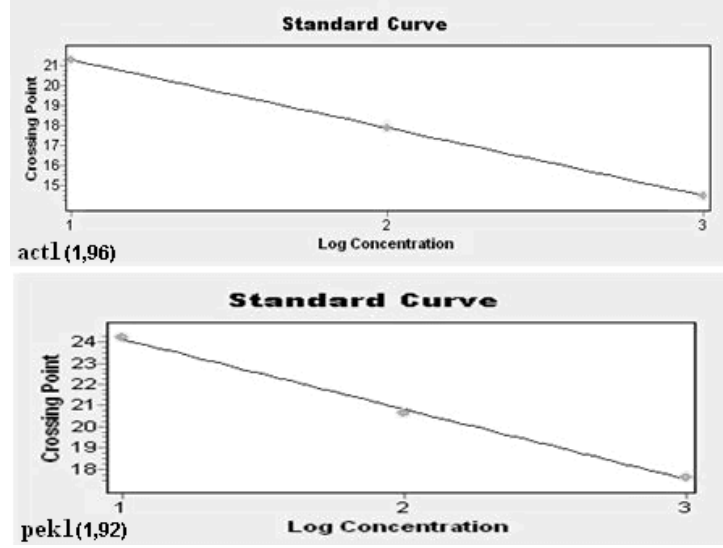
çevrimden sonra anlamlı kabul edilebileceği anlaşıldı ve NTC’de de herhangi bir ürünün oluşmadığı saptandı (Şekil 4.17.b).



Şekil 4.17. (a) *act1*, *pek1*, *wis1* ve *byr1* genlerini kapsayan bir PZR serisinde kaydedilen zemin gürültüleri, (b) çoğalmanın anlamlı kabul edileceği uygunluk noktası.

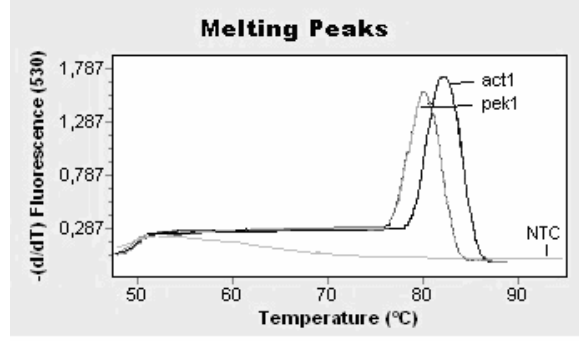
Buna göre, anlatım düzeyleri araştırılan sekiz genin (Tablo 4.7.) hepsi için her reaksiyonda yeniden hazırlanan seri sulandırımında (1, 1/10 ve 1/100), ölçülebilir çoğalmanın saptandığı çevrim sayılarına (eşik çevrim, “threshold cycle”, Ct) göre çizilen grafiklerle standart logaritmik artış eğrileri elde edildi. Bu eğrilerden, her bir reaksiyonun verimi (“efficiency”, E) cihaza ait yazılım tarafından otomatik olarak hesaplandı. Örnek olarak *act1* ve *pek1* genleri için elde edilen standart eğriler Şekil

4.18.(a-b)'de verildi. Teorik olarak 2 olması gereken E değerlerinin (Pfaffl, 2001) sekiz gen için gerçekleştirilen tüm reaksiyonlarda 1.87 - 2.03 aralığında olduğu belirlendi.



Şekil 4.18. *act1* ve *pek1* genleri için reaksiyon verimlerini gösteren standart eğriler.

Reaksiyonlarda meydana gelen çoğalmaların özgünlüğünün doğrulanmasındaki en önemli kontrol olan erime eğrileri, cihaza ait yazılım tarafından otomatik olarak çizildi. Tüm reaksiyonların sonunda erime eğrisi grafikleri incelendiğinde, fluoresans ışıma şiddetindeki artışların özgün olarak tek bir hedef DNA dizisinin çoğaltılmasından kaynaklandığı, herhangi bir kontaminasyon veya primerlerin yanlış bağlanmasından ileri gelen farklı çoğalmaların olmadığı saptandı. Örnek olarak, *act1* ve *pek1* reaksiyonları için elde edilen erime eğrisi grafiği **Şekil 4.19**'da verildi. Bu genler için gerçekleştirilen reaksiyonlarda birer tane net tepe noktasının elde edildiği ve NTC'de herhangi bir ürünün oluşmadığı saptandı.

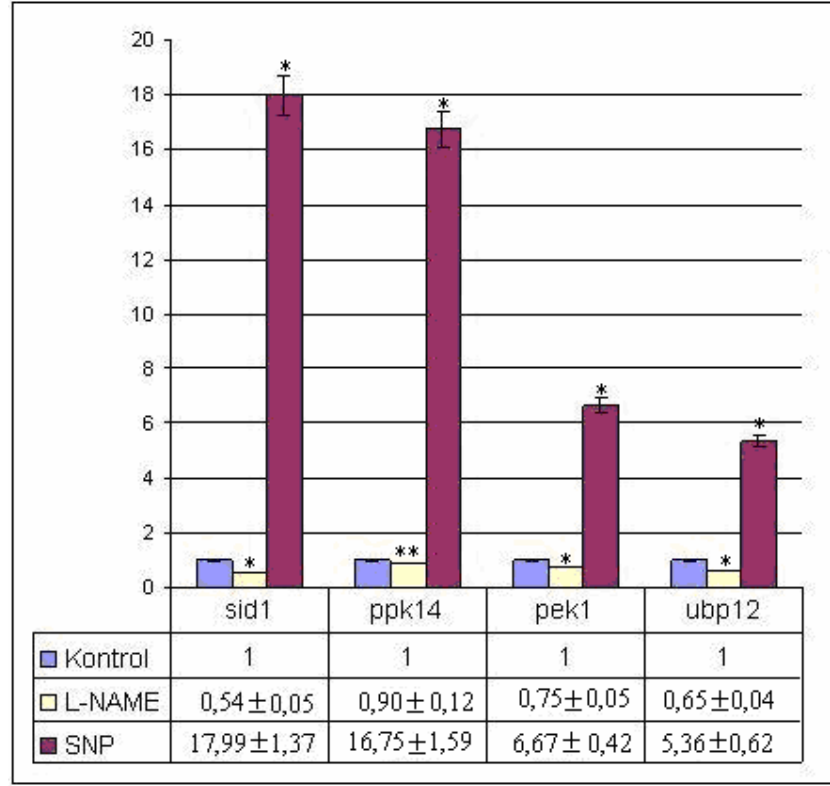


Şekil 4.19. *act1* ve *pek1* genleri için elde edilen erime eğrileri.

Buna göre, araştırılan genlerin anlatım düzeylerindeki göreceli değişimler, GZ PZR'nin verimine bağlı olarak farklı koşullarda (K, S ve L) elde edilen Ct değerlerinin, referans gen (*act1*) için aynı koşullarda saptanan değerlere oranlanması temeline dayalı PFAFFL formülüne (Bölüm 3.12.4.) göre hesaplandı. Tüm deneyler en az 3 tekrarlı olarak ve farklı zamanlarda hazırlanmış olan kalıp cDNA'lar kullanılarak yapıldı.

PFAFFL denkleminde göre yapılan hesaplamaların sonucunda, 8 genden PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1* ve *wis1* genleri için ilk iki GZ PZR tekrarında alınan sonuçların tutarlı olmadığı ve "L'de baskılanma / S koşulunda artış" şeklinde iki yönlü değişimlerin meydana gelmediği belirlendi. Buna göre, GZ PZR ile elde edilen bulguların poliakrilamid jellerde yapılan seçim ölçütlerine (K'ya göre S koşulunda artma L koşulunda azalma) uymaması nedeniyle, PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1* ve *wis1* genleriyle ilişkili anlatım değişiklikleri yanlış pozitif olarak kabul edildi. Bu nedenle, GZ PZR'lere ilişkin hesaplamalar ve ölçüm değerleri verilmeyen bu genler, çalışmanın sonraki aşamalarında değerlendirmeye alınmadı.

Anlatımları L-NAME uygulamasıyla baskılanırken SNP uygulaması ile artış gösterdiği DD tekniğiyle belirlenen *sid1*, *ppk14*, *pek1* ve *ubp12* genleri için farklı zamanlarda üç tekrarlı olarak yapılan GZ PZR uygulamalarında, bu genlerin anlatımlarında gözlenen değişimlerin poliakrilamid jellerde yapılan seçim ölçütlerine uyduğu belirlendi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.20.'de verildi.



Şekil 4.20. L-NAME ve SNP uygulamasıyla *sid1*, *ppk14*, *pek1* ve *ubp12* genlerinin anlatımlarında PFAFFL denkleminde hesaplanan değişimler. S.E.M. değerleri 3 tekrarlı ölçüm sonuçlarına aittir. t-testi ($P < 0.05$)*, ($P > 0.05$)**

Genlerin anlatım düzeylerindeki değişimlere ilişkin saptanan farkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı “GraphPad Prism 4” yazılımı kullanılarak uygulanan t-testi ile (Peirson ve diğ., 2003) analiz edildi. Yapılan hesaplamalar, *ppk14* geninin SNP etkisiyle anlatım düzeyinde artış olduğunu doğrulamakla birlikte, L-NAME içeren ortamda gözlenen anlatım düzeyindeki azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını ortaya koydu. Buna göre, çalışmanın sonraki aşamaları, tüm koşullarda anlamlı değişimlerin saptandığı *sid1*, *pek1* ve *ubp12* genleri ile sürdürüldü.

4.7. NO’NUN HÜCRE BÖLÜNMELERİ VE STRES YANITINDAKİ ETKİLERİ

S. pombe’de hücre içi NO düzeyindeki değişimlere bağlı olarak anlatımları değiştiği önce DD tekniği ile saptanan ve GZ PZR ile doğrulanan genlerden *sid1*’in ürünü olan Sid1 proteininin **Tablo 4.7**’de belirtildiği şekilde mitozda septum oluşumu için gerekli başlangıç sinyalinin oluşturulmasında (Balasubramanian ve diğ., 1998) ve sitokinezde

(Guertin ve diğ., 2000) rol oynadığı, ayrıca mayozda spor oluşumu için gerekli olan SIN (septum başlangıç ağı) yapısına da katıldığı (Krapp ve diğ., 2006) bilinmektedir.

S. pombe'de *pek1* geni tarafından şifrelenen ve MAPK sinyal yolunda rol oynadığı bilinen Pek1'in (Sugiura ve diğ., 1999), hücrenin şekillenmesi (Aslett ve Wood, 2006), hücre duvarının yapılması ve sitokinez (Madrid ve diğ., 2006) gibi süreçlerde rol oynadığı ortaya koyulmuştur (**Tablo 4.7.**).

S. pombe'de *ubp12* geninin ürünü olan ve bazı özellikleri **Tablo 4.7.**'de verilen Ubp12'nin ise ubiquitin C-terminal hidrolaz aktivitesi göstererek ubiquitinlerin proteinlerden çıkartılması (deubikitinasyon) işleminde rol oynadığına (Zhou ve diğ., 2003) ve *S. cerevisiae*'de apoptoz yolu ile deubikitinasyon süreci arasında bağlantı olabileceğine (Orlandi ve diğ., 2004) ilişkin bulgular ortaya koyulmuştur. Ayrıca Almeida ve diğ. (2007) *S. cerevisiae*'de apoptoz sinyalinin oluşması için NOS benzeri aktivitenin gerekli olduğunu göstermişlerdir.

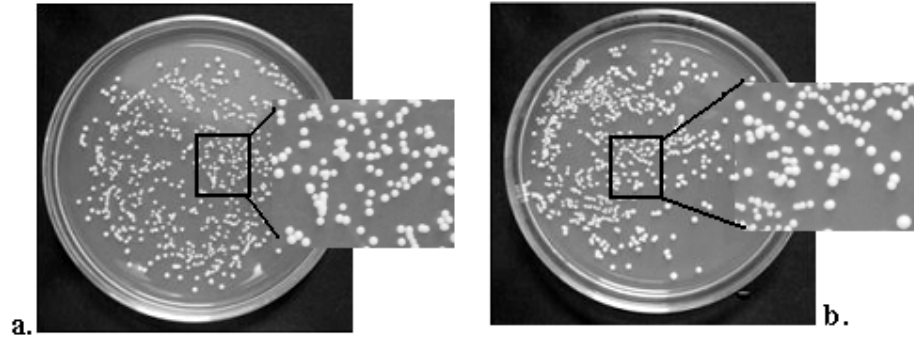
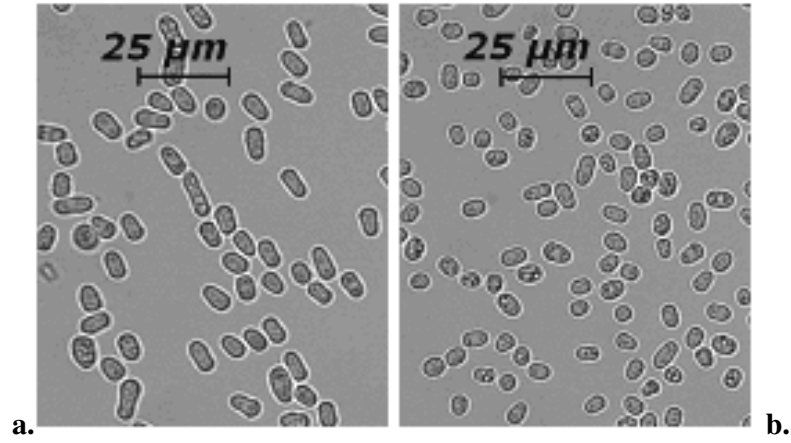
Buna göre, çalışmanın son aşamasında *sid1*, *pek1* ve *ubp12* genlerinin hücrelerdeki fizyolojik işlevlerinden yola çıkarak, NO'nun mitoz bölünme, mayoz bölünme ve spor oluşumu ile apoptoz süreçlerindeki olası etkileri morfolojik ve fizyolojik düzeydeki bazı deneylerle dolaylı olarak araştırıldı. Bu kapsamda yapılan deneylerde, hücre içi NO düzeyinin azaltılması amacıyla L-NAME (100mM) ve cGMP düzeyinin azaltılması amacıyla da metilen mavisi (0.1 mM) kullanıldı.

4.7.1. NO'nun Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

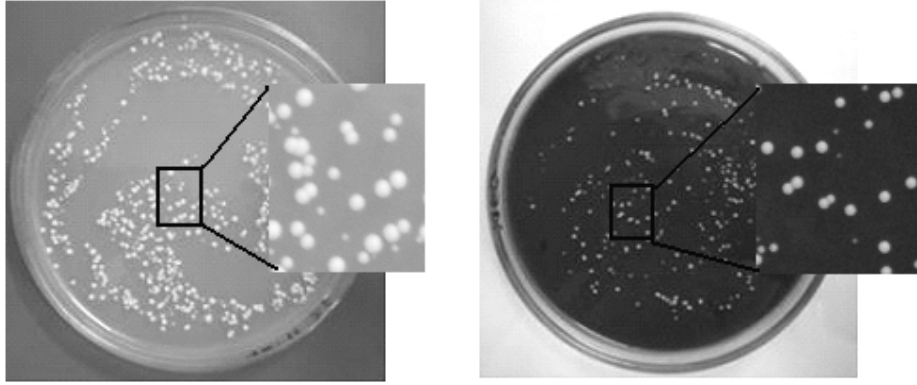
NO'nun mitoz bölünmede sinyal molekülü olarak etkili olup olamayacağı, L-NAME ile doğrudan NO düzeyinde ve metilen mavisi ile NO'ya bağlı sinyal iletiminde rol oynayan cGMP düzeyindeki azalmaların mitoz bölünme üzerinde morfolojik düzeydeki etkileri gözlemlenerek **Bölüm 3.7.1.**'de açıklandığı şekilde araştırıldı. Yapılan gözlemlerde, L-NAME uygulamasında koloni sayısı (**Tablo 4.8.**) ve morfolojisinde (**Şekil 4.21.**) kontrola göre önemli bir farklılık saptanmamakla birlikte mikroskobik incelemelerde L-NAME içeren ortamdaki hücrelerin kontrola göre daha küçük oldukları gözlemlendi (**Şekil 4.22.**).

Tablo 4.8. L-NAME ve metilen mavisi içeren petrilerdeki ortalama koloni sayıları

	Kontrol	L-NAME	Metilen mavisi
Ortalama koloni sayısı/petri	243±24	250±31	238±17

**Şekil 4.21.** (a) L-NAME içermeyen, (b) L-NAME içeren ortamlarda koloni morfolojileri**Şekil 4.22.** (a) L-NAME eklenmemiş, (b) L-NAME içeren ortamda üreyen hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri (büyütme 400X)

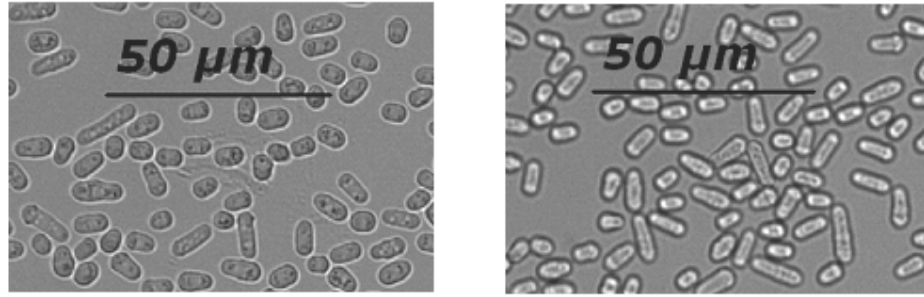
Metilen mavisi içeren ortamda koloni sayısında kontrole göre önemli bir farklılık bulunmadığı saptandı (**Tablo 4.8.**); ancak koloni boyutlarının daha küçük olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.23.**). Ek olarak mikroskopik gözlemlerde, metilen mavisi içeren ortamdaki hücrelerin boylarının genelde kontrole göre biraz daha uzun oldukları saptandı (**Şekil 4.24.**).



a.

b.

Şekil 4.23. (a) Metilen mavisi içermeyen, (b) metilen mavisi içeren petrilerde oluşan kolonilerin görüntüsü



a.

b.

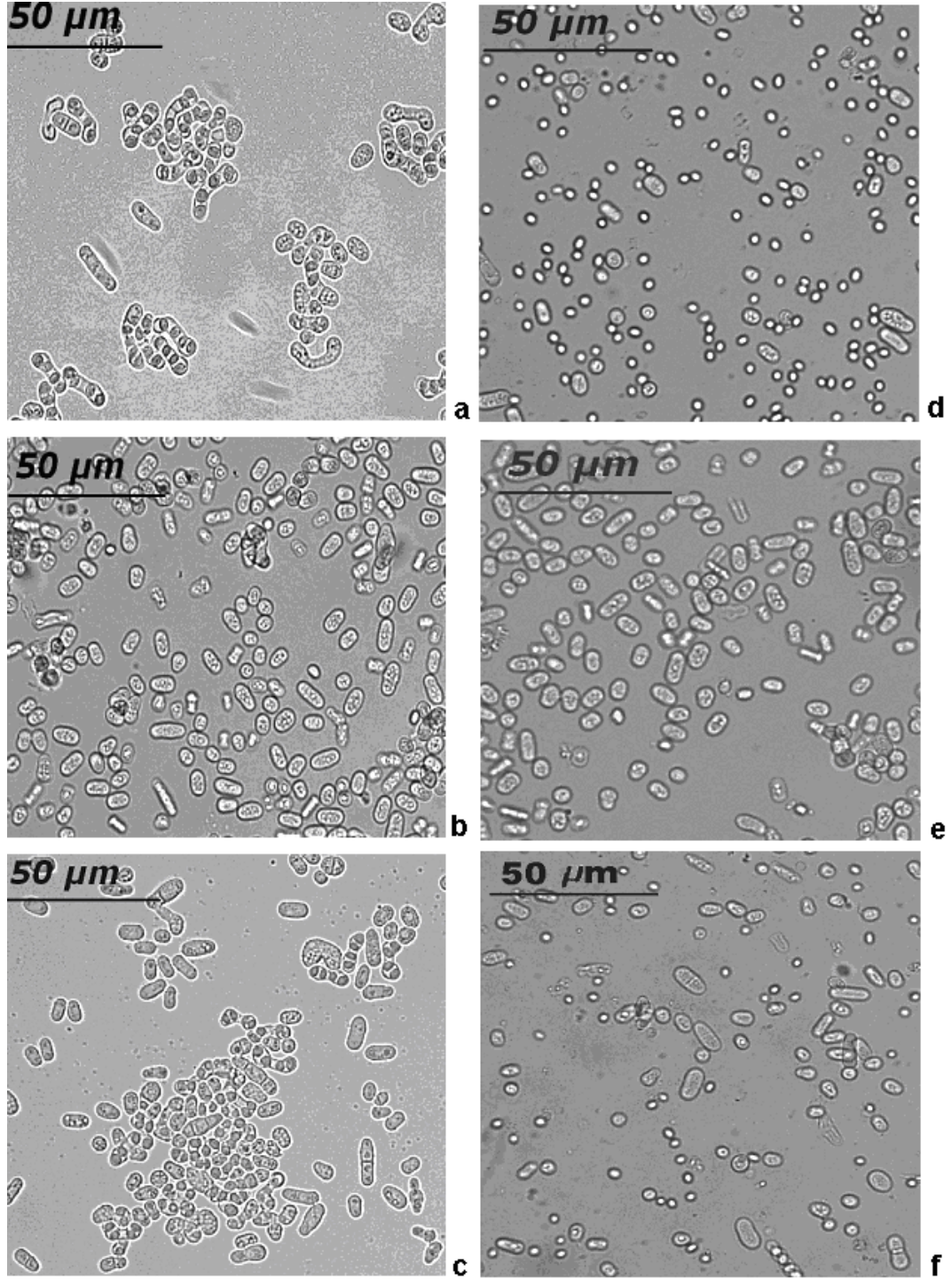
Şekil 4.24. (a) Metilen mavisi eklenmemiş, (b) metilen mavisi içeren ortamdaki hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüleri (büyütme 600X)

4.7.2. NO'nun Mayoz Bölünme ve Spor Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Hücre içi NO ve cGMP konsantrasyonundaki azalmanın mayoz bölünme ve spor oluşumu üzerinde morfolojik düzeydeki etkileri L-NAME ve metilen mavisi uygulamasıyla **Bölüm 3.7.2.**'de açıklandığı şekilde izlendi.

Farklı eşey tipindeki hücreler arasında yapılan ($972h^-$ X $975h^+$) çaprazlamalar sonucunda askusların oluşmaya başladığı 3. günde alınan örneklerde kontrolda bol miktarda askus bulunmasına karşılık, L-NAME içeren ortamda hemen hemen hiç askus oluşmadığı, metilen mavisi içeren ortamda ise, eşdeğer bir alanda, kontrole göre daha az sayıda askus bulunduğu gözlemlendi (**Şekil 4.25. a-c**).

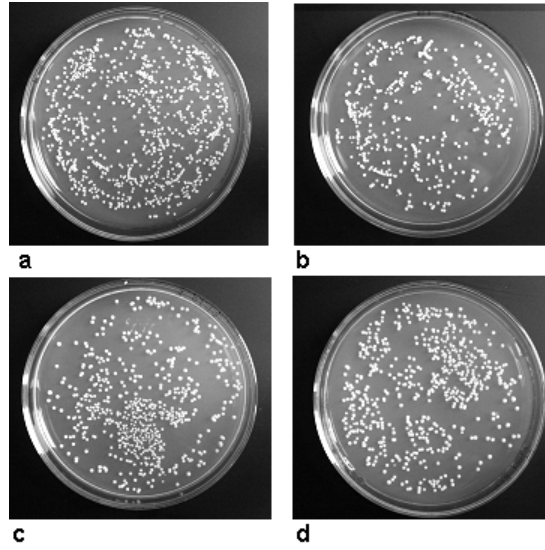
Askus çeperlerinin tamamen yok olduğu 12. günde alınan örneklerde kontrolda bol miktarda spor bulunduğu, L-NAME içeren ortamda hemen hiç askus ve dolayısıyla spor oluşmadığı ve metilen mavisi içeren ortamda ise, eşdeğer bir alanda, kontrole göre çok daha az sayıda spor ve sadece birkaç tane askus bulunduğu gözlemlendi (**Şekil 4.25. d-f**).



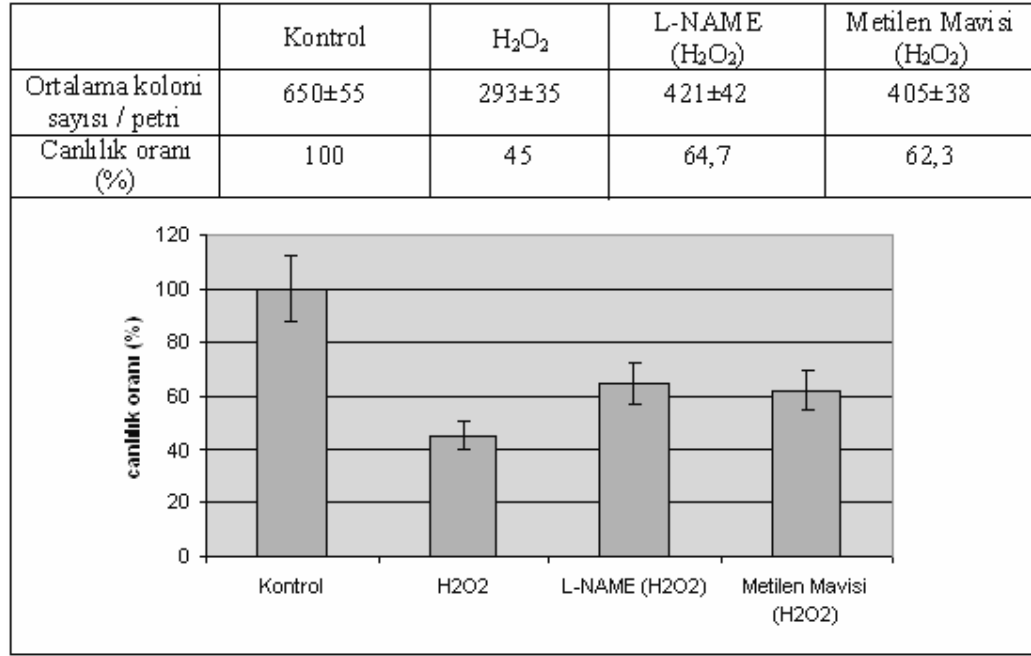
Şekil 4.25. Kontrol, L-NAME ve metilen mavisi içeren MEA'dan 3. ve 12. günlerde alınan örneklerin ışık mikroskopundaki görünüşleri (400X). (a) kontrol (3. gün), (b) L-NAME (3. gün), (c) metilen mavisi (3. gün), (d) kontrol (12. gün), (e) L-NAME (12. gün), (f) metilen mavisi (12. gün).

4.7.3 NO'nun Apoptozun Teşvik Edildiği Hücrelerdeki Etkileri

Oksidatif stres yaratılarak apoptozun teşvik edildiği hücrelerde, hücre içi NO ve cGMP düzeylerindeki azalmanın hücrelerin yaşam yetenekleri üzerindeki etkileri araştırıldı. Hücre içi NO düzeyinin azaltılması için L-NAME ve cGMP düzeyinin azaltılması için de metilen mavisinin kullanıldığı denemeler, **Bölüm 3.7.3.**'de açıklandığı şekilde gerçekleştirildi. L-NAME (100 mM) ve metilen mavisi (0.1 mM) etkisinde tutulan hücrelerde H₂O₂ uygulamasıyla (2 mM) yaratılan oksidatif stres koşullarında, hayatta kalma oranlarının L-NAME ve metilen mavisi uygulanmamış olanlara göre yaklaşık %20 oranında daha fazla olduğu gözlemlendi (**Şekil 4.26. a-d**) (**Şekil 4.27**).



Şekil 4.26. (a) H₂O₂ uygulanmamış, (b) H₂O₂ uygulanmış, (c) L-NAME etkisinde bırakıldıktan sonra H₂O₂ uygulanmış, (d) metilen mavisi etkisinde bırakıldıktan sonra H₂O₂ uygulanmış hücreler.



Şekil 4.27. H₂O₂ uygulamasıyla yaratılan oksidatif stres koşullarında L-NAME ve metilen mavisinin hücrelerin hayatta kalma oranlarına etkileri.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Biyolojik işlevleri ilk kez 1980’lerde ortaya koyulan (Angus ve Cocks, 1987, Groves ve Wang, 2000) NO’nun özellikle memelilerdeki işlevleri hakkında çok sayıda yayın bulunmaktadır. Bu organizma grubunda kan basıncının düzenlenmesi, nöronlardaki sinyal iletimi, bağışıklık sisteminin aktifleştirilmesi gibi birçok önemli işlevin yerine getirilmesinde sinyal molekülü olarak iş gören NO’nun (Tuteja ve diğ., 2004) hücre içi düzeyindeki anormal azalma veya artışların bazı metabolik olayları etkileyerek çeşitli hastalıklara yol açabildiği gösterilmiştir (Wimalawansa, 2008).

Prokaryotlardan gelişmiş yapıli ökaryotik organizmalara kadar çok çeşitli canlı türünde NO sentezini katalizleyen NOS enzimi izoformlarının ve/veya NOS’unkine benzer aktivite gösteren enzimlerin varlığı ortaya koyulmuştur (Gorren ve Mayer, 2007). Bununla birlikte, hücre moleküler biyolojisi bakımından ökaryotik uygun model sistemlerden olan *Schizosaccharomyces pombe* maya türünde NOS aktivitesinin var olup olmadığına ilişkin veri bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın ilk aşamasında *S. pombe* ham hücre özütlerinde NOS benzeri bir aktivitenin varlığı araştırıldı. NOS aktivitesinin araştırılmasında radyoaktivite uygulaması gerektirmeyen ve reaksiyon sonucu çıkan NO’nun doğrudan saptanmasına olanak veren, ilk kez Sutherland ve diğ. (2004) tarafından geliştirilerek kas hücre özütlerinde başarılı şekilde uygulanmış olan spektrofotometrik bir yöntem kullanıldı.

S. pombe ham hücre özütlerinde bağıl DAF2T-fluoresans şiddetinde zamana bağıli artışın gözlenmesi (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.3.**) NOS’unkine benzer aktiviteye sahip bir enzimin varlığını işaret etti. Bununla birlikte, hücrelerde enzimatik olmayan yollardan da NO çıkışı olabildiğinden (Cooney ve diğ., 1994, Stöhr ve Ulrich, 2002) hücre özütlerinde saptanan fluoresans şiddetindeki artışın NOS’a benzer bir aktiviteden kaynaklandığının doğrulanması amacıyla, NOS aktivitesi için en belirleyici kofaktörlerden olup reaksiyonun işlemesi için gerekli elektron transferinde rol oynayan Ca/CaM ve BH₄ (Alderton ve diğ., 2001) reaksiyon tamponundan çıkartılarak ölçümler yapıldığında değerlerin kontrole göre önemli derecede (~% 70) azaldığı gözlemlendi.

(**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.4.**). Bu bulgular, birim zamanda meydana gelen fluoresans miktarındaki artışın kofaktörlerin varlığıyla bağlantılı olduğunu ve bu nedenle büyük ölçüde NOS'unukine benzer bir aktiviteden kaynaklanabileceğini destekledi. Bununla birlikte, kofaktörlerin yokluğunda da yaklaşık % 30 oranında bir fluoresans artışının gözlenmiş olması (**Tablo 4.2.** ve **Şekil 4.4.**), *S. pombe*'de NO çıkışının büyük oranda enzimatik aktiviteyle ilişkili olmakla birlikte bazal düzeyde enzimatik olmayan yollardan da sağlanabileceği olasılığını düşündürdü.

Bunlara ek olarak, NOS substratıyla yarışması bakımından hücrelerdeki tüm NOS izoformları üzerinde engelliyici etki gösterebilen L-NAME'nin (Alderton ve diğ., 2001) 100 mM'lık konsantrasyonunun birim zamanda ölçülen NO çıkışı üzerinde yaklaşık % 60 oranında engelleyici etki gösterdiği saptandı. Bu özgün NOS engelleyicisi varlığında NO çıkışının yüksek oranda azalmış olması da *S. pombe* hücre özütlerinde NOS benzeri aktivitenin varlığını destekleyen kuvvetli bir kanıt oluşturdu. Elde edilen tüm bu bulgular doğrultusunda *S. pombe*'de NOS'unukine benzer aktivite gösteren bir enzimin varlığı ilk kez bu çalışmayla ortaya koyuldu.

Çalışmada kullanılan L-NAME'nin 100 mM'lık konsantrasyonunun NOS benzeri enzimin aktivitesi üzerinde yaklaşık % 60 oranında engelleyici etki gösterirken, 25-75 mM'lık konsantrasyonlarının engelleyici etkisinin yaklaşık % 20 oranında sınırlı kaldığı saptandı. *S. cerevisiae* ile yapılmış olan farklı çalışmalarda L-NAME'nin belirgin düzeydeki engelleyici etkisinin değişik konsantrasyonların kullanımıyla sağlandığı görülmektedir. Örneğin, Kanadia ve diğ. (1998) tarafından immunafinite kromatografisi ile kısmen saflaştırılmış *S. cerevisiae* hücre özütlerinde NOS aktivitesi varlığının ilk kez gösterildiği çalışmada, L-NAME'nin 20 mM'lık konsantrasyonunun NOS aktivitesi üzerinde yaklaşık % 63 oranında engelleyici etki gösterdiği belirtilmektedir. İki maya türünde saptanan L-NAME'nin engelleyici etkisine ilişkin konsantrasyon farklılığının, *S. pombe*'de protein saflaştırması yapılmayan özütlerin kullanılmasından ve elde edilen verilerin total NO çıkışının ölçülmesine dayanmasından kaynaklanmış olabileceği düşünüldü. Diğer taraftan, Almeida ve diğ. (2007) *S. cerevisiae* hücre süspansiyonlarında NO-seçici elektrod kullanarak yaptıkları çalışmada L-NAME'nin 200 mM'lık konsantrasyonunun NO çıkışı üzerinde yaklaşık

% 80 oranında engelleyici etki gösterdiğini saptamışlar ve L-NAME'nin böyle yüksek bir konsantrasyonda kullanılmasını mayanın kalın hücre çeperi ile ilişkilendirmişlerdir.

Ayrıca, bu çalışmada L-NAME'nin 100 mM'lık konsantrasyonunun *S. pombe* hücrelerinin yaşam yetenekleri üzerinde olumsuz etki göstermediği de saptandığından (**Şekil 4.1.** ve **Tablo 4.1.**), hücre içi NO konsantrasyonunun azaltılmasında bu doz kullanıldı.

Bir NO vericisi olan SNP'nin, NOS aktivitesine bağlı olmaksızın hücre içinde NO artışına yol açtığı bilinmektedir (Low, 2005). Çalışmada SNP'nin 1 mM'lık konsantrasyonun etkin bir NO artışı sağladığı besi ortamındaki NO₂ ölçümlerinden dolaylı olarak saptandı (**Tablo 4.3.** ve **Şekil 4.5.**). Domitrovic ve diğ. (2003)'nin benzer yöntem kullanarak *S. cerevisiae*'de yaptıkları çalışmada 0.5-2 mM konsantrasyon aralığındaki SNP'nin hücre içermeyen besi ortamında 30 dakikada, NO çıkışının göstergesi olarak yaklaşık 25-30 µM'lık nitrit birikimine neden olduğu, hücre süspansiyonlarında ise bu birikim değerine daha kısa sürede ulaşıldığı belirtilmektedir. Ek olarak, *S. cerevisiae* (Domitrovic ve diğ., 2003) ve *S. pombe*'de (Kim ve diğ., 2005) 1mM'dan daha yüksek konsantrasyonlardaki SNP uygulamasının hücre bölünmesi üzerinde belirgin bir durdurucu etki gösterdiği ortaya koyulmuştur. Buna göre, bu çalışmada denenen SNP'nin 1 mM'lık konsantrasyonun hücrelerin yaşam yetenekleri üzerinde olumsuz bir etkisi bulunmadığı saptandığından, hücre içi NO düzeyinin artırılması amacıyla bu konsantrasyonu uygulandı.

Hemen hepsi memelilerde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgulara göre, bir sinyal molekülü olarak NO'nun düzenleyici etkilerini farklı sinyal yolları aracılığıyla gösterebildiği (Hemish ve diğ., 2003, Cui ve diğ., 2005) ve transkripsiyon faktörleriyle olan etkileşimleri sonucunda da gen anlatımını doğrudan etkileyebildiği ortaya koyulmuştur (Bogdan, 2001, Pfeilschifter ve diğ., 2001, Cui ve diğ., 2005, Rabkin ve Klassen, 2007). Bunlara ek olarak son yıllardaki araştırma sonuçları, NO'nun programlı hücre ölümü (apoptoz) ve tümör oluşumuyla ilişkili süreçlerde de önemli düzenleyici roller üstlenebileceğini ortaya çıkarmıştır (Mocellin ve diğ., 2007, Coulter ve diğ., 2008). Ancak, bu çalışmalarda NO'nun apoptoz ve kanserleşme üzerinde hem teşvik edici hem de engelleyici yönde etki gösterebildiği şeklinde bulgular elde

edilmiştir (Mocellin ve diğ., 2007). Bu konuyla ilişkili olarak, NO'nun hangi yönde etkili olacağına konsantrasyonunun önemli olabileceği belirtilse (Leon ve diğ., 2008) de, elde edilen çelişkili veriler NO'nun bu süreçteki etkisinin çok karmaşık mekanizmaları kapsayabileceğine işaret etmektedir (Coulter ve diğ., 2008).

NO'nun çeşitli süreçleri etkileyebilmesi, bu molekülün hücrelerdeki işlevlerinin ve diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır (Coulter ve diğ., 2008). NO düzeyindeki dengesizliklere bağlı hastalıkların ve tümör oluşumundaki iki yönlü etkinin moleküler temellerinin araştırılmasında, buna bağlı olarak NO'ya dayalı yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesinde de, öncelikle bu molekülün sinyal yolları ve doğrudan gen anlatımı üzerindeki etkilerinin, diğer moleküllerle olan etkileşimlerinin ve bu süreçlerde rol oynayan kontrol mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi önem taşımaktadır. Bu bağlamda, hücrelerde NO'ya bağlı etkilerin araştırılması yönündeki çalışmalarda, gelişmiş yapıları organizmalardaki karmaşık moleküler ilişkilerin ve mekanizmaların aydınlatılmasında çok önemli katkılar sağlayan tek hücreli model organizmalar olarak mayalardan da yararlanılmaktadır. Örneğin, Almeida ve diğ. (2007) *Saccharomyces cerevisiae*'de NO'nun apoptoz sinyalinin oluşturulması için gerekli olduğunu göstermişlerdir. Ossorio ve diğ. (2007), insanlarda *cln3* genindeki mutasyona bağlı olarak ortaya çıkan bir nörodejenaratif hastalığın NO düzeyindeki değişimlerle olan ilişkisini araştırmak üzere bu geninin homologuna sahip olan *S. cerevisiae* hücrelerini model olarak kullanmışlardır.

Bu çalışmada, memeliler için uygun model sistem olarak kabul edilen, *S. pombe*'de hücre içi NO düzeyindeki değişimlere duyarlı genlerin belirlenmesi ve bu genlerin işlevlerinden yola çıkılarak, NO'nun hücrelerdeki bazı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak rol oynayıp oynamayacağı sorusuna yanıt aramak amacıyla, hücre içi NO konsantrasyonu L-NAME etkisiyle düşürüldüğünde anlatımları kontrole göre belirgin olarak azalırken (veya tamamen baskılanırken), SNP etkisiyle yükseltildiğinde anlatımları belirgin şekilde artan genler farklılık gösterimi tekniği kullanılarak araştırıldı.

Farklılık gösterimi tekniği, özellikle belli koşul altında anlatımları belirgin değişiklik gösteren anahtar genlerin saptanması ve işlevleri netleşmemiş olan hipotetik genlerin

araştırılmasında DNA çip teknolojisine alternatif olarak kullanılabilecek ekonomik ve kolay uygulanabilen yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Stein ve Liang, 2002). Son yıllarda bu tekniğin kullanıldığı çalışmalarda, duyarlılık ve güvenlik bakımından radyoaktif işaretlemeye en iyi alternatiflerden biri olarak, Ito ve Sakaki (1997) tarafından önerilen floresan işaretleme tercih edilmekle birlikte, gümüş nitrat (Kocik ve diğ., 1998) veya etidyum bromür (Boschi ve Vergara, 1998) ile boyama da yapılmaktadır. Jelden geri kazanım aşaması daha zor olmakla birlikte uygulamanın etidyum bromüre göre daha güvenli olması nedeniyle bu çalışmada gümüş nitrat ile boyanarak işaretleme yapıldı.

Hücrelerdeki mRNA moleküllerinin farklı alt gruplara ayrılması amacıyla birbirleriyle kombine olarak kullanılan tek baz değişkenli oligo d-T (5') ve rastgele primerlerin (3') seçilmesinde Tawe ve diğ. (1998)'nin yapmış olduğu çalışma dikkate alındı. Değişik araştırmalarda, yöntem daha uzun (yaklaşık 20 mer) veya daha kısa (yaklaşık 9 mer) rastgele primerlerin yanı sıra iki baz değişkenli oligo d-T primerlerle de uygulanabilmekle birlikte Tawe ve diğ. (1998)'nin kullandıkları, "Gene Hunter" firması tarafından geliştirilmiş olan, primerler (<http://genhunter.com/support/>) mRNA havuzunun en verimli şekilde gruplara ayrılmasını sağlayacak biçimde tasarlandığı için tercih edildi.

Farklılık gösterimi tekniğinin uygulanmasında, çalışmanın amacı doğrultusunda, poliakrilamid jellerde yoğunluğu L-NAME uygulamasıyla azalıp veya kaybolurken aynı anda SNP uygulamasıyla artan bantlardan ("L- S+") gidilerek, hücre içi NO düzeyindeki azalma ve artma şeklindeki iki yönlü değişimlere aynı anda yanıt veren (anlatımları bu değişimlere çok duyarlı olan) genlerin öncelikli olarak seçilmesi hedeflendi (**Bölüm 4.4.5**). Hücre içi NO düzeyindeki artma ve azalma biçimindeki değişimlerin bazı genlerin anlatımları üzerinde hem teşvik etme hem de baskılama yönünde çok belirgin etki gösterebilmesi, bu genlerin ilişkili oldukları fizyolojik süreçlerin de NO düzeyi değişimlerine duyarlı olduğunun, dolayısıyla NO'nun bu süreçlerde bir sinyal molekül olarak düzenleyici etki gösterebileceğinin işareti olarak değerlendirildi.

24 farklı primer kombinasyonunun kullanımıyla (3 oligo d-T ve 8 rastgele primer) 3 farklı koşul (kontrol, L-NAME ve SNP uygulamalı) için elde edilen 72 PZR ürününün elektroforezi sonucunda farklılık gösterdiği saptanan 49 adet banttaki cDNA molekülünün doğrudan dizilemesi yapıldı. Ancak, bunlardan 35'ine ait dizileme sonucu elde edilebildi; bunlar arasında da 27 tanesi BLAST analizi yapılabilecek kalitede oldu. BLAST analizine ilişkin elde edilen verilerden **Bölüm 3.11.**'de belirtilen ölçütlere (bit skoru ≥ 50 , E değeri $\leq 10^{-4}$) uyan 9 farklı dizi değerlendirilmeye alındı (**Tablo 4.5.** ve **Tablo 4.6.**). Dizileme işlemi uygulanan 49 DNA bandından ancak 9'u için anlamlı benzerliklerin elde edilmesi gibi düşük bir verimin jellerin boyanması, DNA'nın jelden geri kazanımı aşamalarındaki kayıplardan ve doğrudan dizilemenin yapılmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

DNA bantlarının gümüş nitrat ile boyanması sırasında poliakrilamid jellerin asit ve alkol uygulaması gibi çeşitli işlemlerden geçirilmesi ve poliakrilamid jellerden alınan örneklerin kontrol için agaroz jele yüklenmesi ve yeniden geri alınıp saflaştırılması gibi işlemler DNA moleküllerinin geri kazanımını diğer boyama yöntemlerine göre biraz daha zorlaştırarak dizileme aşamasında kullanılacak DNA konsantrasyonunun düşük olmasına neden olmaktadır. Bunlara ek olarak, *S. pombe*'nin genom dizisi bilindiğinden saptama sürecinin hızlandırılması amacıyla, ilgili literatür bilgisine (Buess ve diğ., 1997, Kamiya ve diğ., 2002, Stein ve Liang, 2002) dayanarak, poliakrilamid jellerden geri alınan bantların klonlanmadan doğrudan dizilenmesi tercih edildi. Ancak, poliakrilamid jellerde bazen tek bir bantta aynı ağırlıktaki birden fazla farklı DNA parçasının var olma olasılığı nedeniyle dizileme kalitesinin olumsuz yönde etkilenebileceği de belirtilmektedir (Vögeli-Lange ve diğ., 1996, Stein ve Liang 2002).

Dizi benzerliği analizlerinde temel olarak, farklılık gösterdiği saptanan bantlardaki DNA moleküllerinin *S. pombe*'nin hangi genlerine ait olabileceği araştırıldığından, BLASTN ve BLASTX analizleri doğrudan *S. pombe* gen ve protein veri tabanlarında (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yapıldı. Özellikle hataya eğilimli dizi bilgilerinin benzerlik analizinde, karşılaştırmaların kodonlar temel alınarak yapılması nedeniyle daha güvenilir sonuçlar verebilen BLASTX analizlerinin uygulanması önerilmektedir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Why.shtml>).

Benzerliklerin önem derecelerinin değerlendirilmesinde bit skoru ve E değerleri dikkate alındı. Pertsemlidis ve Fondon (2001) saptanan benzerliklerin istatistiksel açıdan ne derece önemli olduğunun değerlendirilmesinde E değerlerinin ölçüt alınmasını önermektedirler. Bu araştırmacılar, 5×10^{-2} den düşük E değerlerinin anlamlı kabul edilebileceğini belirtmekle birlikte, *S. pombe*'nin genom dizisinin bilinmesi ve çalışmada sadece bu organizmanın genomundaki benzerliklerin araştırılması nedeniyle, hem daha kontrollü bir taramanın yapılması hem de dizilemeye bağlı hataların benzerlik analizi üzerindeki olası etkilerinin azaltılması amacıyla daha belirleyici ölçüt olarak 10^{-4} 'ten küçük E değerine sahip olan benzerlikler (Warren ve Covert, 2004, Villarreal, ve diğ., 2005) önemli kabul edildi. Ayrıca E değerine ek olarak, Altschul ve diğ., (1997)'nin çalışmalarında kullandıkları ölçütler dikkate alınarak, bit skorları bakımından da 50 ve üstü değerde benzerlik gösteren sonuçlar anlamlı kabul edildi. Bu ölçütlere göre, BLAST analizleri sonucunda L-NAME uygulamasıyla anlatımları kontrole göre belirgin biçimde azalırken veya tamamen baskılanırken SNP uygulaması ile artış gösterdiği saptanan 7 adet olası gen (PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1*, *pek1*, *sid1*, *wis1* ve *ubp12*) seçildi. Bu genlerin işlevlerine ilişkin kaynaklar (Tablo 4.7.) genel olarak değerlendirildiğinde, MAPK ile ilişkili sinyal iletim yolları başta olmak üzere genelde hücre bölünmesi ve protein modifikasyonu gibi süreçlerde rol oynadıkları belirlendi. Bu nedenle, E değeri ve bit skoru bakımından kullanılan seçim ölçütlerini tam olarak karşılamamakla birlikte, *ppk14* geninin şifrelediği proteinin sinyal iletimi ile ilgili işlevleri göz önüne alınarak, çalışmanın amacı için önemli olabileceği düşünüldüğünden bu gen de değerlendirmeye alındı (Tablo 4.7.).

Bu genlerin L-NAME ve SNP varlığında anlatım profillerine ilişkin jellerde gözlenen değişimlerin doğruluğu gerçek zamanlı PZR (GZ PZR) uygulamasıyla kontrol edildi. Bu kapsamda, genlerin kontrol ve deney gruplarındaki göreceli anlatım düzeyleri, *act1* genine göre normalize edildikten sonra SYBR green temeline dayalı yöntemle kantitatif olarak karşılaştırıldı. Floresan özellikteki SYBR green, özgün olarak çift zincirli DNA moleküllerine bağlandığından, ardışık PZR çevrimleri sırasında çoğalan DNA miktarı ne kadar fazlaysa o kadar çok ürün birikmekte ve ölçülebilir düzeyde floresans ışıma o kadar erken saptanmaktadır (Karlen ve diğ., 2007). Ancak, SYBR green diziyeye özgün bağlanma göstermediğinden elde edilen sonuçların güvenilirliğinin doğrulanabilmesi için gerçekleştirilen reaksiyonların çeşitli açılardan kontrol edilmesi gerekmektedir.

Pfaffl (2001) zemin gürültüsü olarak da bilinen arka plan ışımlar çıkartıldıktan sonra algılanabilir düzeyde fluoresansa neden olan çoğalmanın başladığı çevrim (“threshold cycle”, Ct veya “crossing point”, CP) sayısının, özellikle genlerin farklı koşullardaki göreceli anlatım düzeylerinin karşılaştırılmasındaki önemine dikkat çekmektedir. Buna göre, optimizasyonu iyi yapılmış bir GZ PZR’de Ct değerlerinin yaklaşık 15-25 aralığında olması beklenmektedir (Karlen ve diğ., 2007).

Karlen ve diğ. (2007), GZ PZR’nin genel olarak işlerliğinin ve hedef DNA konsantrasyonundaki değişimleri saptayacak kadar duyarlı olup olmadığının sınanması amacıyla bir örneğe ait seri sulandırılmalardan elde edilen verilerin önemli olduğunu vurgulamaktadırlar. Bu bağlamda, kalıp olarak kullanılan ve hedef DNA’yı içeren bir örneğe ait 1, 1/10, ve 1/100’lük sulandırılar için optimum koşullarda yaklaşık 3’er çevrimlik CP farklarının bulunması gerekmektedir (Ponchel ve diğ., 2003). Ayrıca, teorik olarak DNA miktarının bir çevrimde iki katına çıkması gerektiğinden uygun koşullarda reaksiyon veriminin yaklaşık 2 olması beklenmektedir (Pfaffl, 2001). Bunlara ek olarak, GZ PZR’nin özgünlüğüne ilişkin en önemli ölçütün erime eğrisi grafikleri olduğunu belirten Valasek ve Repa (2005), özgün olmayan çoğalmalar ve/veya primer dimerlerinden kaynaklanan ışımların grafikte birden fazla tepe noktasına ve dalgalanmalara neden olabileceğine dikkat çekmektedirler.

Bu kapsamda, çalışmada **Bölüm 3.12.4.**’de açıklanan şekilde gerçekleştirilen GZ PZR uygulamalarından elde edilen sonuçlar yukarıda açıklanan ölçütler dikkate alınarak değerlendirildi. Buna göre, tüm reaksiyonlarda örneklerin seri sulandırılmasında yaklaşık 3’er çevrimlik Ct farklarının bulunduğu (**Şekil 4.16.**), anlamlı çoğalmaların yaklaşık 14. çevrimden sonra başladığı (**Şekil 4.17.b**), reaksiyon verimlerinin 1.87-2.03 aralığında olduğu (**Şekil 4.18.**), erime eğrisi grafiklerinden çoğalmaların özgün bölgelere ilişkin olduğu (**Şekil 4.19.**) ve kalıp içermeyen kontrolde artış bulunmadığı (**Şekil 4.16., 4.17.b ve 4.19.**) saptandıktan sonra genlerin anlatım profillerindeki değişimler test edildi.

Anlatımlarının NO düzeyindeki artma ve azalma biçimindeki değişimlerden etkilendiği düşünülerek seçilen genlerde gerçekleştirilen GZ PZR’den elde edilen verilere göre

yapılan hesaplamaların sonucunda, *sid1*, *pek1* ve *ubp12* genlerinin hücre içi NO değişimlerine duyarlı oldukları kantitatif olarak doğrulanırken (Şekil 4.20.), PBC17A3.09c, SPCC553.12c, *byr1* ve *wis1* genleriyle ilişkili anlatım değişiklikleri gözlemlerinin yanlış pozitif olduğu ortaya çıktı. Ayrıca, *ppk14* geninin anlatımının SNP varlığında önemli derecede artış gösterdiği doğrulanmakla birlikte (Şekil 4.20.), L-NAME uygulaması sonucundaki azalma gözlemi doğrulanamadı. Bu nedenle poliakrilamid jelde *ppk14* geni için belirlenen anlatım değişikliği de yanlış pozitif olarak değerlendirildi. Bununla birlikte, SNP uygulamasıyla *ppk14* geninin anlatım düzeyinin önemli derecede artış gösterdiğinin GZ PZR ile de doğrulanmış olması, bu genin nitrosatif ve oksidatif strese verilen yanıtındaki olası rolünün araştırılmasının önemli olabileceğini düşündürdü.

S. pombe'nin *sid1* geni Balasubramanian ve diğ. (1998) tarafından yapılan çalışmada izole edilen septum oluşumu kusurlu ("septum initiation defective", *sid*) mutantların analizi sonucunda tanımlanmıştır. Guertin ve diğ., (2000), bu genin ürünü olan Sid1 proteininin p21 ile aktiveşen kinazlar ("p21-activated kinases", PAK) sınıfı içerisine girdiğini ve serin/treonin kinaz aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Temel olarak mitoz bölünmede septum oluşumu için gerekli başlangıç sinyalinin oluşturulmasında (Balasubramanian ve diğ., 1998) ve sitokinezde (Guertin. ve diğ., 2000) rol oynadığı kanıtlanan Sid1 proteininin mayozda spor oluşumu için gerekli olan septum başlangıç ağı ("septation initiation network", SIN) yapısına da katıldığı (Krapp ve diğ., 2006) belirlenmiştir. Ayrıca, *S. pombe*'de tüm protein kinaz genlerini kapsayan sistematik delesyon çalışmasında *sid1* geninin delesyonunun öldürücü etkili olduğu gösterilmiştir (Bimbó ve diğ., 2005).

PAK grubu proteinlerin, memelilerde hücre iskeleti dinamiklerinin ve hücre çevriminin kontroluna ilişkin işlevlerinin (Bokoch, 2003) yanı sıra onkogenik sinyal yollarının düzenlenmesinde de rol oynayabildiği (Kumar ve diğ., 2006) gösterilmiştir. MAPK sinyal yollarının aktiveştirilmesinde de iş gören PAK'ların *S. cerevisiae*'de de hücre morfolojisinin korunması, transkripsiyon ve hücre çevriminin düzenlenmesiyle ilişkili bazı işlevlere de sahip olabileceği belirtilmektedir (Hoffman ve diğ., 2004).

Diğer taraftan, *Physarum polycephalum* (Werner-Felmayer ve diğ., 1994, Golderer ve diğ., 2001), *Neurospora crassa* (Ninnemann ve Maier, 1996), *Candida albicans* (Abaitua ve diğ., 1999), *Phycomyces blakesleeanus* (Maier ve Hecker, 2001) ve *Colletotrichum coccodes* (Wang ve Higgins, 2005) gibi bazı mantar türleri ile yapılan çalışmalarda NO'nun spor oluşumu ve vejetatif gelişim süreçlerinde sinyal molekülü olarak etkili olabileceği yönünde bulgular elde edilmiştir. Bu bağlamda anlatımı NO konsantrasyonundaki değişimlere duyarlı olduğu bu çalışmada saptanan *sid1* geninin ürünü olan Sid1 proteininin fizyolojik işlevleri dikkate alındığında, NO'nun hücre bölünmeleri (mitoz ve mayoz) ve spor oluşumu üzerinde etkili olabileceği düşünüldü. Bu varsayım doğrultusunda, NO'nun mitoz ve mayoz bölünme üzerinde fizyolojik ve morfolojik düzeydeki olası etkileri, NOS engelleyicisi olan L-NAME ile guanilil siklaz engelleyicisi olan metilen mavisini kullanarak, NO oluşumu ve/veya NO'ya bağlı cGMP sinyal yolunun engellendiği koşullarda dolaylı olarak araştırıldı.

L-NAME ile metilen mavisinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerinin farklı biçimde olduğu izlenimini veren bulgular elde edildi. L-NAME eklenmiş ortamlardaki koloni çaplarının kontrolden farklı olmamasına (**Şekil 4.21.a ve b**) karşılık metilen mavisini içeren ortamlardaki kolonilerin daha küçük oldukları belirlendi (**4.23.a ve b**). Mikroskopik incelemelerde de, L-NAME eklenmiş ortamlardaki kolonilere ait hücrelerin kontrole göre daha küçük (**Şekil 4.22.a ve b**), metilen mavisini içeren ortamdakilerin ise genelde kontrole göre biraz daha uzun oldukları gözlemlendi (**Şekil 4.24.a ve b**). Bu veriler L-NAME ve metilen mavisinin mitoz bölünmeyi etkilediğini göstermekle birlikte, L-NAME içeren ortamdaki hücrelerin yeterli hacme ulaşmadan (daha erken) bölündükleri, metilen mavisini içeren ortamdaki hücrelerin ise daha geç bölünüp tam septum oluşturamadıkları şeklinde değerlendirildi.

Hücrelerde L-NAME ve metilen mavisinden etkilenen yolların meydana getirdiği morfolojik ve fizyolojik etkiler benzer olmamakla birlikte, yapılan bu ön denemeler NO'nun sinyal molekülü olarak mitoz bölünme üzerinde etkili olabileceğine işaret etmektedir. L-NAME NO oluşumunu engellerken, guanilil siklaz engelleyicisi olan metilen mavisini NO sentezine etki etmeksizin sitoplazmik cGMP oluşumu üzerinde etki gösterdiğinden (Martin ve diğ., 1985), metilen mavisinin büyük ölçüde cGMP'ye bağımlı sinyal iletiminin engellenmesi ile ilişkili olması beklenebilir. Diğer taraftan,

özellikle hücre çevriminin kontroluyla ilişkili süreçlerde NO sinyalinin iletilmesinde cGMP'den bağımsız farklı sinyal yollarının da devreye girebildiği gösterildiğinden (Cui ve diğ., 2005), doğrudan NO'nun sentezini engelleyen L-NAME'nin mitoz bölünme üzerindeki etkisinin metilen mavisine göre daha farklı ve karmaşık bir süreci kapsayabileceği düşünülebilir.

Ayrıca, NO'nun *S. pombe*'de mayoz bölünme ve spor oluşumu üzerinde etkili olup olamayacağının araştırılması amacıyla yapılan genetik çaprazlamalarda, L-NAME bulunan ortamlarda spor oluşumunun neredeyse tamamen engellendiği, aynı şekilde metilen mavisini eklenmiş ortamlarda da spor oluşumunun belirgin bir şekilde azaldığı saptandı (**Şekil 4.25. a-f**).

Takeda ve diğ., (1989)'nin *S. pombe*'de yaptıkları bir çalışmada NOS'un önemli kofaktörlerinden olan CaM'in yapısında meydana getirilen amino asit değişiminin, spor oluşumunda kusurlara neden olduğunu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, NOS'un diğer bir önemli kofaktörü olan BH₄'ün rejenerasyonu için gerekli olan pterin 4-alfa-hidroksitetrahidrobiopterin dehidrataz (Thöny ve diğ., 2000) proteinini şifreleyen *omt2* geni bakımından delesyonlu *S. pombe* ırklarında da spor oluşumu sürecinde kusurların meydana geldiği saptanmıştır (Kakihara ve diğ., 2003). Ek olarak, Mata ve diğ. (2002), *S. pombe*'nin yabani ırkı ile eşey tipi ve besin koşullarından bağımsız şekilde mayoz geçirebilen *pat1* mutantlarında (Nurse, 1985) DNA çip teknolojisi kullanımıyla yaptıkları analizde, *sid1*, *omt2*, CaM'ı şifreleyen *cam1* ile BH₄ sentezi için gerekli olan GTP-siklo hidrolazları şifreleyen SPAC17A5.13, SPAP27G11.09c ve SPAC1002.19 genlerinin anlatım düzeylerinin mayoz sırasında, özellikle *pat1* mutantlarında, artış gösterdiğini ortaya koymuşlardır (**EK-2**). Bu verilerle birlikte çalışmada elde edilen dolaylı bulgular, çeşitli mantar türlerine benzer şekilde *S. pombe*'de de spor oluşumunun NOS aktivitesine bağlı ortaya çıkan NO ile ilişkili olabileceğini işaret etmektedir.

Çalışma kapsamında NO düzeyindeki değişimlere duyarlı olduğu doğrulanan bir diğer gen olan *pek1* tarafından şifrelenen Pek1 proteininin, *S. pombe*'de MAPK sinyal yolunda rol oynadığı ve “ya hep ya hiç” şeklinde verilen hücresel yanıtlarda iş görebileceği ortaya koyulmuştur (Sugiura ve diğ., 1999). Hücre dışı uyaranlara

(mitojenlere) yanıt olarak, genellikle stres koşullarında aktifleşen MAPK'lar gen anlatımının düzenlenmesi, hücre bölünmesi, farklılaşma ve apoptoz gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Pearson, 2001). Pek1 proteininin *S. pombe*'de hücrenin şekillenmesi (Aslett ve Wood, 2006), sitokinez, hücre duvarının yapımı ve iyon dengesinin sağlanması gibi hücre bütünlüğünün korunmasına (Madrid ve diğ., 2006) ilişkin süreçlerde de rol oynayabildiği gösterilmiştir. Bunlara ek olarak, *S. pombe*'de kinaz genleriyle ilişkili olarak yapılan sistematik delesyon çalışmalarında *pek1* mutantlarında vejetatif üreme kusurları ve morfolojik bozuklukların olduğu saptanmıştır (Bimbó ve diğ., 2005). Özellikle *pek1* mutantlarında gözlenen morfolojik bozukluklar dikkate alındığında, bu çalışmada L-NAME ve metilen mavisi eklenen ortamlarda hücrelerin boyutlarında gözlenen değişimlerin (Şekil 4.22.a-b ve 4.24.a-b) NO'nun MAPK sinyal yolundaki bazı bileşenler üzerindeki olası etkisiyle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Sugiura ve diğ. (2002) Pek1 proteininin memelilerde hücre çevrimi, farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik olayların düzenlenmesinde etkili olan ERK1/2 MAPK sinyal yolunun aktifleştirilmesinde iş gören bileşenlerden MEK1'e (Lu ve Xu, 2006) yapı ve işlev bakımından benzerlik gösterdiğini belirtmektedirler (**EK-3**). Diğer yandan, *pek1* geninin *S. cerevisiae*'deki homoloğu olan *bck1* geninde (Sugiura ve diğ., 2002) delesyon yapıldığında sıcaklığa duyarlı olarak otoliz kusurlu mutant fenotiplerin ortaya çıktığının gözlenmesi (Lee ve Levin, 1992) de bu genin hücre bütünlüğünün korunması için önemli olduğuna ilişkin bir kanıt oluşturmaktadır.

S. pombe'de *ubp12* geninin ürünü olan Ubp12'nin ise ubiquitin C-terminal hidrolaz aktivitesi göstererek ubiquitinlerin proteinlerden çıkartılması işleminde rol oynadığı gösterilmiştir (Zhou ve diğ., 2003). *S. cerevisiae*'de benzer aktivite gösteren *ubp10* genine ait mutant ırklarla yapılan bir çalışmada deubikitinasyon sürecinin, oksidatif stres ile aktifleşen apoptoz yolu ile ilişkili genlerin anlatımının transkripsiyon düzeyinde kontrollerinde rol oynayabildiği yönünde bulgular ortaya koyulmuştur (Orlandi ve diğ., 2004). Ek olarak memelilerde, deubikitinasyon enzimi olan UBP41'in proapoptotik aktivite göstererek apoptozla ilgili yollardaki bazı substratların stabilizasyonunu sağladığı belirtilmekte (Gewies ve Grimm, 2003) ve buradan hareketle deubikitanasyon sürecinin kanserleşme ile olan ilişkisine de dikkat çekilmektedir (Kim ve diğ., 2003).

S. cerevisiae ile yapılmış olan başka çalışmalarda ise H_2O_2 ile apoptozun teşvik edildiği hücrelerde NOS'a benzer bir enzim aktivitesine bağlı olarak NO üretildiği (Osorio ve diğ., 2007) ve NO'nun da hücrelerde apoptoz sinyali oluşturduğu gösterilmiştir (Almeida ve diğ., 2007). Ek olarak, Chung ve diğ. (1998), *Dictyostelium*'da MAPK sinyal yolu bileşenlerinin ubiquitinasyon ve deubikitinasyon süreçleriyle kontrol edilerek hücre çevrimi gibi süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çalışmada, NO'nun apoptozdaki olası rolünün sınanması amacıyla, H_2O_2 uygulamasıyla oksidatif stres yaratılarak apoptozun teşvik edildiği *S. pombe* hücrelerinde L-NAME ve metilen mavisinin yaşam yeteneği üzerindeki etkileri fizyolojik düzeyde araştırıldı. Hücreler, H_2O_2 uygulamasından önce L-NAME ve metilen mavisi etkisinde bırakıldığında hayatta kalma oranlarının bu engelleyicilerle ön uygulama yapılmamış olanlara göre yaklaşık % 20 oranında artış gösterdiği belirlendi (**Şekil 4.27.**). Bu gözlemler dolaylı olarak, NO'nun memelilerde (Gewies ve Grimm, 2003) ve *S. cerevisiae*'de (Almeida ve diğ., 2007) olduğu gibi *S. pombe*'de de apoptoz sinyalinin oluşturulması yönünde etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Bunlara ek olarak, çeşitli ökaryotik organizma gruplarında korunmuş olan ve hücrelerde apoptozla ilişkili hücresel yanıtların düzenlenmesinde rol oynayabileceği düşünülen “baculoviral apoptoz inhibitor” tekrar domenlerini (Uren ve diğ., 1998) içeren proteinlerden olan *S. pombe*'deki Pbh1'in özellikle mitozun düzenlenmesi ve sitokinezde rol oynadığı saptanmıştır (Rajagopalan ve Balasubramanian, 1999). *pbh1* geni tarafından şifrelenen bu proteinin anlatımının SNP ile yaratılan nitrosatif stres ve azot açlığı ile düzenlenebildiği gösterilmiştir (Cho ve diğ., 2006). Ayrıca, *pbh1* geninin anlatımının düzenlenmesinde rol oynayan (Kim ve diğ., 2006) ve hücresel stres yanıtının oluşması ile ilgili bir transkripsiyon faktörü olan Pap1 proteinini (Toone ve diğ., 1998) şifreleyen *pap1* geninin anlatımının da SNP ile oluşturulan nitrozatif stresle ve azot açlığı ile kontrol edilebildiği saptanmıştır (Kim ve diğ., 2008). Bu kaynaklarda, *S. pombe*'de apoptozda rol oynayabileceğine dikkat çekilen *pbh1* geninin ve düzenleyicisinin nitrozatif stresle olan ilişkileri bu çalışmanın kapsamında elde edilen morfolojik ve fizyolojik düzeydeki dolaylı bulgularla birlikte değerlendirildiğinde, NO molekülünün *S. pombe*'de hücre bölünmeleri, stres yanıtı ve apoptoz süreçleriyle ilişkili olabileceği yönündeki görüşü biraz daha güçlendirmektedir.

Diğer taraftan, bu çalışma farklı bir açıdan ele alındığında, mantarlarda şimdiye kadar guanilil siklaz geninin varlığının ortaya koyulmamış olması (Schaap, 2005) bu organizmalarda cGMP'ye bağımlı sinyal iletimi yolunun işlevsel olmayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, Kuo ve diğ. (1998) *S. cerevisiae*'de hücre çevriminin belli evrelerinde cGMP düzeylerinde değişimlerin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, Cytrynska ve diğ. (1999) *S. cerevisiae*'de ve Frajnt ve diğ. (2003) de diğer bir maya türü olan *Pichia pastoris*'de protein kinaz A yolunun cGMP ile de aktivelebildiğini ortaya koymuşlardır. Bu bağlamda, bu çalışma kapsamında yapılan morfolojik ve fizyolojik düzeydeki deneylerde bir guanilil siklaz engelleyicisi olan metilen mavisinin mitoz bölünme, spor oluşumu ve apoptoz gibi süreçlerde etkili olabileceğinin dolaylı biçimde gösterilmiş olması, *S. pombe*'de hücre içi NO düzeylerine bağlı olarak cGMP'nin bazı hücrel düzenleme süreçlerinde rol oynayabileceğine ilişkin ip uçlarını ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, *S. pombe* hücre özütlerinde NOS'unkine benzer bir aktivitenin varlığı ilk kez bu çalışmada gösterildi. Ayrıca, *ubp12*, *pek1* ve *sid1* genlerinin anlatımlarının hücre içi NO düzeyindeki artma ve azalma şeklindeki değişimlere çok duyarlı oldukları kantitatif olarak doğrulandı. Bu genlerin işlevlerinden yola çıkılarak yapılan morfolojik ve fizyolojik düzeydeki bazı denemelerin sonucunda NO'nun *S. pombe*'de mitoz bölünme, mayoz bölünme, spor oluşumu ve apoptoz gibi hücrel işlevlerin düzenlenmesinde rol oynama olasılığını destekleyen bulgular elde edildi. Ayrıca, *S. pombe*'de *pek1*'in MAPK'lardan Pek1 proteinini şifrelemesi ve *sid1*'in ise serin/treonin kinaz aktivitesi gösteren diğer bir sinyal iletim yolunda (PAK) rol oynaması da NO'nun genel olarak hücre bölünmeleri ve stres yanıtı ile ilişkili olarak gözlenen etkilerini bu sinyal yolları üzerinden gösterebilme olasılığının işareti olarak yorumlandı.

Memeli hücrelerindeki fizyolojik işlevlerine ilişkin çok sayıda yayın bulunmakla birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalardan çıkan sonuçlara göre, NO'nun farklı sinyal yollarını ve çok sayıdaki genin anlatımını etkileyebilmesi (Bogdan, 2001, Rabkin ve Klassen, 2007), önemli süreçlerdeki kilit proteinlerde yapısal değişimlere neden olarak işlevlerini değiştirebilmesi (Leon ve diğ., 2008), apoptoz ve tümör oluşumlarını

etkilemesi (Mocellin ve diğ., 2007, Coulter ve diğ., 2008) gibi özellikleri, bu molekülün etkilerinin oldukça karmaşık düzenlemeleri kapsayabileceğini işaret etmekte olup bu mekanizmaların moleküler düzeydeki meydana geliş biçimlerinin anlaşılmasını zorlaştırmaktadır.

Bu nedenlerle, bu çalışmada *S. pombe*'de anlatımları hücre içi NO düzeyindeki değişimlere duyarlı olduğu belirlenen genlerin memelilerde de benzer biyolojik süreçlerde rol oynamaları, bu mayanın NO'nun sinyal yollarının aktive edilmesi, gen anlatımının düzenlenmesi ve apoptoz gibi süreçlerdeki çok karmaşık etkilerinin araştırılmasına ilişkin yapılacak çalışmalarda da uygun bir model olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

Özellikle çalışmanın son kısmında yapılmış olan morfolojik ve fizyolojik düzeydeki bazı denemelerden elde edilen sonuçlar dikkate alındığında, NO'nun hücre bölünmeleri ve apoptoz üzerindeki etkilerine ilişkin daha somut verilerin ortaya koyulabilmesi amacıyla ek bazı deneylerin yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Örneğin, NOS benzeri aktivitenin oluşumundan sorumlu enzimin afinite kromatografisi gibi bir yöntemle izole edilerek amino asit dizisi belirlendikten sonra *S. pombe* genomunda hangi gen tarafından şifrelendiği saptanabilir. Bu aktiviteden sorumlu olan enzimi şifreleyen gen bulunduğunda, söz konusu gen bakımından kusurlu *S. pombe* mutantlarıyla yapılacak çalışmalar, NO'nun *S. pombe* hücrelerindeki fizyolojik etkilerinin aydınlatılması yönünde güvenilir ve doğrudan katkılar sağlayabilir. Ayrıca senkronize edilmiş hücre kültürleri kullanılarak, apoptotik ve bölünme halindeki hücrelerde *in vivo* NO oluşumunun ve DNA miktar değişimi gibi bazı parametrelerin araştırılması da NO'nun hücre bölünmeleri ve apoptoz üzerindeki etkilerinin araştırılması yönünde doğrudan bir yaklaşım oluşturabilir. Ek olarak, DNA çip teknolojisi ve iki boyutlu jel elektroforezi gibi yöntemler kullanılarak NO oluşumu ve/veya NO sinyal iletiminin engellendiği durumlarda *S. pombe*'de transkriptom ve proteom düzeyinde meydana gelen değişimler daha kapsamlı bir şekilde de analiz edilebilir.

KAYNAKLAR

- ABBASZADEGAN, M.R., PAZOUKI, N., and SANKIAN, M., 2000, (<http://www.protocolonline.org/prot/Detailed/2826.html>) [Ziyaret tarihi: 22.09.2007].
- ABAITUA, F., REMENTERIA, A., SAN, M. R., EGUZKIZA, A., RODRIGUEZ, J.A., PONTÓN, J. and SEVILLA, M.J., 1999, *In vitro* survival and germination of *Candida albicans* in the presence of nitrogen compounds, *Microbiology*, 145 (7), 1641-1647.
- ADAK, S., AULAK, K.S. and STUEHR, D.J., 2002, Direct evidence for nitric oxide production by a nitric-oxide synthase-like protein from *Bacillus subtilis*, *J Biol Chem*, (277) 18, 16167-16171,
- ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., and KNOWLES, R.G., 2001, Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition, *Biochem J*, 357 (3), 593–615.
- ALEXANDER, P. and JOHN, W.F., 2001, Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy), *Genome Biol*, 2 (10),1-10
- ALMEIDA, B., BUTTNER, S., OHLMEIER, S., SILVA, A., MESQUITA, A., SAMPAIO-MARQUES, B., OSORIO, N.S., KOLLAU, A., MAYER, B., LEAO, C., LARANJINHA, J., RODRIGUES, F., MADEO, F. and LUDOVICO, P., 2007, NO-mediated apoptosis in yeast, *J Cell Sci*, 120 (18), 279-288.
- AL-SA'DONI, H. and FERRO, A., 2000, S-Nitrosothiols: A class of nitric oxide-donor drugs, *Clin Sci*, 98 (5), 507–520
- ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. and LIPMAN, D.J., 1990, Basic local alignment search tool, *J Mol Biol*, 215 (3), 403–410.
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. and LIPMAN D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res*, 17(25), 3389–3402,
- ANGUS, J.A. and COCKS, T.M., 1987, Vasodilatation and the discovery of endothelium-derived relaxing factor, *Med J Aust*, 146(5), 250-253.
- ARDA, N., TOPAL SARIKAYA, A., GEMICI, B., ULUSOY, S and TEMIZKAN G., 2000, A rapid technique for the determination of furfural in the fission yeast culture media, *J Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 14 (2) 41-43.
- ASLETT, M. and WOOD, V., 2006, Gene ontology annotation status of the fission yeast genome: Preliminary coverage approaches, *Yeast*, 23 (13), 913-919.

- BALASUBRAMANIAN, M. K., MCCOLLUM, D., CHANG, L., WONG, K.C., and NAQVI, N.I., 1998, Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants, *Genetics*, 149 (3), 1265-1275.
- BERKELS, R., PUROL-SCHNABEL, S. and ROESEN, R., 2001, A new method to measure nitrate/nitrite with a NO-sensitive electrode, *J Appl Physiol.*, 90 (1), 317-320.
- BIMBO, A., JIA, Y., POH, S.L., KARUTURI, R.K., DEN ELZEN, N, PENG X., ZHENG, L., O'CONNELL, M., LIU, E.T, BALASUBRAMANIAN, M.K. and LIU, J., 2005, Systematic deletion analysis of fission yeast protein kinases, *Eukaryot cell.*, 4 (4), 799-813.
- BLAISE, G.A., GAUVIN, D., GANGAL, M. and AUTHIER, S., 2005, Nitric oxide, cell signaling and cell death, *Toxicology.*, 208 (2), 177-192.
- BOGDAN, C., 2001, Nitric oxide and the regulation of gene expression, *Trends Cell Biol.*, 11 (2), 66-75.
- BOKOCH, G.M., 2003, Biology of the p21-activated kinases, *Annu Rev Biochem.*, (72), 743-781.
- BOOLELL, M., ALLEN, M.J., BALLARD, S.A., GEPI-ATTEE, S., MUIRHEAD, G.J., NAYLOR, A.M, OSTERLOH, I.H. and GINGELL, C., 1996, Sildenafil: An orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction, *Int J Impot Res.*, 8 (2), 47-52.
- BOSCHI, E. and VERGARA, M., 1998, A protocol for nonradioactive differential display tested on carrot auxin-resistant mutants, *Plant Mol Biol Reporter.*, 16, 1-8.
- BREDT, D.S. and SNYDER, S.H., 1990, Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 87 (2), 682-685.
- BUESS, M., MORONI, C. and HIRSCH, H.H., 1997, Direct identification of differentially expressed genes by cycle sequencing and cycle labelling using the differential display PCR primers, *Nucleic Acids Res.*, 25 (11), 2233-2235.
- CHEN, Y. and ROSAZZA, J.P.N., 1995, Purification and characterization of nitric oxide synthase (NOS_{Noc}) from a *Nocardia* species, *J Bacteriol.*, 177 (17), 5122-5128.
- CHO, N.C., KANG, H.J., LIM, H.W., KIM, B.C., PARK, E.H and LIM, C.J., 2006, Stress-dependent regulation of Pbh1, a BIR domain-containing protein, in the fission yeast, *Can J Microbiol.*, 52 (12), 1261-5.
- CHOI D, W., OH, H.Y., HONG, S.Y., HAN, J.W. and LEE, H.W., 2000, Identification and characterization of nitric oxide synthase in *Salmonella typhimurium*, *Arch Pharm Res.*, 23 (4), 407-412.

CHUNG, C.Y., REDDY, T.B., ZHOU, K. and FIRTEL, R.A., 1998, A novel, putative MEK kinase controls developmental timing and spatial patterning in *Dictyostelium* and is regulated by ubiquitin-mediated protein degradation, *Genes Dev.*, 12 (22), 3564-3578.

CONTESTABILE, A., 2008, Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells, *Prog Neurobiol.*, 84 (4), 317-28.

COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J. and FRANKE, A.A., 1994, Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids, *Environ Health Perspect.*, 102 (5), 460-462.

COULTER, J.A., MCCARTHY, H.O., XIANG, J., ROEDL, W., WAGNER, E., ROBSON, T. and HIRST, D.G., 2008, Nitric oxide- a novel therapeutic for cancer *Nitric Oxide*, (19) 2, 192-198

CUI, X., ZHANG, J., MA, P., MYERS, D.E., GOLDBERG, I.G., SITTLER, K.J., BARB, J.J., MUNSON, P.J., CINTRON, ADEL, P., MCCOY, J.P., WANG, S. and DANNER, R.L., 2005, cGMP-independent nitric oxide signaling and regulation of the cell cycle, *BMC Genomics*, 6 (151), 1-18.

CYTRYNSKA, M., WOJDA, I., FRAJNT, M., and JAKUBOWICZ, T., 1999, PKA from *Saccharomyces cerevisiae* can be activated by cyclic AMP and cyclic GMP, *Can J Microbiol.*, 45 (1), 31-37

DOMITROVIC, T., PALHANO, F.L., BARJA-FIDALGO, C., DEFREITAS, M., ORLANDO, M.T. and FERNANDES, P.M., 2003, Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure, *FEMS Yeast Res.*, 3 (4), 341-346

FOSTER, F.M., TRAER, C.J., ABRAHAM, S.M. and FRY, M.J., 2003, The phosphoinositide (PI) 3-kinase family, *J Cell Sci.*, 116 (15), 3037-3040.

FRAJNT, M., CYTRYNSKA, M. and JAKUBOWICZ, T., 2003, The effect of cAMP and cGMP on the activity and substrate specificity of protein kinase A from methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Acta Biochim Pol.*, 50 (4), 1111-1118.

FRIEBE, A. and KOESLING, D., 2003, Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase, *Circ. Res.*, 93 (2), 96-105

GARTHWAITE, J., SOUTHAM, E., BOULTON, C.L., NIELSEN, E.B., SCHMIDT, K. and MAYER, B., 1995, Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one, *Mol. Pharmacol.*, 48 (2), 184-188.

GEWIES, A. and GRIMM, S., 2003, UBP41 is a proapoptotic ubiquitin-specific protease, *Cancer Res.*, 63 (3), 682-688.

- GOLDERER, G., WERNER, E. R., LEITNER, S., GROBNER, P. and WERNER-FELMAYER, G., 2001, Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*, *Gen. Dev.*, 15 (10), 1299-1309.
- GORREN, A.C.F. and MAYER, B., 2007, Nitric-oxide synthase: A cytochrome P450 family foster child, *Biochim Biophys Acta.*, 1770 (3), 432–445
- GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P.L., WISHNOK, J.S. and TANNENBAUM, S.R., 1982, Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids, *Anal Biochem.*, 126 (1), 131-138.
- GROVES, J.T. and WANG, C.C., 2000, Nitric oxide synthase: Models and mechanisms, *Curr Opin Chem Biol.*, 4 (6), 687-695.
- GRUN, S., LINDERMAYR, C., SELL, S. and DURNER, J., 2006, Nitric oxide and gene regulation in plants, *J Exp Bot.*, 57 (3), 507-516.
- GUERTIN, D.A., L. CHANG, F. IRSHAD, GOULD, K.L. and MCCOLLUM D., 2000, The role of the sid1p kinase and cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast, *Embo J.*, 19 (8), 1803-1815.
- GUNEL, T., KUNTZ, M., ARDA, N., ERTURK, S. and TEMIZKAN G., 2006 Metabolic engineering for production of geranylgeranyl pyrophosphate synthase in non-carotenogenic yeast *Schizosaccharomyces pombe* . *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 20 (3), 76-82.
- GUTZ, H., HESLOT, H., LEUPOLD, U. and LOPRIENO, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, In: Handbook of genetics, pp. 395-446, (King R.C., Editor), *Plenum Press*, New York.
- GUTZ, H. and DOE, F.J., 1975, On homo- and heterothallism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mycologia*, 67 (4), 748-759.
- HANDY, D.E. and LOSCALZO, J., 2006, Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.*, 26 (6), 1207-1214
- HEMISH, J., NAKAYA, N., MITTAL, V. and ENIKOLOPOV, G., 2003, Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression, *J Biol Chem.*, 278 (43), 42321-9.
- HIGUCHI, R., DOLLINGER, G., WALSH, P.S. and GRIFFITH, R., 1992, Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences, *Biotechnology*, 10(4), 413–417.
- HOFMANN, C., SHEPELEV, M. and CHERNOFF, J., 2004, The genetics of Pak, *J Cell Sci.*, 117 (19), 4343-4354.

HONG, I., KIM, Y.K., CHOI, W.S., SEO, D.W., YOON, J.W., HAN, J.-W., LEE, H.Y and LEE, H.W., 2003, Purification and characterization of nitric oxide synthase from *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 222 (2), 177–182.

HORAN, S., BOURGES, I. and MEUNIER, B., 2006, Transcriptional response to nitrosative stress in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 23 (7), 519-535.

HUANG, S., KERSCHBAUM, H.H., ENGEL, E. and HERMANN, A., 1997, Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail *Helix pomatia*, *J Neurochem.*, 69 (6), 2516-2528.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E. and CHAUDHURI, G., 1987, Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 84 (24), 9265–9269.

ITO, T. and SAKAKI, Y., 1997, Fluorescent differential display. In: Methods in molecular biology: Differential display methods and protocols, pp. 37–44, (Liang P. and Pardee A. B., Editors), *Humana Press*, Totowa, New Jersey.

KAKIHARA, Y., K. NABESHIMA, A. HIRATA and NOJIMA, H., 2003, Overlapping *omt1*⁺ and *omt2*⁺ genes are required for spore wall maturation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genes Cells.*, 8 (6), 547-558.

KAMIYA, K., KIKKAWA, Y., ISHII, Y., KYUWA, S. and YOSHIKAWA, Y., 2002, Changes in mRNA expression in mouse postnatal cochlea by differential display method, *Exp. Anim.* 51 (5), 431-435.

KANADIA, R.N., KUO, W.N., MCNABB, M. and HWAY, A., 1998, Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Mol Biol Int.*, 45 (6), 1081-1087.

KANG, M.H., PARK, E.H. and LIM, C.J., 2007, Protective role and regulation of Rad9 from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *FEMS Microbiol Lett.*, 275 (2), 270-277.

KARAER, S., TOPAL SARIKAYA, A., ARDA, N. and TEMIZKAN G., 2006, The 3' terminal sequence of the inosine monophosphate dehydrogenase gene encodes an active domain in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (3), 551-557.

KARLEN, Y., MCNAIR, A., PERSEGUERS, S., MAZZA, C. and MERMOD, N., 2007, Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, 8 (131), 3-16.

KIG, C., TURKEL, S. and TEMIZKAN, G., 2005, Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (12), 2475-2478.

KIM, H.G., KIM, B. C., PARK, E. H., AHN, K. and LIM, C. J., 2004, Differential regulation of three genes encoding glutathione S-transferases in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Cells.*, 18 (3), 332– 339.

KIM, H.G., PARK, E.H., and LIM, C.J., 2005, The fission yeast gene encoding monothiol glutaredoxin 5 is regulated by nitrosative and osmotic stresses, *Mol Cells.*, 20 (1), 43-50.

KIM, H.J., JUNG, H.Y. and LIM, C.J., 2008, The *pap1(+)* gene of fission yeast is transcriptionally regulated by nitrosative and nutritional stress, *FEMS Microbiol Lett.*, 280 (2), 176-181.

KIM, J.H., PARK, K.C., CHUNG, S.S., BANG, O. and CHUNG, C.H., 2003, Deubiquitinating enzymes as cellular regulators, *J. Biochem.*, 134 (1), 9-18.

KIM, S.J., CHO, N.C., RYU, I.W., KIM, K., PARK, E.H. and LIM, C.J., 2006, Carbon source-dependent regulation of the *Schizosaccharomyces pombe pbh1* gene, *J Microbiol.*, 44 (6), 689-693.

KIM, S.J., PARK, E.H. and LIM, C.J., 2004, Stress-dependent regulation of the gene encoding gamma-glutamylcysteine synthetase from the fission yeast, *Mol Biol Rep.*, 31 (1), 23-30.

KNOWLES, R.G., PALACIOS, M., PALMER, R.M. and MONCADA, S., 1989, Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86 (13), 5159-5162 .

KOČIK, N., UNFRID, K., ESSER, P., KROTT, R., SCHRAERMAYER, U. and HEIANN, K., 1998, The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display, *Mol Biotechnol.*, 9 (1), 25-33.

KRAPP, A., COLLIN, P., COKOJA, A., DISCHINGER, S, CANO, E. and SIMANIS, V., 2006, The *Schizosaccharomyces pombe* septation initiation network (SIN) is required for spore formation in meiosis, *J Cell Sci.*, 119 (14), 2882-2891.

KRUMENACKER, J.S. and MURAD, F., 2006, NO-cGMP signaling in development and stem cells, *Mol Genet Metab.*, 87 (4), 311–314.

KUMAR, R., GURURAJ, A.E. and BARNES, C.J., 2006, p21-activated kinases in cancer, *Nat Rev Cancer.*, 6 (6), 459-471.

KUNIEDA, T., MINAMINO, T., MIURA, K., KATSUNO, T., TATENNO, K., MIYAUCHI, H., KANEKO, S., BRADFIELD, C.A., FITZGERALD, G.A. and KOMURO, I., 2008, Reduced nitric oxide causes age-associated impairment of circadian rhythmicity, *Circ Res.*, 102 (5), 607-614.

- KUO, W. N. , KANADIA, R. N. and MCNABB, M., 1998, Soluble guanylate cyclase in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem Mol Biol Int.*, 45 (1), 125-131.
- LEE, K.S. and LEVIN, D.E., 1992, Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog, *Mol Cell Biol.*, 12 (1), 172-182.
- LEON, L., JEANNIN, J-F. and BETTAIEB, A., 2008, Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): Implication in cancer cells apoptosis, *Nitric Oxide*, 19 (2), 77-83.
- LEUPOLD, U., 1950, Die vererbung von homothallie und heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*, *C R Lab Carsberg Sér Physiol.*, 24, 381-480.
- LIANG, P. and PARDEE, A.B., 1992, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction, *Science.*, 257 (5072), 967-971.
- LINDNER, P., 1893, *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer gahrungserreger, *Wochenschr Brauerei.*, 10, 1298-1300.
- LOW, S.Y., 2005, Application of pharmaceuticals to nitric oxide. *Mol Aspects Med.*, 26(1-2), 97-138.
- LU, Z. and XU, S., 2006, ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis, *IUBMB Life.*, 58 (11), 621-631.
- MADRID, M., SOTO, T., KHONG, H.K., FRANCO, A., VICENTE, J., PEREZ, P., GACTO, M. and CANSADO, J., 2006, Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Biol Chem.*, 281 (4), 2033-2043.
- MAIER, J. and HECKER, R., 2001, Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleeanus*, *Plant Physiol.*, 126 (3), 1323-1330.
- MANIATIS, T., FRITCH, E. F. and SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, NY.
- MARTIN, W., VILLANI, G.M., JOTHIANANDAN, D. and FURCHGOTT, R.F., 1985, Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta, *J Pharmacol Exp Ther.*, 232 (3), 708-716.
- MASAKI, E. and KONDO, I., 1999, Methylene blue, a soluble guanylyl cyclase inhibitor, reduces the sevoflurane minimum alveolar anesthetic concentration and decreases the brain cyclic guanosine monophosphate content in rats, *Anesth Analg.*, 89 (2), 484-489.

- MATA, J., LYNE, R., BURNS, G. and BAHLER, J., 2002, The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast, *Nature Genet.*, 32 (1), 143-147.
- MATHIEU-DAUDE, F., CHENG, R., WELSH, J. and McCLELLAND, M., 1996, Screening of differentially amplified cDNA products from RNA arbitrarily primed PCR fingerprints using single strand conformation polymorphism (SSCP) gels, *Nucleic Acids Res.*, 24 (8), 1504-1507.
- MOCELLIN, S., BRONTE, V. and NITTI, D., 2007, Nitric oxide, a double edged sword in cancer biology: Searching for therapeutic opportunities, *Medl Res Rev.*, 27 (3), 317-352.
- MULLER, U., 1997, The nitric oxide system in insects, *Prog. Neurobiol.*, 51(3), 363-381.
- MULLIS, K.B. and FALOONA, F.A., 1987, Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Methods Enzymol.*, 155, 335-350
- NADIN-DAVIS, S.A. and NASIM, A., 1988, A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the ras gene in fission yeast, *EMBO J.*, 7 (4), 985-993.
- NADIN-DAVIS, S.A. and NASIM, A., 1990, *Schizosaccharomyces pombe ras1* and *byr1* are functionally related genes of the ste family that affect starvation-induced transcription of mating-type genes, *Mol Cell Biol.*, 10 (2), 549-560.
- NAGASE, S., TAKEMURA, K., UEDA, A., HIRAYAMA, A., AOYAGI, K., KONDOH, M. and KOYAMA, A., 1997, A novel nonenzymatic pathway for the generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine, *Biochem Biophys Res Commun.*, 233 (1), 150-153.
- NASIM, A., YOUNG, P. and JOHNSON, F.B., 1989, Molecular Biology of the Fission Yeast, Academic Press Inc., ISBN: 0-12-514085-1 (33)
- NIELSEN, O. and EGEL, R., 1990, The Pat1 protein kinase controls transcription of the mating-type genes in fission yeast, *The EMBO Journal*, 9 (5), 1401-1406.
- NINNEMANN, H. and MAIER, J., 1996, Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*, *Photochem Photobiol.*, 64(2), 393-398.
- NURSE, P., 1985, Mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which alter the shift between cell proliferation and sporulation, *Mol. & Gen. Genet.*, 198, 497-502.
- ORALER, G., 1984, The genetic regulation of the biosynthesis of purine nucleotides in *Schizosaccharomyces pombe*, *İst. Üniv. Fen Fak. Mec. Seri B* 49, 25-43.

- ORALER, G., OLGUN, A. and KARAER, S., 1990, An addition to the chromosome map of *Schizosaccharomyces pombe*: the localization of *gua* genes. *Curr. Genetics.*, 17, 543-545.
- ORLANDI, I., BETTIGA, M., ALBERGHINA, L. and VAI, M., 2004, Transcriptional profiling of *ubp10* null mutant reveals altered subtelomeric gene expression and insurgence of oxidative stress response, *J Biol Chem.*, 279 (8), 6414-6425.
- OSORIO, N.S., CARVALHO, A., ALMEIDA, A.J., PADILLA-LOPEZ, S., LEAO, C., LARANJINHA, J., LUDOVICO, P., PEARCE, D.A. and RODRIGUES, F., 2007, Nitric oxide signaling is disrupted in the yeast model for batten disease, *Mol. Biol. Cell.*, 18 (7), 2755 – 2767.
- OSTERWALDER, A., 1924, *Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schweflige saure widerstandsfähige gärfefe, *Mitt Gebiete Lebensmittelunters Hyg.*, 15, 5–28.
- OSZAJCA, K., SZEMRAJ, J. and BARTKOWIAK, J., 2007, Regulation of gene expression by nitric oxide, *Postepy Biochem.*, 53 (3), 254-262.
- PADILLA, P.A., FUGE, E. K., CRAWFORD, M. E., ERRETT, A., and WERNER-WASHBURNE, M., 1998, The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in *Saccharomyces cerevisiae* respond to nutrient limitation, *J Bacteriol.*, 180 (21), 5718-5726.
- PALABIYIK, B., ESEN, A., ALBAYRAK, G. and TEMIZKAN, G., 2006 Expression of plant beta-glucosidase genes in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20 (3), 98-104.
- PALABIYIK, B., KARAER, S., ARDA, N., ERTURK TOKER, S., TEMIZKAN, G., KELLY, S. and TOPAL SARIKAYA, A., 2008, Expression of human cytochrome p450 3A4 gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biologia*, 63(3), 450-454.
- PALMIERI, M.C., SELL, S., HUANG, X., SCHERF, M., WERNER, T., DURNER, J. and LINDERMAYR, C., 2008, Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: A bioinformatics approach, *J Exp Bot.*, 59 (2), 177-186.
- PALUMBO, A., 2005, Nitric oxide in marine invertebrates: A comparative perspective, *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.*, 142 (2), 241-248.
- PARANI, M., RUDRABHATLA, S., MYERS, R., WEIRICH, H., SMITH, B. and GOLDMAN, S.L., 2004, Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*, *Plant Biotechnol J.*, 2 (4), 359-366.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., BEERS, G. T., XU, B.E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K. and COBB, M.H., 2001, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions, *Endocr. Rev.*, 22 (2), 153–183.

PEIRSON, S.N., BUTLER, J.N. and FOSTER, R.G., 2003, Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis, *Nucleic Acids Res.*, 31 (14), e73.

PEKMEZ, M., 2004, Oksidatif stres uygulanmış *Schizosaccharomyces pombe*'de moleküler çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

PEKMEZ, M., ARDA, N., HAMAD, I., KIG, C. and TEMIZKAN G., 2008, Hydrogen peroxide-induced oxidative damages in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biologia*, 63(2), 151-155.

PENG, Z.F., CHEN, M.J., YAP, Y.W., MANIKANDAN, J., MELENDEZ, A.J., CHOY, M.S., MOORE, P.K. and CHEUNG, N.S., 2008, Proteasome inhibition: An early or late event in nitric oxide-induced neuronal death?, *Nitric Oxide*, 18 (2), 136-145.

PERTSEMLIDIS, A. and FONDON, J.W., 2001, Having a BLAST with bioinformatics (and avoiding BLASTphemy), *Genome Biol.*, 2 (10), 1-10.

PFAFFL, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.*, 29 (9), e45.

PFEILSCHIFTER, J., EBERHARDT, W. and BECK, K.F., 2001, Regulation of gene expression by nitric oxide, *Pflugers Arch.*, 442 (4), 479-486.

PILZ, R.B. and CASTEEL, D.E., 2003, Regulation of gene expression by cyclic GMP, *Circ Res.*, 93 (11), 1034-1046.

PITT, C.W., VALENTE, L.P., RHODES, D. and SIMONSSON, T., 2008, Identification and characterization of an essential telomeric repeat binding factor in fission yeast, *J Biol Chem.*, 283 (5), 2693-2701.

POLLOCK, J.S., FORSTERMANN, U., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., SCHMIDT, H.H., NAKANE, M. and MURAD, F., 1991, Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 (23), 10480-10484.

POLVERARI, A., MOLESINI, B., PEZZOTTI, M., BUONAURO, R., MARTE, M. and DELLEDONNE, M., 2003, Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*, *Mol Plant Microbe Interact.*, 16 (12), 1094-1105.

PONCHEL, F., TOOMES, C., BRANSFIELD, K., LEONG, F. T., DOUGLAS, S.H., FIELD, S. L., BELL, S. M., COMBARET, V, PUISIEUX, A., MIGHELL, A..J., ROBINSON, P.A, INGLEHEARN, C. F., ISAACS, D and MARKHAM, A. F., 2003, Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions, *BMC Biotechnol.*, 3 (18), 1-13.

RABKIN, S.W. and KLASSEN, S.S., 2007, Nitric oxide differentially regulates the gene expression of caspase genes but not some autophagic genes, *Nitric Oxide*, 16 (3), 339-347.

RAJAGOPALAN, S. and BALASUBRAMANIAN, M.K., 1999, *S. pombe* Pbh1p: An inhibitor of apoptosis domain containing protein is essential for chromosome segregation, *FEBS Lett.*, 46 0(1), 187-190.

RAJEEVAN, M.S., RANAMUKHAARACHCHI, D.G., VERNON, S.D. and UNGER, E.R., 2001, Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies, *Methods*, 25 (4), 443-451.

REDIG, A.J. and PLATANIAS, L.C., 2007, The protein kinase C (PKC) family of proteins in cytokine signaling in hematopoiesis, *J Interferon Cytokine Res.*, 27 (8), 623-636.

RIO, L.A., CORPA, S F.J. and BARROSO, J.B., 2004, Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, *Phytochemistry.*, 65 (7), 783-792.

SAHOO, R., DUTTA, T., DAS, A., SINHA, R. S., SENGUPTA, R. and GHOSH, S., 2006, Effect of nitrosative stress on *Schizosaccharomyces pombe*: Inactivation of glutathione reductase by peroxynitrite, *Free Radic Biol Med.*, 40 (4), 625-631.

SCHAAP, P., 2005, Guanylyl cyclases across the tree of life, *Front Biosci.*, 10, 1485-1498.

SCHMIDT, M.W., HOUSEMAN, A., IVANOV, A.R. and WOLF, D.A., 2007, Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol Syst Biol.*, 3 (79), 1-12.

SCHOPFER, F.J., BAKER, P.R. and FREEMAN, B.A., 2003, NO-dependent protein nitration: A cell signaling event or an oxidative inflammatory response?, *Trends Biochem Sci.*, 28 (12), 646-654.

SHINYASHIKI, M., CHIANG, K.T., SWITZER, C.H., GRALLA, E.B., VALENTINE, J.S., THIELE, D.J. and FUKUTO, J.M., 2000, The interaction of nitric oxide (NO) with the yeast transcription factor Ace1: A model system for NO-protein thiol interactions with implications to metal metabolism, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 97 (6), 2491-2496.

STEIN, J. and LIANG, P., 2002, Differential display technology: A general guide, *Cell Mol Life Sci.*, 59 (8), 1235-1240.

STOHR, C. and ULLRICH, W.R., 2002, Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space, *J Exp Bot.*, 53 (379), 2293-303.

STUEHR, D.J., 1999, Mammalian nitric oxide synthases, *Biochim Biophys Acta.*, 1411 (2), 217-230.

SUGIURA, R., TODA, T., DHUT, S., SHUNTOH, H. and KUNO, T., 1999, The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch, *Nature.*, 399(6735), 479-483.

SUGIURA, R., SIO, S.O., SHUNTOH, H. and KUNO, T., 2002, Calcineurin phosphatase in signal transduction: Lessons from fission yeast, *Genes Cells.*, 7 (7), 619-627.

SUN, J., STEENBERGEN, C. and MURPHY, E., 2006, S-nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress, *Antioxid Redox Signal.*, 8 (10), 1693-1705.

SUTHERLAND, H., ZOLLE, O., KHUNDKAR, R., SIMPSON, A. W.M., JARVIS, J. C. and SALMONS, S., 2004, A nonradioactive assay for nitric oxide synthase activity in tissue extracts. In: Methods in molecular biology: Nitric oxide protocols, pp. 105-111, Second edition (Hassid. A. Editor), *Humana Press*, Totowa, New Jersey.

TAKEDA, T., IMAI, Y. and YAMAMOTO, M., 1989, Substitution at position 116 in *Schizosaccharomyces calmodulin* decreases its stability under nitrogen starvation and results in a sporulation-deficient phenotype, *Proc Nat acad Sci USA*, 86 (24), 9739-9741.

TARHAN, C., PEKMEZ, M., KARAER, S., ARDA, N. and SARIKAYA, A.T., 2007, The effect of superoxide dismutase deficiency on zinc toxicity in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Basic Microbiol.*, 47(6), 506-512.

TAWE, W.N., ESCHBACH, M.L., WALTER, R.D. and HENKLE-DUHRSEN, K., 1998, Identification of stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans* using RT-PCR differential display, *Nucleic Acids Res.*, 26 (7), 1621-1627.

THONY, B., AUERBACH, G., and BLAU, N., 2000, Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions, *Biochem J.*, 347 (1), 1-16.

TODA, T., NIWA, H., NEMOTO, T., DHUT, S., EDDISON, M., MATSUSAKA, T., YANAGIDA, M. and HIRATA, D., 1996, The fission yeast *sts5+* gene is required for maintenance of growth polarity and functionally interacts with protein kinase C and an osmosensing MAP-kinase pathway, *J Cell Sci.*, 109 (9), 2331-2342.

TOONE, W.M., KUGE, S., SAMUELS, M., MORGAN, B.A., TODA, T. and JONES, N., 1998, Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: Requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase, Sty1/Spc1, *Genes Dev.*, 12 (10), 1453–1463.

TOPAL SARIKAYA, A., AKMAN, G. and TEMIZKAN, G., 2006, Nickel resistance in fission yeast associated with the magnesium transport system. *Molecular Biotechnology*, 32 , 139-145.

TOPAL SARIKAYA, A., GUNEL, T., ARDA, N., SAN, T., ERCAN, F., AKMAN, G. and TEMIZKAN, G., 2001, Effects of nickel on growth and ultrastructure of *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 15 (1) 65-68.

TULLO, A. and SBISA, E., 2002, Molecular characterization of p53 mutations in primary and secondary liver tumors: Diagnostic and therapeutic perspectives, *Mol Biotechnol.*, 21(3), 265-278.

TUTEJA, N., CHANDRA, M., TUTEJA, R. and MISRA, M.K., 2004, Nitric oxide as a unique bioactive signaling messenger in physiology and pathophysiology, *J Biomed Biotechnol.*, (4), 227-237.

UREN, A.G., COULSON, E.J. and VAUX, D.L., 1998, Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts, *Trends Biochem. Sci.*, 23 (5), 159-162.

VALASEK, M. A. and REPA, J. J., 2005, The power of real-time PCR, *Advan Physiol Educ.*, 29 (3), 151-159.

VILLARREAL, D., NIRDÉ, P., HIDE, M., BARNABE, C. and TIBAYRENC, M., 2005, Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites, *Antimicrob Agents Chemother.*, (49) 7, 2701-2709.

VOGELI-LANGE, R., BURCKERT, N., BOLLER, T. and WIEMKEN, A., 1996, Rapid selection and classification of positive clones generated by mRNA differential display, *Nucleic Acids Res.*, 24 (7), 1385–1386.

WANG, J. and HIGGINS, V.J., 2005, Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*, *Fungal Genet Biol.*, 42 (4), 284-292.

WARBRICK, E. and FANTES, P.A., 1991, The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*, *EMBO J.*, 10 (13), 4291-4299.

- WARREN, J.M. and COVERT, S.F., 2004, Differential expression of pine and *Cronartium quercuum* f. sp. fusiforme genes in fusiform rust galls, *Appl Environ Microbiol.*, 70 (1), 441–451.
- WATERBORG, J.H., 2002, The lowry method for protein quantification. In: The protein protocols handbook pp. 7-10, Second edition (Walker J. M., Editor) *Humana Press*, New Jersey.
- WERNER-FELMAYER, G., GOLDERER, G., WERNER, E.R., GROBNER, P. and WACHTER, H., 1994, Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*, *Biochem J.*, 304 (1), 105-111.
- WIMALAWANSA, S.J., 2008, Nitric oxide: New evidence for novel therapeutic indications, *Expert Opin Pharmacother.*, 9 (11), 1935-1954.
- WITTEWER, C.T., HERRMANN, M.G., MOSS, A.A. and RASMUSSEN, R.P., 1997, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Biotechniques.*, 22 (1), 130–138.
- WOJTASZEK, P., 2000, Nitric oxide in plants, to NO or not to NO, *Phytochemistry.*, 54 (1), 1-4.
- WONG, M.L. and MEDRANO, J.F., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, *BioTechniques.*, 39 (1), 75-85.
- WOOD, V., GWILLIAM, R., RAJANDREAM, M.A. *et al.*, 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature.*, 415 (6874), 871-880.
- WRIGHT, B., LACCHINI, A.H., DAVIES, A.J. and WALKER, A.J., 2006, Regulation of nitric oxide production in snail (*Lymnaea stagnalis*) defence cells: A role for PKC and ERK signaling pathways, *Biol Cell.*, 98 (5), 265-278.
- XUE-FRANZEN, Y., KJÆRULFF, S., HOLMBERG, C., WRIGHT, A. and NIELSEN, O., 2006, Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast, *BMC Genomics.*, 7 (303), 1-18.
- YAMAMOTO, T. and BING, R.J., 2000, Nitric oxide donors, *P.S.E.B.M.*, 225 (3), 200-206.
- YANAGIDA, M., 2002, The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*, *Genome Biol.*, 3 (3), 1-4.
- ZHAO, Y. and LIEBERMAN, H.B., 1995, *Schizosaccharomyces pombe*: A model for molecular studies of eukaryotic genes, *DNA Cell Biol.*, 14 (5), 359-371.
- ZHOU, C., WEE, S., RHEE, E., NAUMANN, M., DUBIEL, W. and WOLF, D.A., 2003, Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p, *Mol Cell.*, 11 (4), 927-938.

ZHOU, J. and BRUNE, B., 2005, NO and transcriptional regulation: From signaling to death, *Toxicology.*, 208 (2), 223-233.

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) [Ziyaret tarihi: 16.04.2008].

(<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>) [Ziyaret tarihi: 11.06.2008].

(<http://genhunter.com/support/>), Resources and technical notes on differential display, [Ziyaret tarihi: 22.05.2007].

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Why.shtml>) [Ziyaret tarihi: 16.04.2008].

(<http://nobelprizes.com/nobel/medicine/>) [Ziyaret tarihi: 22.08.2008].

(http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/PCR/Real-Time_PCR/). [Ziyaret tarihi: 12.06.2007].

(<http://www.sgul.ac.uk/depts/immunology/~dash/no/synthesis.htm>) (*Phil Dash*) Reproductive and cardiovascular disease research group, [Ziyaret tarihi: 22.06.2007].

EKLER

EK-1. BLAST analizlerinde yüksek skor üreten sorgulamalara ilişkin dizi bilgileri

ve bazı skorlar için elde edilen sonuçlar

L5A – S5A+

50–750. nükleotidler

```
AGGTACCTTCTCTGAGTGCAACCTTAAAGCGGGTATGAGCCTCTACACGTGTGTTTTAGTCGCATGAACACCATCACA
GGCAATTCACCAAAATCTATCTCAAAGGCGGCGCATTATACAGGAAGATATTCGCATGTGGCTTTACAAGAGAGAGAT
GCTACCTAACTCTTCTGGATAATGAGGATCATCAATTGTATTATTTTACAATCACCACATGAACATCTCTGGTCATTG
AATTTCGTGACAAAGATATGAGATTGGTCTGACGATATGTCTTTTAGACCAAATAGTAATAAAATATATAGACACCAC
GTTCCACATGAAAAGGTAGCCACATGACCAAGCAATCACGGGAAACACATGCTTCATGAACCTCAAGCCATCGCTTGT
GTTAGTAACACACAGCCACTGACACACGCATATAATCTCACGGAGACAACCTTTATGAACCTCATCGCGACAAATCCCAT
TGGTATGAAGGGGCATATGGCTAAATGCTTTGGAGATTTACTGCATGAACCTTCGTCGCGGAACTCATATGAATGTTGC
CCCATTAAGCTACGGAGGACCATACCAGAATATGCTCTCAGCCTTATTGGGTTTCAACAACAGGACTCCCAATAACT
TCAGGCTTATCTCTAGGATGGTCATCATGAAGATCTTAATCGAGTCCCTTAACATCCTTATGTGTAACCTGTAAGAAC
```

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WHJP5WW01R

lcl|26389 (701 letters)

Query ID lcl|26389

Molecule type nucleic acid

Query Length 701

Database Name gp/4896.9517//4896_refp

Description Schizosaccharomyces pombe RefSeq protein [See details](#)

Program **BLASTX 2.2.18+** [Citation](#)

Sequences producing significant alignments:

(Bits) Value

```
ref|NP_588530.1| ubiquin C-termin Ubp12 [Schizo... 65.9 1e-12 U
G
ref|NP_587999.1| ubiquitin C-terminal Ubp1 [Schizos... 54.3 8e-09
ref|NP_588530.1| UG ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp12
[Schizosaccharomyces pombe
972h-]
Length=979
```

GENE ID: 2538990 ubp12 | ubiquitin C-terminal hydrolase Ubp12
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 65.9 bits (159), Expect(2) = 1e-12
Identities = 33/76 (43%), Positives = 46/76 (60%), Gaps = 0/76 (0%)

LC2-SC2+

CTAAACTCAGCAACATCAGTATCCATGTGCGATAACATCCTGATTTCCTACTGATTTTATAACCCGAACGACTAATTTT
CCTCTGGCTTTGAGCAAGTACAATAACATGTTCCCTGGGTGAGCCGAG

GENE ID: 2539766 SPBC17A3.09c | lipoate-protein ligase A (predicted)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 130 bits (70), Expect = 4e-31
Identities = 103/118 (87%), Gaps = 6/118 (5%)
Strand=Plus/Minus

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WJ0241Y01R

Program **BLASTX 2.2.18**

Query ID lc1116306

Molecule type nucleic acid

Query Length 126

ref NP_595591.1	lipoate-protein ligase A (predicted) [Schizo...	38.5	2e-04
-----------------	---	------	-------

ref|NP_595591.1| lipocate-protein ligase A (predicted)

[Schizosaccharomyces pombe

972h-]

Length=363

GENE ID: 2539766 SPBC17A3.09c | lipoate-protein ligase A (predicted)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 38.5 bits (88), Expect = 2e-04
Identities = 19/25 (76%), Positives = 21/25 (84%), Gaps = 0/25 (0%)
Frame = -1

Query 114 REHVIVLAQSQRKISRSGYKISRNQ 40
+ H IVLAQSQRKIS S YKISRN+

Sbjct 140 QRHDIVLAQSQRKISGSAYKISRNR 164

Description

LG5-SG5 +

60-160. nükleotidler

TGGAAGATGCTTATGCTCATTATTCTTGGCTTTATTGTGCGTATTGCGTGGTAACTATTGTCTCTGCTGATATAGCTT
GGAGAATATCTCTCTAATCTTTA

Description Schizosaccharomyces pombe **RefSeq RNA**Program **BLASTN** 2.2.18

ref NM_001022755.1	Schizsacc pombe conserved funga...	67.9	2e-12
--------------------	------------------------------------	------	-------

ref|NM_001022755.1|  Schizosaccharomyces pombe conserved fungal
protein (SPCC553.12c)
partial mRNA
Length=1566

GENE ID: 2539446 SPCC553.12c | conserved fungal protein
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 67.9 bits (34), Expect = 2e-12
Identities = 44/46 (95%), Gaps = 1/46 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query	1	TGGAAAGATGCTTATGCTCATTATTCTTGGCTTTATTGTCGTATTG	46
Sbjct	766	TGGAAAGATGCTTATGCTCATTATTCTTGG-TTTATTGTAGTATTG	810

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WJS72MX01RSchizosaccharomyces pombe **RefSeq protein**Program **BLASTX 2.2.18+**ref|NP_587762.2| conserved fungal protein [Schizosaccharomyce... 34.7 0.002

ref|NP_587762.2|  conserved fungal protein [Schizosaccharomyces pombe]
Length=521

GENE ID: 2539446 SPCC553.12c | conserved fungal protein
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 34.7 bits (78), Expect = 0.002
Identities = 17/33 (51%), Positives = 22/33 (66%), Gaps = 2/33 (6%)
Frame = +1

```
Query 1      WKDAYAHYSWLYCRIAW*llslli*lGEYLSNL 99
           WKDAYAHYSW      +      L+  +GEYL+NL
Sbjct 256    WKDAYAHYSWFI--VLLLVTLVYIVGEYLTNL 286
```

LA6-SA6 +**90-580. nukleotidler**

```
AGGCCTTGTACAACAAGCTGGAGGAGCTAGACCTTGATGAGCCGCTGCGAAAGCGTCCTTGAGGACTTTGTTACCCAG
AAGCAGAAGGTGAGGAGAACTGAAAGATGACGACTGTTGAGAAGATCAGTGCATCTGGGGGCTGGGAATGGTCCGTGT
GGAGCTCAAGGTCTCACAGAAGCCTTCAGGCCTGGACATGGTCAGAAAGCGGACTCGTCTGGAGATCAAAGCCTGAAT
CAGAAACCAGATCATAAGGGAGCTGTGCGTTCTGTCATGAGTGCAACTCTCCGTACATCGTGCCTTCTATGGTGCCTT
CTACAGCGATGGCGAGATCAATATCTGCATGGAGCACATGGATGGAGGTTCTCTGGATCAAGTCCTGAAGAATGCTGG
AAGAATGCCTGAACAAATTTTACGAAAAGATATCATTGCTGTAAACAAAAGACCTGACATATCTCAGGGACAAGCACAA
GATCATGCACATACATCTCAAGC
```

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WK3HD52014Description Schizosaccharomyces pombe **RefSeq protein**Program **BLASTX 2.2.18+**

```
ref|NP_595457.1| MAP kinase kinase Wis1 [Somyces ... 91.7 5e-20

ref|NP_593026.1| MAP kinase kinase Byr1 [Schsaes ... 88.6 4e-19

ref|NP_596795.1| MAP kinase kinase Pek1 [Schi... 66.6 2e-12

ref|NP_593564.1| PAK-related kinase Sid1 [Schizes... 59.3 3e-10
```

ref|NP_595457.1|  MAP kinase kinase Wis1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=605

GENE ID: 2541055 smf2 | MAP kinase kinase Wis1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 91.7 bits (226), Expect = 5e-20
 Identities = 50/118 (42%), Positives = 71/118 (60%), Gaps = 1/118 (0%)
 Frame = +2

Query 137
 GLGMVRVELKVSQKPSGLDMVRKTRLEIKA*IRNQIIRELCVLHECNSPYIVRFYGAFF 316
 G G V K +P+G+ M K RL ++ NQII EL +LH+ SPYIV
 FYGAF+
 Sbjct 327
 GKGNYGVVYKALHQPTGVTMALKEIRLSLEEATFNQIIMELDILHKAVSPYIVDFYGAFF 386

Query 317 SDGEINICMEHMDGGSLDQVLKNAGRMPEQILRKDIIAVTKDLTYLRDKHKIMHIHLK 490
 +G + ICME+MD GS+D+ L G E +L + AV + L L+++H I+H +K
 Sbjct 387 VEGSVFICMEYMDAGSMDK-LYAGGIKDEGLARTAYAVVQGLKTLKEEHNIHRDVK 443

>  [ref|NP_593026.1|](#) MAP kinase kinase Byr1 [Schizosaccharomyces pombe]
 Length=340

GENE ID: 2542137 byr1 | MAP kinase kinase Byr1
 [Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 88.6 bits (218), Expect = 4e-19
 Identities = 48/105 (45%), Positives = 64/105 (60%), Gaps = 0/105 (0%)
 Frame = +2

Query 176
 KPSGLDMVRKTRLEIKA*IRNQIIRELCVLHECNSPYIVRFYGAFFSDGEINICMEHMD 355
 K + M RK + + ++ QI+REL VLH C SPYIV FYGAF
 I++CME+MD
 Sbjct 84
 KHRNIFMARKTVYVGSDSKLQKQILRELGLVHHCRSPYIVGFYGAFFQYKNNISLCMEYMD 143

Query 356 GGSGLDQVLKNAGRMPEQILRKDIIAVTKDLTYLRDKHKIMHIHLK 490
 GSLD +L+ G +P IL K I ++ K L YL + I+H LK
 Sbjct 144 CGSLDAILREGGPIPLDILGKIINSMVKGLIYLYNVLHIIHRDLK 188

>  [ref|NP_596795.1|](#) MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
 [Schizosaccharomyces pombe 972h-]
 Length=363

GENE ID: 2540919 mkk1 | MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
 [Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 66.6 bits (161), Expect = 2e-12
 Identities = 38/92 (41%), Positives = 55/92 (59%), Gaps = 7/92 (7%)
 Frame = +2

Query 233 IRNQIIRELCVLHECNSPYIVRFYGAFFSDGE--INICMEHMDGGSLDQVLK---- 394
 NAGR 394

```

          ++ Q++REL +   C SPYIV++YGA Y++ E  +NI ME+   GSLD + K
GR
Sbjct  118
LQKQLLRELKINRSTSPYIVKYYGACYNNAECQLNIAEMEYCGAGSLDAIYKRVRSQGGR  177

Query  395  MPEQILRKDIIAVTKDLTYLRDKHKIMHIHLK  490
          E+ L K   V   L+YL D+ KI+H  +K
Sbjct  178  TGERPLGKIAFGVLSGLSYLHDR-KIIHRDIK  208

```

>  [ref|NP_593564.1|](#)  PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=471

GENE ID: 2542746 [sid1](#) | PAK-related kinase Sid1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 59.3 bits (142), Expect = 3e-10
Identities = 39/112 (34%), Positives = 58/112 (51%), Gaps = 1/112 (0%)
Frame = +2

```

Query  137
GLGMVRVELKVSQKPSGLDMVRKRTRLEIKA*IRNQIIRELCVLHECNSPYIVRFYGAFF  316
          G G   V K   + SG   + K+  LE           I +E+ +L  CNS  ++++YG
F
Sbjct  16
GSGSFGVVKARENVSVDIIAIKQIDLETGIDDITDIEQEVFMLSNCNSSNVIQYYGCFV  75

Query  317  SDGEINICMEHMDGGSLDQVLKNAGRMPEQILRKDIIAVTKDLTYLRDKHKI  472
          + I MEHMDGGS+  +LK  GR+ EQ++  + V   L YL  ++KI
Sbjct  76   DGYTLWILMEHMDGGSVSGLLK-MGRLEQVISIILREVLYGLNYLHGQNKI  126

```

LA2-SA2+

120-550. nukleotidler

```

GTAGCTTGAGCTTTAGTGAGCAACTGCAAAAGCTCCTTGAGATCTTTGCTTCCCGGAAGCAAAAGGGGTGAGACCTGA
ACGATGACGATGTTGAAAAGATCATTTGAGCTGGCGGCTTTTAAATGACGGTGTGTGTTCAATGTCTCTTAAGAGCCC
TTCAGGCCTGGTCATGGTCAGAAAGCTAATTCATCTGGAGATCATACCCGCGATCCGGAACCAAGATTATAAGGGAGCT
GCAGGTTCTGCATGAGTGCAACTCTCCGTACATCGTGGGCTTCTATGGTGCCTTCTACAGCGATGGCGAGATCAGTAT
CTGCATGGAGCACATGGATGGAGGTTCTCTGGATCAAGTCCTGAAGAAAGCTGGAAGAATTCCTGAACAAATTTAGG
AAAAGTTAGCATTGCTGTAATAAAAGGCCTGACATATCTGA

```

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WKGYAFA014

Schizosaccharomyces pombe RefSeq protein

Program **BLASTX 2.2.18+**

ref NP_593026.1 	MAP kinase kinase Byr1 [Schizosacc	101	3e-23	
				
ref NP_595457.1 	MAP kinase kinase Wis1 [Schizosa..	86.3	1e-18	
				
ref NP_596795.1 	MAP kinase kinase Pek1 () [Schi...	70.5	9e-14	
				

ref|NP_593564.1| PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces... 58.2 4e-10

ref|NP_593026.1|  MAP kinase kinase Byr1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=340

GENE ID: 2542137 byr1 | MAP kinase kinase Byr1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 101 bits (252), Expect = 3e-23
Identities = 49/98 (50%), Positives = 67/98 (68%), Gaps = 0/98 (0%)
Frame = +2

Query 137
SMSLKSPSGLVMVRKLIHLEIIPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGAFFYSYDGEISIC 316
++SL + M RK +++ ++ QI+REL VLH C SPYIVGFYGAFF
IS+C
Sbjct 79
AVSLVKHRNIFMARKTVYVGSDSKLQKQILRELGLVHHCRCSPYIVGFYGAFFQYKNNISLC 138

Query 317 MEHMDGGSLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
ME+MD GSLD +L++ G IP ILGK+ +++KGL YL
Sbjct 139 MEYMDCGSLDAILREGGPIPLDILGKIINSMVKGLIYL 176

>  ref|NP_595457.1|  MAP kinase kinase Wis1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=605

GENE ID: 2541055 smf2 | MAP kinase kinase Wis1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 86.3 bits (212), Expect = 1e-18
Identities = 45/96 (46%), Positives = 62/96 (64%), Gaps = 1/96 (1%)
Frame = +2

Query 143
SLKSPSGLVMVRKLIHLEIIPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGAFFYSYDGEISICME 322
+L P+G+ M K I L + A NQII EL +LH+ SPYIV FYGAFF+ +G +
ICME
Sbjct 337
ALHQPTGVTMALKEIRLSLEEATFNQIIMELDILHKAVSPYIVDFYGAFFVEGVSFICME 396

Query 323 HMDGGSLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
+MD GS+D+ L G E +L + + AV++GL L
Sbjct 397 YMDAGSMDK-LYAGGIKDEGLARTAYAVVQGLKTL 431

>  ref|NP_596795.1|  MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-]
Length=363

GENE ID: 2540919 mkk1 | MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 70.5 bits (171), Expect = 9e-14
Identities = 35/81 (43%), Positives = 54/81 (66%), Gaps = 6/81 (7%)
Frame = +2

Query 206 AIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGAIFYSDGE--ISICMEHMDGGS LDQVLKK----
AG 367

A++ Q++REL++ C SPYIV +YGA Y++ E ++I ME+ GSLD + K+
G

Sbjct 117
ALQKQLLRELKINRSCTSPYIVKYYGACYNNAECQLNIAMEYCGAGSLDAIYKRVR SQG 176

Query 368 RIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
R E+ LGK++ V+ GL+YL

Sbjct 177 RTGERPLGKIAFGVLSGLSYL 197

>  [ref|NP_593564.1|](#)  PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=471

GENE ID: 2542746 sid1 | PAK-related kinase Sid1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 58.2 bits (139), Expect = 4e-10
Identities = 35/91 (38%), Positives = 51/91 (56%), Gaps = 1/91 (1%)
Frame = +2

Query 158
SGLVMVRKLIHLEIIPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGAIFYSDGEISICMEHMDGG 337
SG ++ K I LE I +E+ +L CNS ++ +YG F + I
MEHMDGG
Sbjct 31
SGDIIAIKQIDLETGIDDITDIEQEVFMLSNCNSSNVIQYYGCFVDGYTLWILMEHMDGG 90

Query 338 SLDQVLKKAGRIPEQILGKVSIAVIKGLTYL 430
S+ +L K GR+ EQ++ + V+ GL YL
Sbjct 91 SVSGLL-KMGR LNEQVISIILREVLYGLNYL 120

LA6- SA6+

100-300. nukleotidler

ACTTTCTTCAGGACTTGATCCAGAGAACCTCCATCCATGTGCTCCATGCAGATACTGATCTCGCCATCGCTGTAGAAC
GCACCATAAAAGCCACGATGTACGGAGAGTTGCACTCATGCAGAACCTGCAGCTCCCTTATGATCTGGTTCGGGATT
GCGGGTTTGATCTCCAGATGAATTAGCTTTCTGGCCATGACCAGG

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WM3E3ZJ015

Description Schizosaccharomyces pombe RefSeq protein

Program BLASTX 2.2.18+

ref NP_593026.1 	MAP kinase kinase Byr1 [Schizosa...	79.3	8e-17
			
ref NP_595457.1 	MAP kinase kinase Wis1 [Schizosa...	73.9	4e-15
			
ref NP_596795.1 	MAP kinase kinase Pek1 [Schi...	56.2	8e-10
			

ref|NP_593564.1| PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces... 45.8 1e-06

 ref|NP_593026.1|  MAP kinase kinase Byr1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=340

GENE ID: 2542137 byr1 | MAP kinase kinase Byr1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 79.3 bits (194), Expect = 8e-17
Identities = 36/66 (54%), Positives = 48/66 (72%), Gaps = 0/66 (0%)
Frame = -2

Query 200
LVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGA FYSDGEISICMEHMDGGSL 21
+ MARK +++ ++ QI+REL VLH C SPYIVGFYGA FYSDGEISICMEHMDGGSL 21
GSL
Sbjct 88
IFMARKTVYVGSDSKLQKQILRELGV LHHCRSPYIVGFYGA FYQYKNNISLCMEYMDCGSL 147

Query 20 DQVLKK 3
D +L++
Sbjct 148 DAILRE 153

 ref|NP_595457.1|  MAP kinase kinase Wis1 [Schizosaccharomyces pombe]
Length=605

GENE ID: 2541055 smf2 | MAP kinase kinase Wis1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 73.9 bits (180), Expect = 4e-15
Identities = 34/63 (53%), Positives = 46/63 (73%), Gaps = 0/63 (0%)
Frame = -2

Query 200
LVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGA FYSDGEISICMEHMDGGSL 21
+ MA K I L ++ A NQII EL +LH+ SPYIV FYGA FYSDGEISICMEHMDGGSL 21
GS+
Sbjct 344
VTMALKEIRLSLEEATFNQIIMELDILHKAVSPYIVDFYGA FFVEGVSFICMEYMDAGSM 403

Query 20 DQV 12
D++
Sbjct 404 DKL 406

 ref|NP_596795.1|  MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-]
Length=363

GENE ID: 2540919 mkk1 | MAP kinase kinase Pek1 (PMID 10365961)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

Score = 56.2 bits (134), Expect = 8e-10
Identities = 26/68 (38%), Positives = 43/68 (63%), Gaps = 2/68 (2%)

```

Frame = -2

Query 200  LVMARKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGA FYSDGE--
ISICMEHMDGG 27
          ++ A K +          A++ Q++REL++  C SPYIV +YGA Y++ E  ++I ME+
G
Sbjct 103
MIFAMKTVLAAPNTALQKQLLRELKINRSCTSPYIVKYYGACYNNAECQLNIAMEYCGAG 162

Query 26  SLDQVLKK 3
          SLD + K+
Sbjct 163  SLDAIYKR 170

```

```

>  ref|NP\_593564.1|  PAK-related kinase Sid1 [Schizosaccharomyces
pombe]
Length=471

```

GENE ID: 2542746 sid1 | PAK-related kinase Sid1
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (Over 10 PubMed links)

Score = 45.8 bits (107), Expect = 1e-06
Identities = 25/64 (39%), Positives = 36/64 (56%), Gaps = 0/64 (0%)
Frame = -2

```

Query 197
VMAKLIHLEIKPAIRNQIIRELQVLHECNSPYIVGFYGA FYSDGEISICMEHMDGGSLD 18
          ++A K I LE          I +E+ +L  CNS  ++ +YG F          + I
MEHMDGGS+
Sbjct 34
IIAIKQIDLETGIDDITDIEQEVFMLSNCNSSNVIQYYGCFVDGYTLWILMEHMDGGSVS 93

Query 17  QVLK 6
          +LK
Sbjct 94  GLLK 97

```

LG1-SG1+

80-210. nukleotidler

ACATCGTATGATGGCGACAGCATCCGATGTCTCTGATTTTAGACCCCGAACGACTAATTTTCCTCTGGCTATTGAGCA
AGTACCATATCATGTTTCGCTGGGTGAGCCGTGCGTGAACACCCAGGTGGTCAA

NCBI/ BLAST/ Formatting Results - 7WMAXYUD015

Description Schizosaccharomyces pombe [RefSeq RNA](#) [See details](#)

Program **BLASTN 2.2.18+**

[ref|NM_001021487.1|](#) Schizosaccharomyces pombe lipoate-protein... **81.8** 2e-16

[ref|NM_001021487.1|](#)  Schizosaccharomyces pombe lipoate-protein
ligase A (predicted)
(SPBC17A3.09c) partial mRNA

Length=1092

GENE ID: 2539766 SPBC17A3.09c | lipoate-protein ligase A (predicted)
[Schizosaccharomyces pombe 972h-] (10 or fewer PubMed links)

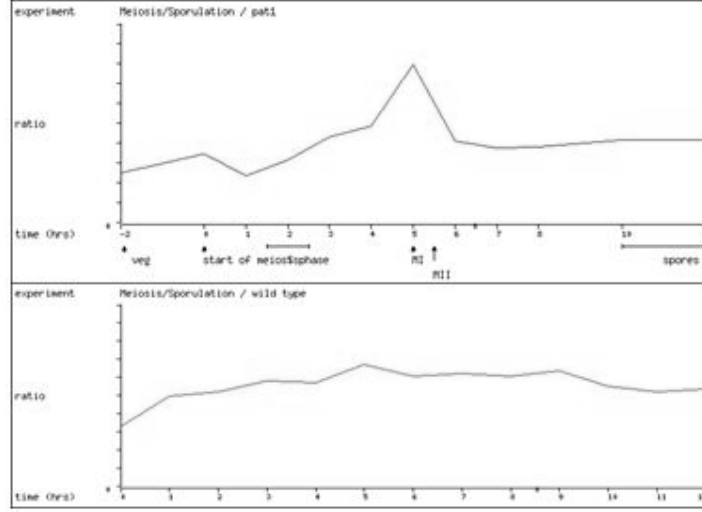
Score = 81.8 bits (41), Expect = 2e-16
Identities = 67/73 (91%), Gaps = 2/73 (2%)
Strand=Plus/Minus

Query 48
GAACGACTAATTTTCCTCTGGCTATTGAGCAAGTACCATATCATGTTGCTGGGTGAGCC 107
|||||
Sbjct 467 GAACGACTAATTTTCCTCTGGCT-TTGAGCAAGTACAATATCATGT-
CGCTGGTTTAGCC 410

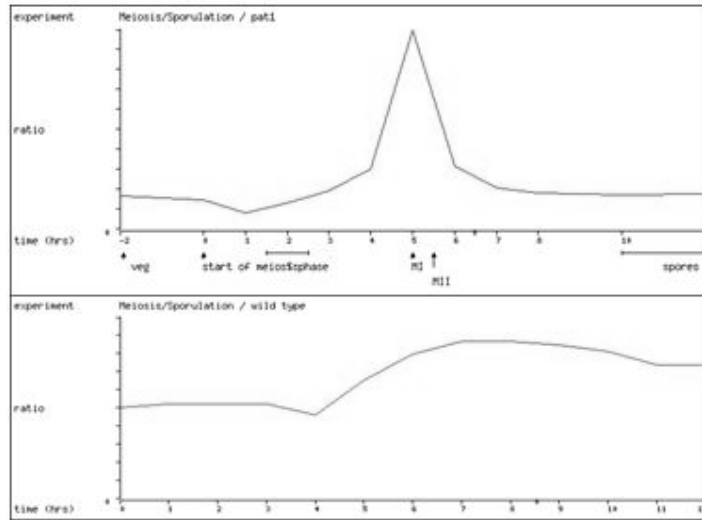
Query 108 GTGCGTGAACACC 120
|||||
Sbjct 409 GTGCGTGAACACC 397

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

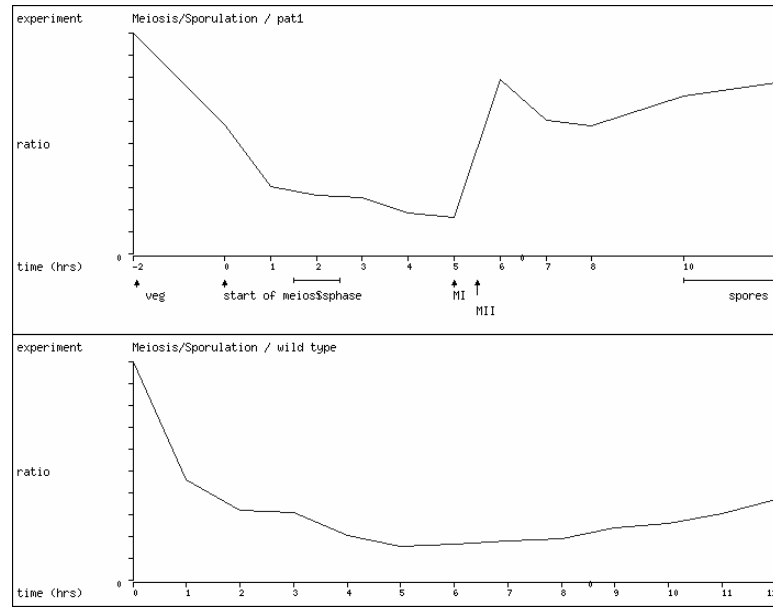
EK-2. *sid1*, *cam1*, *omt2* ile BH4 sentezi için gerekli olan GTP-siklo hidrolazları şifreleyen SPAC17A5.13, SPAP27G11.09c, SPAC1002.19 genlerinin mayoz sırasındaki anlatım profillerine değişimleri gösteren grafikler.



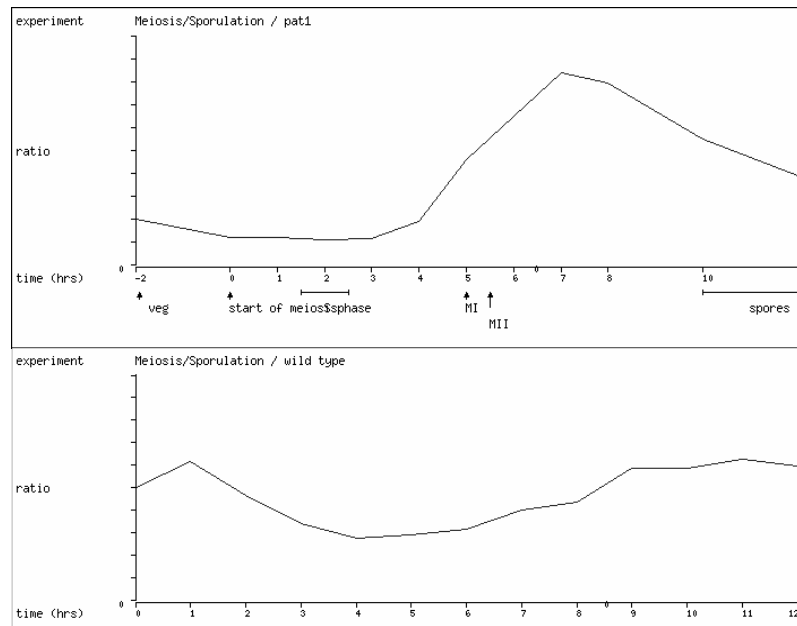
(a) *sid1*



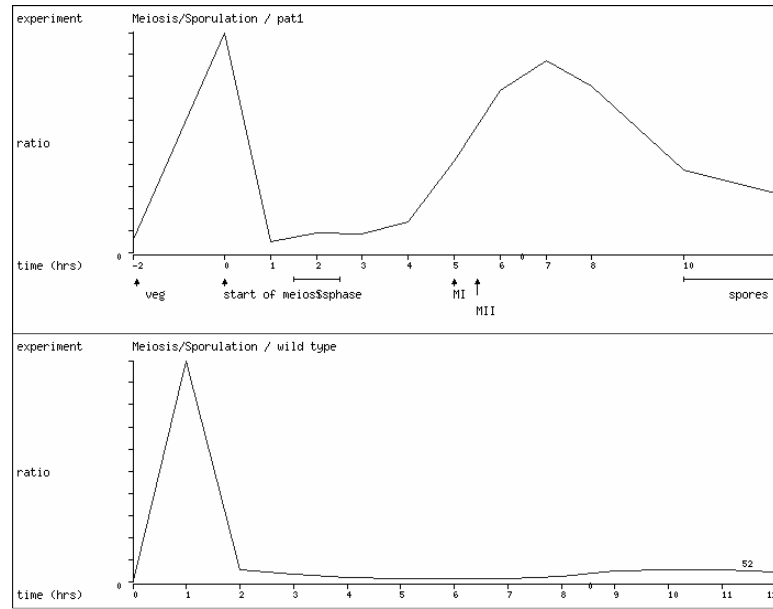
(b) *cam1*



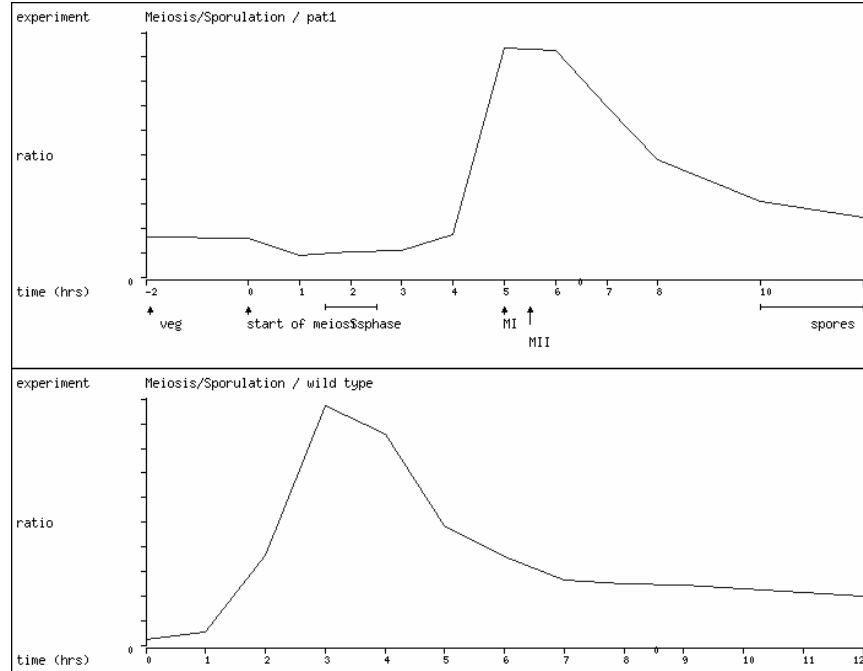
(c) SPAC17A5.13 (GTP siklohidrolaz)



(d) SPAP27G11.09c (GTP siklohidrolaz)



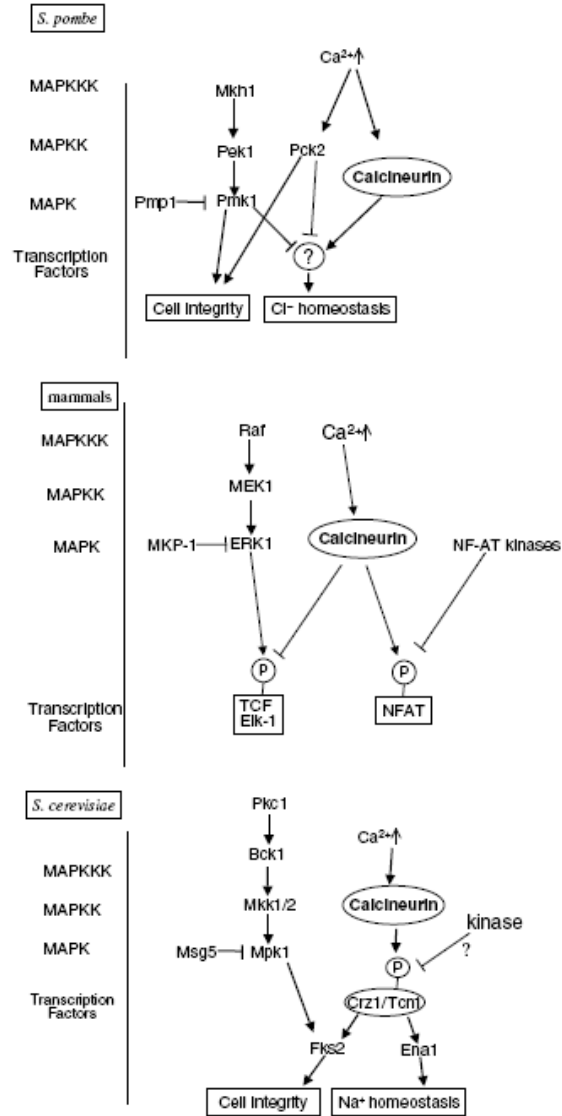
(e) SPAC1002.19 (GTP siklohidrolaz II)



(f) omt2 (4- α -hidroksitetrahidrobijopterin dehidrataz)

EK-3. Memeli ve maya hücrelerinde benzer işleve sahip MAPK sinyal yolu bileşenleri (Sugiura ve diğ., 2002).

Gene products		Functions	Mammalian homologues	Budding yeast homologues
MAPK	Pmk1/Spm1	Cell wall integrity Cell morphology	MAPK/ERK	MPK1
MAPKK	Pek1		MEK	MKK1/MKK2



ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında İstanbul'da doğdum. Kurtuluş İlk Okulu'ndan mezun olduktan sonra Orta ve Lise öğrenimimi Özel Tercüman Koleji'nde tamamladım. 2000 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olduktan sonra aynı yıl, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Programında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2003 yılında yüksek lisans eğitimimi tamamladıktan sonra aynı sene İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Programında doktora öğrenimime başladım. 2000 yılından itibaren İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji Genetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.

Yayınlar:

KIG, C., TURKEL, S. and TEMIZKAN, G., 2005, Isolation and characterization of glucose derepressed invertase mutants from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 69 (12), 2475-2478.

PEKMEZ, M., ARDA, N., HAMAD, I., **KIG, C.** and TEMIZKAN G., 2008, Hydrogen peroxide-induced oxidative damages in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biologia*, 63(2), 151-155.