

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

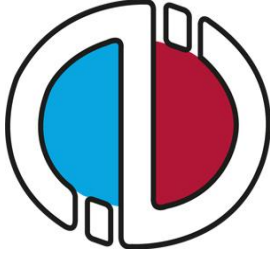
***SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'DE
SPBC409.08 VE SPAC9.02c
GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

**İsmail GÜNGÖR
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2014

Ref. No: 10022254



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ**

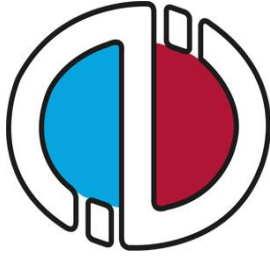
**Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**

***SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'DE
SPBC409.08 VE SPAC9.02c
GENLERİNİN KARAKTERİZASYONU**

**İsmail GÜNGÖR
Yüksek Lisans**

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2014



ANADOLU UNIVERSITY



**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
UNIVERSITY**

**Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics**

**CHARACTERIZATION OF SPBC409.08 AND SPAC9.02c
GENES IN *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE***

**İsmail GÜNGÖR
Graduate**

**Supervisor
Assist. Prof. Dr. İsmail POYRAZ**

BİLECİK, 2014



YÜKSEK LİSANS

JÜRİ ONAY FORMU

**BİLECİK ŞEYH EDEBALI
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 19.12.2013...tarih ve 31..... sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 08.01.2014...tarihinde tez savunma sınavı yapılan İsmail GÜNGÖR' ün "Schizosaccharomyces pombe'de SPBC409.08 ve SPAC9.02c Genlerinin Karakterizasyonu" başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI): Yrd. Doç. Dr. İsmail POLKAT 

ÜYE: Doç. Dr. Emel Sözen 

ÜYE: Yrd. Doç. Dr. Zerrin AAT 

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Hücre biyolojisi alanında çalışmam konusunda beni yönlendiren ve fikirler veren, ayrıca desteklerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Aslıhan ÖRS GEVREKÇİ' ye, yüksek lisans öğrenimim süresince pozitif düşüncelerle ilerlememi sağlayan ve tez çalışmam konusunda yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Yrd. Doç Dr. İsmail POYRAZ' a, en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan plasmid ve yabanıl tip *S. pombe* ırklarını, sırasıyla tarafımıza temin eden, Prof. Dr. Hiro YAMANO ve Yrd. Doç. Dr. Bedia Gemici PALABIYIK' a, teşekkür ederim.

Çalışma süresince, manevi desteklerini esirgemeyen ve her konuda destek olan başta Araş. Gör. Asena AKKÖSE' ye, yüksek lisans dönem arkadaşlarım Mustafa YILDIZ ve Gülseren ŞEN' e teşekkürü bir borç bilirim.

Tüm yaşamım boyunca bana destek olan, eğitim-öğretim hayatım boyunca doğru yolda yılmadan ilerlememi sağlayan, AİLEM' e sonsuz teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK 111T509 no' lu proje tarafından kısmi olarak desteklenmiştir.

İsmail GÜNGÖR
Ocak, 2014

ÖZET

Poliaminler, hücre döngüsünün kontrolünde ve çevresel streslere karşı hücresel cevabın oluşturulmasında önemli rollerinin olduğu bilinen moleküllerdir. Poliaminlerden spermin ve spermidinin, DNA'ya bağlanabildikleri ve dışarıdan hücreye eklendiklerinde transkriptomu değiştirebildikleri bilinmektedir. Hücrede poliamin mekanizması ve modifikasyonu, poliamin taşıyıcı proteinler ve poliamin asetiltransferazlar gibi çok sayıda proteinin birlikte çalışması ile düzenlenmektedir.

Bu çalışmada, *Schizosaccharomyces pombe*' de dizi benzerlikleri ile spermin ailesi taşıyıcı ve poliamin N-asetiltransferaz oldukları düşünülen ancak deneysel karakterizasyonu yapılmamış olan SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin karakterizasyonu hedeflenmiş ve bu genlerin hücre döngüsü ile strese cevap oluşturmadaki potansiyel rolleri ortaya çıkartılmıştır.

Deneylerde yabanıl tip h^- ve h^+ *S. pombe* kullanılarak, SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin delesyon mutantları Bahler vd. (1998) yöntemi ile oluşturulmuştur. Delesyon aşaması, koloni PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Mutantlar üzerinde UV ve osmotik strese karşı hassasiyet ve hücre döngüsü analizleri yapılmıştır. Bu genlerin hücre döngüsündeki rollerini anlamak için; hücrelerin büyüme grafiği, hücre boyu analizleri, morfolojik analizler, sporlanma testleri ile mitoz ve mayoz bölünme gözlemlenmiştir. Normal hücreler ile mutantların, hücre döngüsü ve strese cevap profilleri karşılaştırılarak analizleri yapılmıştır.

Bu çalışma ile ilk kez *S. pombe*'de SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin deneysel karakterizasyonu yapılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*; SPBC409.08; SPAC9.02c; gen delesyonu; poliamin

ABSTRACT

Polyamines are molecules known to have important roles in control of the cell cycle and in fighting against stress in the cell. Of polyamines spermine and spermidine are known to bind DNA and change transcriptome when they are added to the cell extrinsically. In the cell, the mechanism and modification of polyamine is regulated by cooperation of many proteins; for example polyamine carrier proteins and polyamine acetyltransferases. In this study, we aimed to discover the potential roles of SPBC409.08 and SPAC9.02c genes in the cell cycle and stress response in *Schizosaccharomyces pombe*. These genes are thought to be spermine family transporters and polyamine N- acetyltransferases due to similarity of sequences and their experimental characterization have not been carried out before.

In the experiments wild type h^- and h^+ *S. pombe* were used. Deletion mutants of SPBC409.08 and SPAC9.02c genes were generated by Bahler method (Bahler, et al., 1998). Deletion was verified by colony PCR method. In next step, the cell cycle analysis and analysis of sensibility to stress were carried out on those mutants. The growth chart, cell size analysis, morphologic analysis, sporulation tests, mitosis and meiosis were observed to understand roles of the genes in the cell cycle. Moreover, the cells were exposed to different stress conditions and the potential roles in response to stress were examined. Osmotic stress and DNA damage were some of stress conditions carried out to the cells. The first step in characterized of genes is to achieve deletion of those genes in *S. pombe*.

This is the first report about characterization of SPBC409.08 and SPAC9.02c genes in *S. pombe*.

Key Words: *Schizosaccharomyces pombe*; SPBC409.08; SPAC9.02c; gene deletion; polyamine

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
JÜRİ ONAY FORMU	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> hücresi	1
1.1.1. <i>S. pombe</i> genomu	3
1.1.1.1. <i>S. pombe</i> ’nin genom içeriği.....	4
1.1.1.2. Sentromerlerin yapısı	6
1.1.1.3. İntronlar	7
1.2. <i>S. pombe</i> ’de hücre döngüsü ve kontrol noktaları	8
1.2.1. Hücre döngüsü boyunca siklinlerin rolü	9
1.2.2. S fazının başlaması	10
1.2.3. M fazının başlaması	13
1.2.4. Cdc25 nasıl regüle edilir?	14
1.2.5. <i>S. pombe</i> ’de hücre boyut mekanizması.....	14
1.2.6. <i>S. pombe</i> ’de çiftleşme tipi aktarımı	17
1.2.7. <i>S. pombe</i> ’de mayoz bölünme ve sporulasyon.....	19
1.2.7.1. <i>S. pombe</i> ’de sporulasyonun başlaması	20

1.2.7.2. Ste11: <i>S. pombe</i> ’ de cinsiyet farklılaşması ve sporulasyonun düzenlenmesi.....	20
1.2.7.3. TOR sinyallerinin baskılanması; Ste11.....	21
1.2.7.4. Sporulasyonun çiftleşme-tipi kontrolü: <i>S. pombe</i> ’ de sporulasyonun pat1 ile engellenmesi.....	21
1.3. Poliaminler ve stres ilişkisi.....	23
1.3.1. Spermidin/Spermin- N^1 -asetiltransferaz (SSAT) önemi.....	26
1.3.2. Spermin ailesinin taşınması	28
1.3.3. <i>S. pombe</i> ’ de strese karşı cevap yolları (SAPK).....	29
1.3.3.1. <i>S. pombe</i> Sty1 SAPK ‘in regülasyonu	31
1.4. Knockout genler (Genlerin Çıkarılması/İptali) : Gen hedefleme teknolojisi	34
1.4.1. Gen hedeflemesi ve “Ends-out” strateji.....	34
1.4.2. Gen Hedefleme/değiştirme mekanizması	35
1.4.3. <i>S. pombe</i> 'de homolog rekombinasyon ve ssDNA asimilasyonu.....	38
1.5. Çalışmanın amacı	40
2. MATERYAL VE METOT	41
2.1. Çalışma materyali.....	41
2.2. Besiyeri ortamları	41
2.3. <i>S. pombe</i> ’ nin üretilmesi ve saklanması	43
2.4. Kanamycin ve hygromycin direnç geni taşıyan plazmidler	44
2.5. SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin genel özellikleri.....	45
2.5.1. SPBC409.08 geni.....	45
2.5.2. SPAC9.02c geni.....	46
2.6. Delesyon Mutantlarının Oluşturulması	47
2.6.1. Antibiyotik direnç genlerinin çoğaltılması	49
2.6.1.1. "Kanamycin" ve "Hygromycin" gen kasetlerinin çoğaltılması – Birinci PCR	49

2.6.1.2. "Kanamycin" ve "Hygromycin" gen kasetlerinin çoğaltılması- İkinci PCR	50
2.6.2. PCR ürünlerinin tuzla çöktürme ile saflaştırılması.....	51
2.6.3. Transformasyon	52
2.6.3.1. Replica plate yöntemi.....	53
2.6.3.2. Antibiyotiğe dirençli kolonilerin seçimi	53
2.6.4. Koloni PCR.....	53
2.6.6. Agaroz jel elektroforezi	55
2.7. Delesyon mutantlarının karakterizasyonu	56
2.7.1. Büyüme analizleri	56
2.7.2. Stres analizleri.....	56
2.7.2.1. NaCl içerikli besi ortamı ile muamele	57
2.7.2.2. KCl içerikli besi ortamı ile muamele	57
2.7.2.3. CaCl ₂ içerikli besi ortamı ile muamele	58
2.7.2.4. Sorbitol içerikli besi ortamı ile muamele	58
2.7.3. DNA hasarı testleri	58
2.7.3.1. UV' nin mutant <i>S. pombe</i> hücrelerinin yaşama yeteneği üzerine etkisi .	58
2.7.3.2. HU (hydroxyurea) içerikli besi ortamı ile muamele	59
2.7.4. <i>S. pombe</i> ' de boyut analizi	59
2.7.5. Spor Oluşumu ve sporulasyonun gözlenmesi	60
2.7.6. Verilerin istatistiksel analizleri	60
3. BULGULAR	61
3.1. Delesyon mutantlarının oluşturulması.....	61
3.1.1. Antibiyotik direnç genlerinin çoğaltılması	61
3.1.2. PCR ürünlerinin tuzla çöktürme ile saflaştırılması.....	62
3.1.3. Transformasyon ve antibiyotiğe dirençli kolonilerin seçimi	62

3.1.4. Koloni PCR.....	63
3.2. Delesyon mutantlarının karakterizasyonu	64
3.2.1. Büyüme grafiği	65
3.2.2. Stres testleri.....	67
3.2.3. UV' nin <i>S. pombe</i> mutantlarına etkisinin analizi.....	69
3.2.4. HU (hydroxyurea) içerikli besi ortamı analizi.....	69
3.2.5. <i>S. pombe</i> mutantlarının hücre boyu analizi.....	70
3.2.6. Spor oluşumu analizi	73
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	75
5. KAYNAKLAR	88
6. ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1 : <i>S. pombe</i> genomu içeriği.	6
Çizelge 1.2 : <i>S. pombe</i> Sty1 yolağı kullanımı.....	30
Çizelge 2.1a : Birinci PCR içeriği.	50
Çizelge 2.1b : Reaksiyon şeması- Birinci PCR.....	50
Çizelge 2.2a : Reaksiyon şeması.	51
Çizelge 2.2b : Reaksiyon şeması.....	51
Çizelge 2.3a : Reaksiyon şeması.	54
Çizelge 2.3b : Koloni PCR içeriği.....	54
Çizelge 2.3c : Reaksiyon şeması.	54
Çizelge 3.1 : Zamana bağlı olarak <i>S. pombe</i> ırklarında belirlenen hücre sayıları... ..	65
Çizelge 3.2a : Wild-type (972 h ⁻) ve <i>SPAC9.02cΔ</i> mutanlığı hücrelerin üreme verilerinin SPSS programı yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırılması (SPSS eşleştirilmiş örneklem T-test analizi sonucu p- değeri 0,120 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağlamamaktadır).	66
Çizelge 3.2b : Wild-type (972 h ⁻) ve <i>SPBC409.08Δ</i> mutanlığı hücrelerin üreme verilerinin SPSS programı yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırılması (SPSS eşleştirilmiş örneklem T-test analizi sonucu p- değeri 0,207 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağlamamaktadır).	66
Çizelge 3.3a : a) <i>SPAC9.02cΔ</i> mutanlığı ile yabancı tip hücrelerin ortalamalarının istatistiksel verileri. b) <i>SPAC9.02cΔ</i> mutanlığının SPSS bağımsız T-test analizi sonucu p- değeri 0,753 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağlamamaktadır).....	71
Çizelge 3.3b : a) <i>SPBC409.08Δ</i> mutanlığı ile yabancı tip hücrelerin ortalamalarının istatistiksel verileri) <i>SPBC409.08Δ</i> mutanlığının SPSS bağımsız T-test analizi sonucu p- değeri 0,000 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağladığından anlamlıdır). .	71

Çizelge 3.4	: Hücre boyutu deneyinde, yabanıl tip (972 h ⁻ <i>S. pombe</i>), <i>SPBC409.08Δ</i> ve <i>SPAC9.02cΔ</i> mutantları için referans alınan boy uzunlukları (μm)..	72
Çizelge 4.1	: Moseley vd. (2009) hücre boyut yolağındaki genlerin delesyon mutantları ile çalışmamızda ki <i>SPBC409.08Δ</i> mutantının boy uzunluğu değerleri.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1	: <i>S. pombe</i> mayasının mikroskopta gösterimi (yabanıl tip <i>S. pombe</i> hücreleri 7-14 µm aralığında boy uzunluğuna sahip çubuk şeklinde organizmalardır). 1
Şekil 1.2	: <i>S. pombe</i> kromozomları toplam 13,6 Mb- 0,2 Mb olan sentromer uzunluğu hariç- gösterilmiştir (www. pombase.com) (uyarlanmıştır). 4
Şekil 1.3	: Üç <i>S. pombe</i> sentromerinin sistematik haritası ve tekrarlayan diziler (The genome sequence of <i>Schizosaccharomyces pombe</i> . Nature 2002 Feb21;415(6874):871-80. created by Rhian Gwilliam) (uyarlanmıştır). ..7
Şekil 1.4	: a) Cdc2 aktivasyonu ve inaktivasyonu. b) Wee1-Mik1 ve Cdc25 kontrolü (Current Opinion in Microbiology) (uyarlanmıştır). 10
Şekil 1.5	: G ₁ /S fazında DNA replikasyonu (Current Opinion in Microbiology) (uyarlanmıştır). 12
Şekil 1.6	: Hücre Boyut Kontrolü Mekanizması (Blt1 ve Cdr1 birlikte lokalize olur) Cdk1-P (fosforile olmuş inaktif Cdk1). 16
Şekil 1.7	: a) <i>S. pombe</i> haploit yaşam döngüsü. b) Çiftleşme paternleri gösterimi (s: switchable, u : unswitchable) (Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S., TRENDS in Genetics Vol.17 (3) 2001) (uyarlanmıştır) 17
Şekil 1.8	: <i>S. pombe</i> ' de cinsiyet oluşumu (Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S., TRENDS in Genetics Vol.17 (3) 2001) (uyarlanmıştır). 18
Şekil 1.9	: <i>S. pombe</i> ' de sporulasyona giriş sinyal kontrol yolağı (F. J. van Werven ve A. Amon, 2011) (uyarlanmıştır). 23
Şekil 1.10	: Poliaminlerin hücredeki işlevleri (Minois vd., 2011'den) (uyarlanmıştır). 25
Şekil 1.11	: a) Spermidine / spermine - N ¹ -asetiltransferazın (SSAT) poliamin metabolizmasındaki rolü. b) SSAT ve APAO arasındaki katalizleme (Anthony E. Pegg, 2008) (uyarlanmıştır). 27
Şekil 1.12	: TPO ₂ ve TPO ₃ proteinlerinin plazma zarında ki gösterimi (Igarashi vd., 2011) (uyarlanmıştır). 28
Şekil 1.13	: Üç farklı organizmada sinyal iletim yollarının karşılaştırılması (FEMs Microbiology Letters, 2010) (uyarlanmıştır). 31

Şekil 1.14	: (PCR) - temelli gen değiştirme yöntemi (Third Annual Conference for Biotechnology and Transplantation, Holliday Inn Skopje, Macedonia. 2012) (uyarlanmıştır).	35
Şekil 1.15b	: Ends - out teknolojide tek-iplik asimilasyonu ile gen entegrasyonu (Petar Tomev Mitrikeski, 2012) (uyarlanmıştır).	37
Şekil 1.16	: Ends-out teknolojide iki uca yapılan ipli atak/çözülme entegrasyonu (Petar Tomev Mitrikeski, 2012) (uyarlanmıştır).	37
Şekil 2.1a	: pFA6a-kanMX6 plazmidi (Snap Gene).	44
Şekil 2.1b	: “kanMX6 (~1,6 kbp) ve hphMX6 (~1,7 kbp)” doğrusal gen kasetleri.	45
Şekil 2.2a	: <i>S. pombe</i> 978 h ⁻ yabanıl tipinde SPBC409.08 geni lokalizasyonu.	45
Şekil 2.2b	: SPBC409.08 geni için komşu genlerin gösterimi.	46
Şekil 2.3a	: <i>S. pombe</i> 978 h ⁻ yabanıl tipinde SPAC9.02c geni lokalizasyonu.	46
Şekil 2.3b	: SPAC9.02c geni için komşu genlerin gösterimi.	47
Şekil 2.4	: <i>SPBC409.08Δ</i> ve <i>S. PAC9.02cΔ</i> Bahler yöntemi ile oluşturulmuştur (Bahler vd., 1998).	48
Şekil 2.5	: DNA belirteci (1 kbp DNA leader).	55
Şekil 3.1	: Birinci PCR ve ikinci PCR sonucunda kan ve hph doğrusal kasetleri büyüklükleri.	61
Şekil 3.2	: Tuzla Çöktürme sonucu “kan” ve “hph” gen kasetleri.	62
Şekil 3.3	: Koloni PCR öncesi doğru transformatlar seçilmeden önceki genel koloni durumu.	63
Şekil 3.4a	: <i>SPAC9.02cΔ</i> mutantına ait koloni PCR.	64
Şekil 3.4b	: <i>SPBC409.08Δ</i> mutantına ait koloni PCR.	64
Şekil 3.5	: <i>S. pombe</i> (972 h ⁻) ile <i>SPBC409.08Δ</i> ve <i>SPAC9.02cΔ</i> mutantlarının ırklarının üreme eğrisi grafiği.	67
Şekil 3.6a	: Farklı derişimlerde osmotik stres testine maruz bırakılan yabanıl tip ve delesyon mutanı <i>S. pombe</i> hücreler (YEA kontrol besiyeridir).	68
Şekil 3.6b	: Sorbitol stresine maruz bırakılan yabanıl tip ve delesyon mutanı <i>S. pombe</i> hücreleri (YEA, sorbitol içermez).	68
Şekil 3.6c	: Yoğun tuz konsantrasyonu deneyleri sonucunda sadece 1 M KCl içeren besiyerinde yabanıl tip ve delesyon mutanı <i>S. pombe</i> hücrelerine rastlanmıştır (YEA, KCl içermez).	68

Şekil 3.7	: Farklı enerji düzeylerinde UV ışığa maruz bırakılan yabancı tip ve mutant <i>S. pombe</i> hücrelerinin analizi.	69
Şekil 3.8	: 4 mM ve 10 mM hydroxyurea içeriğine sahip besiyerlerinde yabancı tip ve mutant <i>S. pombe</i> hücreleri (YEA, hydroxyurea içermez).	70
Şekil 3.9	: Yabancı tip ve delesyon mutanıtı <i>S. pombe</i> hücrelerinin boyut analizi grafikteki gibidir. <i>SPBC409.08Δ*</i> mutantının p- değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.	73
Şekil 3.10a	: Yabancı tip ve delesyon mutanıtı hücrelerin birbirleriyle çaprazlanması sonucu elde edilen askus yapılar.	74
Şekil 3.10b	: Sporların askus (tetrat) yapısı.	74

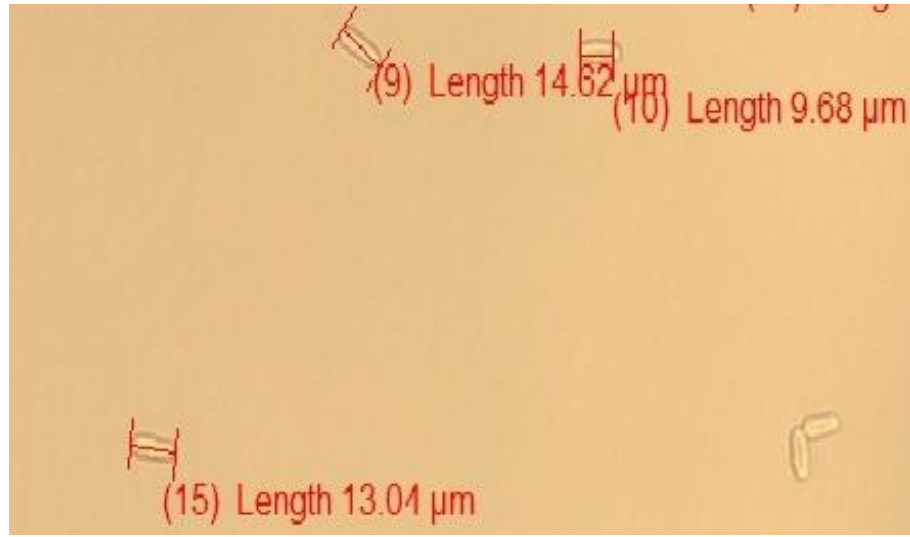
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Δ	: Delta
α	: Alfa
β	: Beta
μ	: Mikro
μm	: Mikro metre
$^{\circ}\text{C}$	: Santigrat derece
bp	: Baz çifti
Mbp	: Megabaz çifti
kbp	: Kilobaz çifti
DSBR	: Çift-iplikli kırık onarımı
HR	: Homolog rekombinasyon
M	: Belirteç
MAP	: Mitojen-aktive edilmiş protein
MAPK	: Mitojen-aktive edilmiş protein kinaz
MAPKK	: Mitojen-aktive edilmiş protein kinaz kinaz
MAPKKK	: Mitojen-aktive edilmiş protein kinaz kinaz kinaz
ORFs	: Açık okuma çerçevesi
SAPK	: Stres-aktive edilmiş protein kinaz
ssDNA	: Tek-iplikçikli DNA
Spm	: Spermin
Spd	: Spermidin
PA	: Poliamin
Put	: Putresin
WT	: Yabanıl tip

1. GİRİŞ

1.1. *Schizosaccharomyces pombe* Hücresi

Schizosaccharomyces pombe Ascomycota mantar sınıfına ait, ökaryotların bir çok kompleks özelliğini paylaşan tek hücreli serbest yaşayan bir canlıdır (Şekil 1.1). Gen dizisinin karşılaştırılması ve filogenetik analizlerden, fisyon mayalarının 330-420 milyon yıl öncesinden yetiştiği ve 1,000-1,200 milyon yıl öncesinden hayvan ve bitkilerden ayrıldığı tahmin edilmektedir.



Şekil 1.1. *S. pombe* mayasının mikroskopta gösterimi (yabanıl tip *S. pombe* hücreleri 7-14 μm aralığında boy uzunluğuna sahip çubuk şeklinde organizmalardır).

Maya tipinde bir mikroorganizma olan *S. pombe* uzun yıllardan beri Amerika'nın doğu eyaletlerinde, Afrika'nın çeşitli bölgelerinde, Doğu ve Batı Hint adalarında rom yapımında kullanılmaktadır (Harrison ve Graham, 1970). İlk olarak 1893 yılında Linder tarafından *Pombe* adlı bir Doğu Afrika darı birasından izole edilmiş olan, bu maya türünün genetiği ile ilgili ilk çalışmalar 1950'li yılların başında Leupold tarafından başlatılmıştır (Gutz vd., 1974). *S. pombe*'nin genomu bir kaç araştırmacının 1977'de ilgisini çekmiş, Jurg Kohli ve Pierre Thuriaux (University of Bern) *S. pombe*'nin üç kromozoma sahip olduğunu rapor etmiştir. Haploit durumda üç kromozoma sahip olan (Kohli vd., 1977) *S. pombe*'nin mayoz bölünme kusurlu ırkları kullanılarak

yapılan çaprazlamalardan elde edilen diploit hücreler, izole edilen karakterlerin dominant/resesif özelliklerinin test edilmesine olanak vererek, bu maya türünün genetik çalışmalarına hız kazandırmıştır (Munz vd., 1989).

S. pombe, basit hücre ve genom yapısına sahip olmasının yanında, hücre döngüsünün G₁, S, G₂ ve mitoz fazlarından oluşması (Russell ve Nurse, 1986) sentromerlerinde ki 40-100 kb boyutunda ki tekrarlanan dizilerin varlığı (Steiner vd., 1993), intron içeren gen sayısının fazla olması, rRNA genlerinin organizasyonu (Singer ve Berg, 1991) gibi özellikleri açısından, *S. cerevisiae*' dan çok memelilere benzerlik göstermesi sebebiyle, günümüzde ökaryotik organizmaların araştırılmasında tercih edilen bir model organizmadır. *S. cerevisiae*' da izole edilen bir çok genin *S. pombe* mutantlarıyla komplementer olması (Munz vd., 1989) sayesinde, *S. cerevisiae* için geliştirilen vektörler, bazı değişikliklerle *S. pombe*' de kullanılabilir. *S. pombe*' de transformasyon ilk kez *S. cerevisiae*' nın 2 µm plazmidinin replikasyon orjinini ve Leu2 işaret genini içeren pDB248 *S. pombe*-*E. coli* mekik tipi klonlama vektörü kullanılarak gösterilmiştir (Beach ve Nurse, 1981). *S. pombe* genom dizisi tamamlanan altıncı model organizmadır. Daha önce beş ökaryot genomu dizilenmiştir. Bunlar; *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* ve *Homo sapiens*' tir. *S. pombe*' nin genom dizisi 2001 yılında tamamlanmıştır. Paul Nurse ve ekibi 2001 yılında *S. pombe* ile yaptıkları hücre döngüsü kontrolü çalışmalarından dolayı Nobel Tıp Fizyoloji ödülüne layık görülmüştür. *S. cerevisiae*' da hücre döngüsü genetiği kullanılarak, siklin molekülü Tim Hunt tarafından bulunmuştur (Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülü, 2001). Genom dizisi, Paul Nurse' ün başını çektiği Imperial Cancer Research ve Bart Barrell' in Wellcome Trust Sager Enstitüsü tarafından nature' da yayımlanmıştır (II. Uluslararası Fisyon Maya Toplantısı, Kyoto, Japonya, 25-30 Mart 2002).

Genom boyutunun küçük olması, genlerin yapısal ve işlevsel analizlerine yönelik çalışmalarda kolaylık sağlar. Ayrıca normal yaşam döngülerinde haploit olmaları da genlerdeki mutasyonların etkilerinin fenotipte izlenmesine olanak sağlamaktadır. Bunun yanı sıra bazı koşullarda diploit duruma geçebilmeleri, özellikle alleller arasındaki etkileşimlerin izlenmesi açısından avantaj sağlar. Cdc2'nin tanımlanması ile de son 20 yılda hücre biyolojisi ve hücre döngüsünde *S. pombe*' ye,

olan ilgi artmıştır. Ardından kromozom biyolojisi, mitoz, mayoz, sitokinez ve hücre formu kontrolü çalışmaları *S. pombe*'ye ilgiyi arttırmıştır.

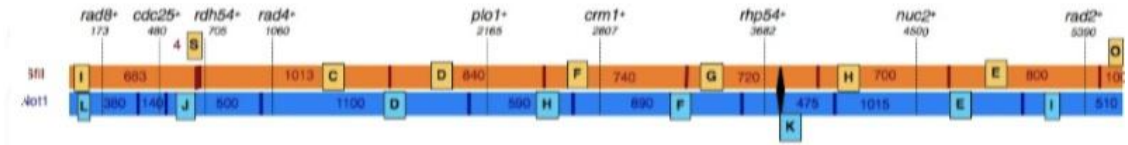
1.1.1. *S. pombe* Genomu

S. pombe'nin genom dizisi ve ilişkilerine bakıldığında, sentromerler arası 35-110 kbp ve bu bölgede tekrarlayan yüksek korunmuş düzeyde 1,8 kbp büyüklüğünde elementler bulunur. Genlerin % 43'ü intronları içermektedir. Elli gen; insan genleri ile yakından benzerlik göstermektedir, bunların yarısı kanser gibi hastalıklarla ilişkilidir. Yüksek oranda korunmuş önemli ökaryotik gen organizasyonları; hücre döngüsü kontrolü, proteoliz, protein fosforilasyonu ve RNA splicing genleri tanımlanmıştır. *S. pombe*'nin üç kromozom içerdiği, sentromerik bölgelerin 40 kbp, telomerik bölgelerin 260 kbp içerdiği gözlenmiştir. Diziler tamamlandığında, çok yönlü metodolojik araştırmalar ve *S. pombe* üzerindeki toplu deneysel araştırmalar, *S. pombe*'nin fonksiyonel ve ökaryotik hücre çalışmalarını hızlandırmıştır.

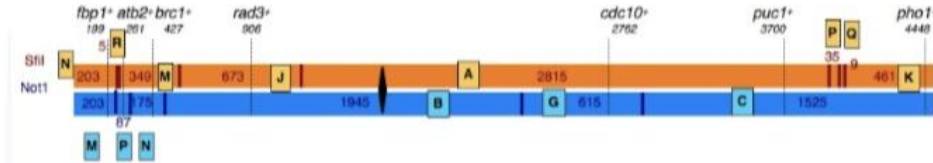
S. pombe'de 2,083 gen karakterize edilmiştir (www.genedb.org/pombe). İkinci olarak, ökaryotlar arasında *S. cerevisiae* ile genetik manipülasyonu kolaylaştırmıştır ve *S. pombe*'nin bir model organizma olarak hücre döngüsü kontrolü, mitoz ve mayoz bölünme döngüsü, DNA onarımı, rekombinasyon ile hücre kontrol noktaları çalışmaları için genom stabilizesi mükemmeldir.

S. pombe'nin 13,8 Mbp genom büyüklüğünün kromozomlar arasındaki dağılımı; kromozom I (5,7 Mbp), kromozom II (4,6 Mbp) ve kromozom III (3,5 Mbp)'tir (Şekil 1.2), 20 kbp mitokondriyal genom bulunmaktadır. Ardarda dizilmiş dizilerin 100-120 tekrarı 10,4 kbp fragment içerir, 5,8S, 18S ve 25S ribozomal RNA genleri 1,1 Mbp civarındadır. Sentromerlerin üçü sırasıyla kromozom I, II ve III için 35, 65, 110 kbp uzunluğundadır, toplamda 0,2 Mbp'tir. Ribozomal RNA ve sentromerler arasındaki bölgelerin büyüklüğü çıkarıldığında 12,5 Mbp olan tek diziler ayrılmaktadır.

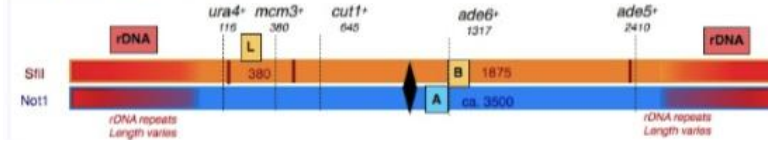
Kromozom I: 5600 kb



Kromozom II: 4500 kb



Kromozom III: 3500 kb



Şekil 1.2. *S. pombe* kromozomları toplam 13,6 Mbp- 0,2 Mbp olan sentromer uzunluğu hariç- gösterilmiştir (www. pombase.com) (uyarlanmıştır).

S. pombe'nin, *S. cerevisiae* mayasına benzerlikleri fazladır ve üç model organizmaya daha dizi yönünden büyük ölçüde benzerlikler içerir; Bu organizmalar; *C. elegans* (9,7 Mbp), *Arabidopsis* (12,5 Mbp) ve *Drosophila* (13,7 Mbp)' dir. Tüm tek diziler ve üç sentromerin çoğunluğu Leupold 'un 972 h⁻ ırkının sahip olduğu diziler ile Wellcome Trust Sanger Institute ve 13 farklı laboratuarda European Sequencing Consortium (EUPOM) tarafından oluşturulmuştur. Bununla birlikte 100 kbp dizi Cold Spring Harbor laboratuvarında üretilmiştir.

1.1.1.1. *S. pombe*' nin genom içeriği

S. pombe genomunda 5123 (11'i mitokondriyal genler) genin protein kodladığı ve 29 psödogenin bulunduğu bilinmektedir. Tüm açık okuma çerçeveleri sayısı (ORFs), 100 aminoasidin üstündedir, başlatıcı metionin aminoasididir. Birde buna dahil 147 tane teyit edilmiş (öngörülen) veya önceden bilinen, protein-kodlama dizisi 25-99 aminoasit arasında olan diziler bulunmaktadır. Henüz keşfedilmemiş genler, ya küçük ekson ile yüksek splays yapılarına sahip veya 100 aminoasitten küçüktürler. Burada ki 71 protein kuşkulu olarak nitelendirilebilir, çünkü bunlar küçük,

tanımlanabilir homolojiye sahip olmayan ve kodlama potansiyelleri düşük olan genlerdir. Böylelikle genlerin toplamından çıkardığımızda bilinen 5052 gen bulunmuş olur.

S. pombe'deki gen sayısı dikkate alındığında, serbest yaşayan ökaryotların 5000 civarı gen ile inşa edilebileceği sonucuna varılmıştır. Ökaryotlar ve prokaryotlar arasındaki ayırım hücre organizasyonudur, gen miktarı değildir. Türlerde genom içerikleri karşılaştırıldığında organizasyon seviyeleri farklıdır. *Mycoplasma genitalium*, 500 gen ile yeterli parazitik prokaryotik hücre oluşturulabilirken; 1500 civarında gene sahip serbest yaşayan prokaryotik *Aquifax aelicis*, 5000 gen ile *S. pombe* ve *S. cerevisiae*, ayrıca 30-40 bin gen ile *H. sapiens* oluşmaktadır.

Gen yoğunluğu kromozom I ve II' de benzerdir. Sırasıyla bir gen ortalama 2483 ve 2457 bp civarında iken, kromozom III için gen yoğunluğu 2790 bp'tir (Çizelge 1.1). Bu uzunluklar genler için avantaj anlamına gelmez, gen yoğunlukları tüm üç kromozom içinde benzerdir. Sentromerlerde protein kodlayan genler bulunmaz, buna rağmen tRNA kodlayan genler bu bölgede bulunur. Gen yoğunlukları birde telomer bölgelerinde düşüktür. Genomun tamamında gen yoğunluğu bir gen için; 2528 bp, *S. cerevisiae* ile karşılaştırıldığında ise *S. cerevisiae*'da 2088 bp' tir. *S. pombe* genomunun sekanslanmış kısmının % 60,2' si protein kodlar, intronlar çıkarıldığında bu oran % 57, *S. cerevisiae* için ise bu oran % 71', intronlar çıkarıldığında ise % 70,5'tir. Tüm guanin ve sitozin içeriği ise % 36'dır, *S. cerevisiae*'da yine bu oran ise % 38,3'tür. Bu GS içeriği, protein kodlayan kısım için % 39,6 ile her iki maya türünde de ortaktır.

Ayrıca genomda 174 tRNAs, tRNA ailesinin tüm kodonlarının çözülmesine ihtiyaç vardır. Splayozomal RNAs (U1-U6), 7 küçük nükleer RNA genleri ile 55 sno-RNAs bulunmuştur. Bunlar genomun her tarafında çok fazla dağılmış durumdadır. 5.8 S, 18 S ve 26 S rRNA genleri art arda dizilmiş 100-120'li tekrarlar içererek III numaralı kromozomda gruplanmıştır. Fakat otuz 5S rRNA geni, genomun her yerine dağılmıştır. Kros-over esnasında ardarda yönelim göstermişlerdir. Lokal duplikasyon ve delesyonlar, 5S rRNA genleri arasında lokalize olmuş olabilir. Burada 13 transpozon ve 25 wtf elementi bulunur. Bu elementler sıklıkla LTRs'ler ile işaretlenmiştir ve dolayısıyla retrotranspozonlar ile duplike olmuştur. *S. pombe*'de birde 180 solo LTRs bulunur. *S. cerevisiae*'da bu sayı 268'dir. Transpozon elementlerin kalıntısı tüm kromozomlarda bulunmakla birlikte kromozom III'de yoğundur.

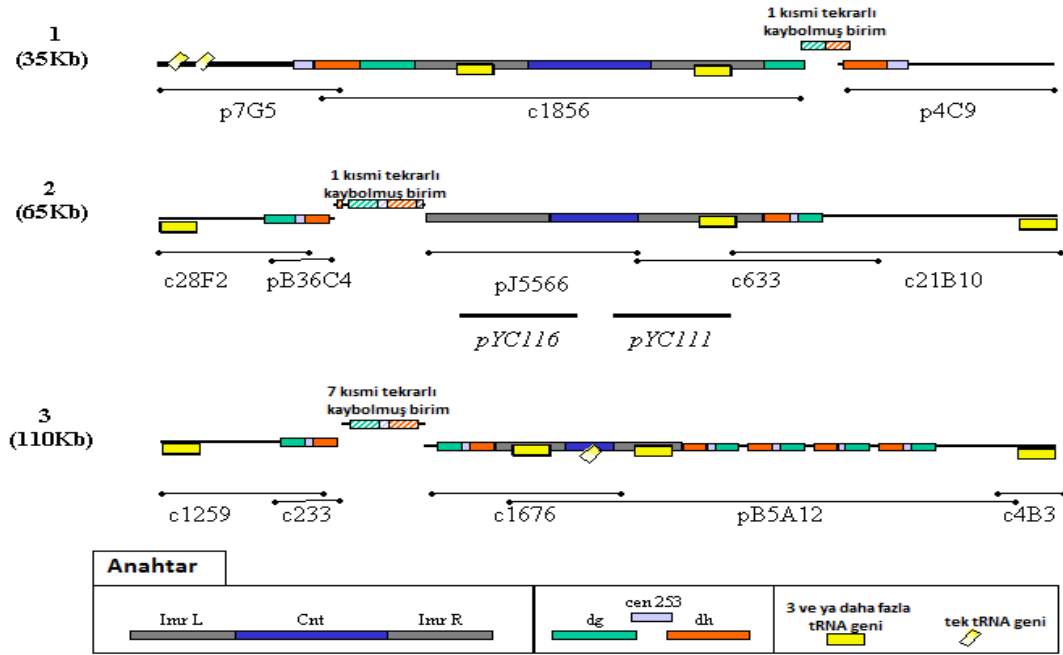
Çizelge 1.1. *S. pombe* genomu içeriği.

	Kromozom I	Kromozom II	Kromozom III	Toplam
Gen Uzunluğu (bp)*	5,598,923	4,397,795	2,465,919	12,462,637
Gen Sayısı	2,255	1,790	1,078	5,123
Tf2s Sayısı	8	2	1	13
Psödo Tf2s Sayısı	0	1	2	3
Wtfs Sayısı	1	1	23	25
LTRs sayısı	77	53	50	180
Psödogen Miktarı	17	9	7	33
Gen Uzunluğu Ort.*(bp)	1,446	1,411	1,407	1426
Gen Yoğunluğu	2,483	2,457	2,790	2,528
Kodlama (%)	58,6	57,5	54,5	57,5

Ort: Ortalama

1.1.1.2. Sentromerlerin yapısı

Sentromerlerin ana yapısı daha önceleri southern blotlama ile çıkarılmıştır ve sentromerlerin % 14'e yakın bir bölümünün tekrarlarından oluştuğu gözlenmiştir (Wood vd., 2002). Burada, üç sentromerin % 81'den fazlasını dizilenmiştir (Şekil 1.3). Yanagida grup terminolojisi takip edilerek kullanılmıştır. Dolayısıyla, diğer gösterimlerde de bu elementler kullanılmıştır. Sentromer I için diziler daha çok tamamlanmıştır, en kısası 35 kbp olup ve sadece 2,5 kbp bir fragmentlik bir bölüm kayıptır. Mümkün olduğunca genişletilmiş sentromerik bölgeler gerekli doğru miyotik ve mayozik hareketin doğru kromozom kollarını oluşturmasını sağlar. Sentromerik bölgelerin üstünde protein-kodlayıcı diziler bulunmaz ancak tRNA kodlayan diziler vardır (Şekil 1.3). tRNA kümeleri sentromer I ve II'de ve birde tüm sentromerlerin imr bölgelerinde bulunur. Bu tRNA genleri sentromerlerin fonksiyonuna katkıda bulunması ile yapının domainlerinin tanımlanması ile sentromer aktivitesi için önemlidir. *S. pombe*'nin sentromerleri, *S. cerevisiae*'daki denklrine göre epey uzundur, sentromer aktivitesi için merkez bölge yeterli içeriğe sahip sadece 120 bp ve nükleaz üretim bölgesi olan 150-160 bp içerir, 120-bp bölümün çekirdekte 57'si korunmuştur. *S. pombe* ile *S. cerevisiae* 'nin kinetokor yapıları muhtemelen farklıdır.



Şekil 1.3. Üç *S. pombe* sentromerinin sistematik haritası ve tekrarlayan diziler (The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. Nature 2002 Feb21;415(6874):871-80. created by Rhian Gwilliam) (uyarlanmıştır).

1.1.1.3. İntronlar

5300 intronun tamamı *S. pombe* genlerinin % 47'si boyunca dağılır, bir gende en fazla 15 intron bulunur. İntronlar 29'dan 819 nükleotid uzunluğuna kadar değişir, Ortalama uzunluk 81 ve 48 nükleotid arasında değişmektedir. Genlerden iki veya daha fazla introna sahip olanlar bulunmaktadır. Bu genlerin 614'ü iki intron, 324'ü üç intron, 148'i dört intron, 70'i beş intron ve 40'ı altı intron içerir. Bundan dolayı ekstra numaraya sahip genler, gen başına altı introndan sonra azalmaktadır. Büyük numaralı intronlar *S. pombe*'de alternatif splicing protein çeşitliliğine olanak sağlar. *S. cerevisiae*'da, intronlar çok seyrek, sadece genlerin % 5'i intronlara sahiptir.

1.2. *S. pombe*' de Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü; bir hücrenin üremesi, içeriğinin replikasyonu daha sonra da ikiye bölünmesini içeren olaylar dizisidir. Hücre döngüsü bakteri ve maya gibi tek hücrelerde tam bir organizma oluşumu için; çok hücrelilerde ise işlevsel bir organizmanın oluşumu için uzun ve karmaşık hücre bölünmesi serileri içerir. Ökaryotik hücrelerin, mitotik hücre döngüleri; hücrelerin yüksek kompleks dizileri sonucunda güvenli bir şekilde yürütülür. Hücre için gerekli tüm bileşenler iki katına çıkar ve yavru hücreler tam olarak ayrılır. Hücre döngüsünün iki ana başlığı sonucunda; DNA sentezi (S-fazı) ve M fazında kromozomlar eşit olarak iki çekirdeğe bölünmek için hazır hale gelir. Genomik integrite sağlanır, bu durum genomun tanı ve doğru replikasyonu için, her bir hücre döngüsü için çok önemlidir.

S. pombe ile ilgili yapılan araştırmalardan temel regülasyon ve ökaryotik hücrelerin kontrol mekanizması için muhteşem bir model organizma olduğu bilinmektedir. Hücre döngüsünün aşamaları arasındaki geçişler korunmuş bir düzenleme mekanizması ("checkpoints" sistemi) tarafından kontrol edilir. Hücre döngüsünü ilerleten ve yöneten karmaşık bir düzenleyici protein ağıdır. Bu sistem ile hücre içi ve dışı sinyaller yoluyla biyokimyasal düzenlemeler yapılır. Genomun replike edilmesinin yanı sıra, hücreler diğer organelleri ve makromolekülleri de çoğaltmaktadırlar. Bu mekanizma sadece hücre döngüsünün farklı olaylarını kontrol etmez aynı zamanda hücre çoğalmasını kontrol eden hücre dışı sinyallerle, hücre döngüsü arasındaki ilişkiyi de sağlar.

Yüksek ökaryotlardan; fisyon mayalarında hücre döngüsü dört kısma ayrılır; G_1 fazı, S fazı, G_2 fazı ve M fazı; G_1 fazı ve M fazı kısadır. *S. pombe* mayasının hücre döngüsünde G_2 fazından M fazına geçişte hücre boyutu ve besin varlığının etkili olduğu nokta temel kontrol noktasıdır. Bu maya her iki ucundan uzayarak büyür ve hücrenin ortasında hücre duvarı oluşturarak ikiye bölünür. Sitokinez G_1 de olur. Hücre boyutu (uzunluğu) hücre döngüsünün hangi aşamada olduğunu gösterir. G_1 fazındaki aktif proteinlerin sentezi karakterize edilmiştir. Bu proteinlere hücre döngüsü programının bir sonra ki aşamasına geçmek için ihtiyaç duyulur. G_1 fazında hücreler DNA replikasyonu için hazırlanır, S fazı için hazırlıklar yapılır. İlk üretim DNA ile sonlanır. S fazı replikasyon ile başlar, eş zamanlı olarak genomun birçok bölgesinde başlar. Her döngüde DNA sadece bir kez kopyalanır.

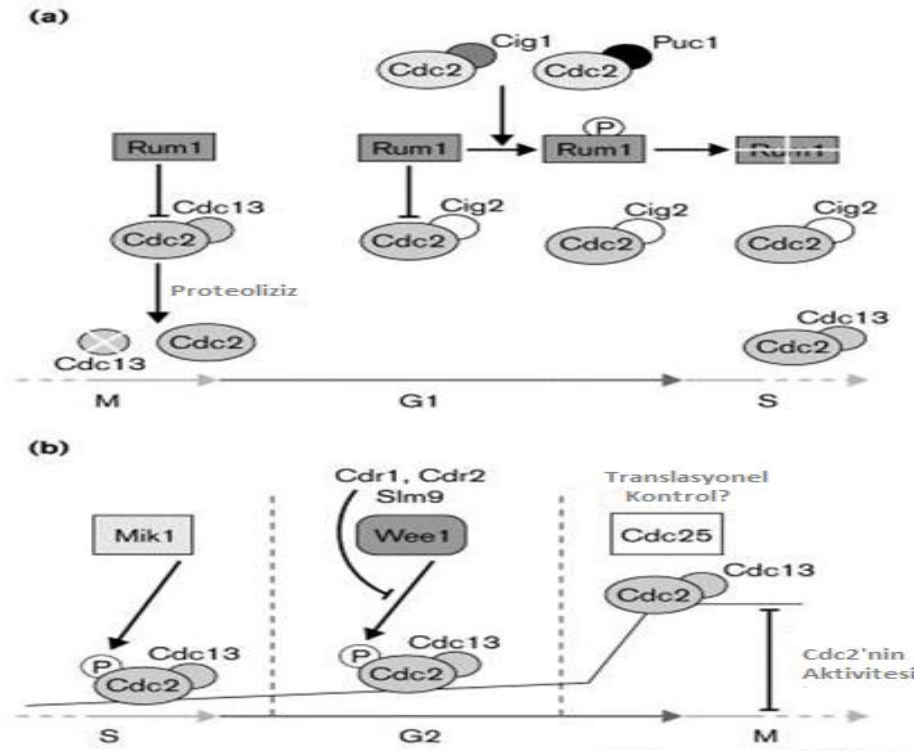
Aynı olan bir hücrede DNA'nın replikasyonunun tekrarı engellenir (rereplication). DNA duplikasyonunun ardından hücreler sonra ki M fazı için büyümeye ihtiyaç duyarlar. Bu fazda nükleusta ki kromozomlar ayrılır ve sitokinez gerçekleşir. M fazına erken giren hücrelerde, DNA replikasyonu tamamlanamadığı için sonuçta hücre ölür.

S fazı ve M fazı kontrolünde ana oyuncu siklin-bağımlı kinaz (Cdk)'lardır. Cdc2, G₁ fazında düşüktür, S faz ve G₂ faz boyunca ortalama seviyede, M fazında yüksek aktivitededir. DNA replikasyonu ve mitoz Cdc2 aktivitesine ihtiyaç duyar (Moser ve Russell, 2000).

1.2.1. Hücre Döngüsü Boyunca Siklinlerin Rolü

Yüksek ökaryotlarda, hücre döngüsünün kısmi fazlarında ki bilinen siklinler ve farklı Cdk (Siklin-Bağımlı kinaz)'ların ilişkileri ile hücre döngüsü kontrol edilmektedir. Fisyon mayalarında, Cdc2 bir Cdk' dır, hücre döngüsü regülasyonunda Cdc2'nin dört tane siklin ile ilişkisi bilinir; Cig1, Cig2, Puc1 ve Cdc13, Cdc2'nin miktarı hücre döngüsü boyunca sabittir, siklin seviyesi kararsızdır. Bundan dolayı Cdc2'nin hücre döngüsüne spesifik aktivitesi onun siklin ile ilişkisiyle sonlanır. Cig2, S fazın ana siklinidir (Mondesert vd., 1996 ; Fisher ve Nurse, 1996). Geç G₁ fazda birikir ve S fazında çıkış yaparak ortadan kaybolur. M fazı Cdc2 aktivitesi için Cdc13'e ihtiyaç duyar (Moreno vd., 1989; Booher vd., 1989). Cdc13 protein seviyesi G₁ fazında düşük fakat G₂ fazında artar ve M fazı sonlanana kadar normal seviyededir.

S fazının öncesinde, Cdc2 aktivitesi iki yoldan sonlanır. İlk olarak Cdc2-Cdc13 aktivitesi M fazı öncesinde sabittir. Cdc13 ubiquitin-driven aktivitesi ile proteoliz olur (Yamaguchi vd., 1997; Kitamura vd., 1998). 26S proteozomu tarafından çoklu ubiquitin molekülleri kovalent olarak bağlanarak degradasyona sebep olur. İkinci olarak, Cdc2' nin inhibitörü, Rum1 (mitotik anafazda ve G₁ boyunca birikir) Cdc2-Cdc13' ün kinaz aktivitesini inhibe eder ve Cdc2-Cig2 ve hedef Cdc13'ün aktivitesi değiştirir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Cdc2 ilişkili Cig1 ve Puc1 in Rum1'i fosforile ederek inhibe ettiği ve ardından Cdc2 inhibitörü Cig2'nin S fazına giriş yaptığı gözlemlenmiştir. G₁-S geçişi, Rum1'in fosforilasyonu sonucunda degradasyonu takiben Cdc2-Cig2 kompleksi S fazına girer (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. a) Cdc2 aktivasyonu ve inaktivasyonu. b) Wee1-Mik1 ve Cdc25 kontrolü (Current Opinion in Microbiology) (uyarlanmıştır).

1.2.2. S Fazının Başlaması

S fazında DNA replikasyonunun başlaması, birçok bölgede replikasyon orijinin oluşması ile başlar, replikasyon orijinin oluşması ile heteroheksomerik-orijin-tanım kompleks (ORC) orijin oluşumunu sağlar, bu bölge (pre-RC) diğer proteinler ile güçlenir (Ogawa vd., 1999). Bu proteinler ile Cdc18 ve Cdt1, Cdc18 ve Cdt1 orijinin yukarı bölgesine bağlanır. MCM2-7 replikasyon başlangıç bölgesini güçlendirir. DNA replikasyonuna izin verir. İki hücre döngüsü-spesifik protein kinaz Cdc2 ve Hsk1 pre-RC fosforilleyerek replikasyonu tetikler. Bu çalışmalar *S. pombe* ile birlikte *S. cerevisiae* ve *Xenopus*'ta yapılmıştır (Maiorano vd., 2000).

Pre-Replikasyon kompleksi: ORC kompleksi fisyon mayasında, altı alt birim içerir. SpOrc1-SpOrc6 ve Orp1-Orp6 genleri oluşturur (Lygerou ve Nurse, 1999; Moon vd., 1999). Hücre döngüsü boyunca ORC alt birimleri ve onların nükleer lokalizasyonu ve kromatin ilişkileri aynı kalır. ORC' nin modifikasyonu fosforilasyon/defosforilasyon SpOrc2' den sağlanır. Bu alt birim, Cdc2 ilişkili protein olarak (Leatherwood vd., 1996) tanımlanmıştır. M fazında fosforile edilir, Cdc2 oranı yüksektir. Mitozun tamamlanması

ve G₁ fazında SpOrc2 'nin defosforilasyonu ile olur. Defosforilasyon replikasyonun başlaması için önemlidir.

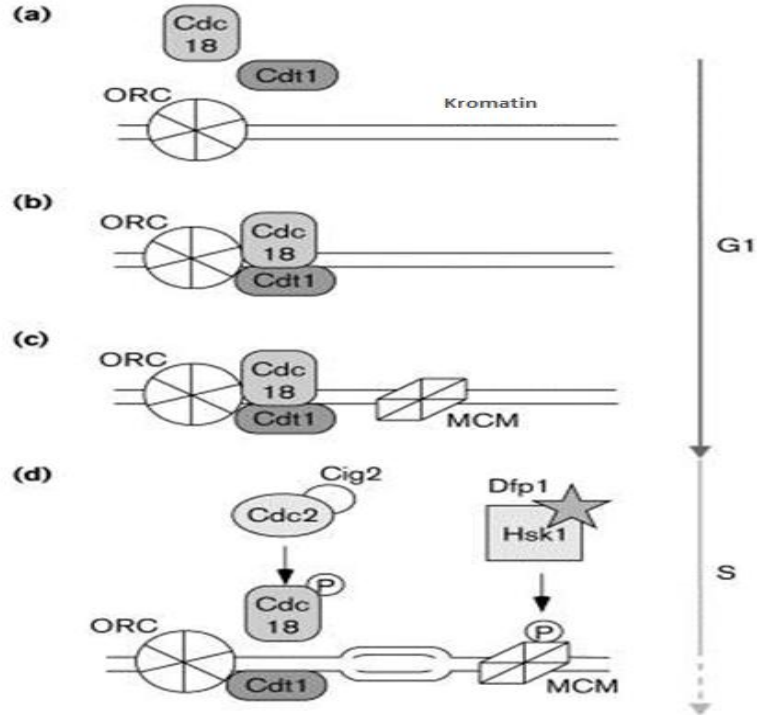
Cdc18 mitoz boyunca düşük seviyededir, hücre mitozdan çıktıktan sonra hızlıca stabilizasyonu ve miktarı artar. Cdc18 komplekste ORC ve Cdt1 ile beraberdir (Şekil 1.5). Bunlar MCM protein kompleksine de ihtiyaç duyar (Kearsey vd., 2000) (Nishitani vd., 2000). Cdt1'in, Cdc18'in yeteneğini arttırdığı, DNA sentezini devam ettirdiği tahmin edilmektedir. Güçlü ihtimal her iki proteinin DNA replikasyonunu devam ettirdiğidir. Cdc18 S fazı sonuna doğru birikir, S fazı sonu ve G₂ fazında degrade olur (Nishitani vd., 2000). Hücrede Cdt1'in miktarı eksiliyorken DNA sentezi tamamlanır, hücreler G₁ fazında birikir, Cdc18 ve Cdt1 DNA replikasyonu için gereklidir, fakat devamı için gerekli değildir. Cdt1 dizisi ökaryotlarda geniş bir şekilde korunmuştur. Ancak *S. Cerevisiae* 'da yoktur.

DNA sentezinin başlaması: Cdc18 geç G₁ fazında, muhtemelen Cdc2-Cig2 kompleksi tarafından fosforilasyona uğrar. S fazında transkripsiyonu engeller. Cdc18 'in M fazı tamamlanana kadar DNA sentezini tekrar başlatması engellenir (Baum vd., 1998). Bu regülasyon M fazı boyunca ve geç G₁ 'de gerçekleşir.

İkinci kinaz, Cdc7; tomurcuklanmış mayalarda DNA replikasyonunun başlamasına ihtiyaç duyar. Cdc7 düzenleyici alt birimi Dbf ile MCM proteini fosforillenir (Ritzi ve Knippers, 2000). Analog Cdc7-Dbf4 insanda (huCdc7, Ask) fisyon mayasında (Hsk1-Dfp1). Cdc7 benzeri, Hsk1; DNA replikasyonunda regülatör alt birimi ile beraber bulunmaktadır Dfp1 (Him1) (Brown ve Kelly, 1998; Takeda vd., 1999). Hsk1 ve Dfp1 eş zamanlı olarak kinaz aktivitesi gösterir, MCM2 (Cdc19) fosforillenmesi ile sonuçlanır (Şekil1.5). Dfp1' in normal hücrelerde seviyesi değişkendir. G₁-S fazı geçişinde pik yapar. S fazı hedefli hücrelerde Dfp1 miktarı yüksektir. S fazına giren hücrelerde Dfp1 oranı azalır, Hsk1 seviyesi mitotik hücre döngüsü boyunca değişmez, G₁-S ile Hsk1 aktivitesi ve Dfp1 ile birliktedir. Dfp1'in yüksek fosforilasyonu G₁-S fazı ve S fazı boyunca yüksektir ve hücreleri S fazında tutar (Takeda vd., 1999 ; Brown ve Kelly, 1998). Dfp1 fosforilasyonu normal hücre döngüsü devamlılığı için gereklidir ve kinaz olarak tanımlanır. Dfp1 fosforilasyonu kısmi olarak azalabilmektedir.

Sonuçta Hsk1'in inaktivasyonu için in vitro Hsk1'in, Dfp1 ile fosforile edildiğinden beri; Birçok moleküler mekanizma DNA replikasyonunun başlamasını

sağlayabilir, hücre döngüsü kısa periyotlarla limitlenebilir. Alternatif olarak Dfp1 fosforilasyon stabilizesini takiben Hsk1 birikir.



Şekil 1.5. G₁/S fazında DNA replikasyonu (Current Opinion in Microbiology) (uyarlanmıştır).

Re-Replication sınırlanması: Genomda DNA replikasyonu birçok bölgede eş zamanlı olarak başlar. Her hücre döngüsünde bir kez DNA replikasyonu yapılır, her orijinde bir kontrolle ateşlenir. Bu replikasyon aynı DNA'nın tekrar replikasyonu sonucu, poliploid hücreler oluşur. Fisyon mayalarında normal DNA replikasyonu için gerekli birçok protein vardır, rereplication içinde durum aynı şekildedir. Bu proteinler arasında Cdt1, Cdc18, MCM2 ve MCM4 (Kearsey vd., 2000) yani bütün pre-RC'nin elemanları bulunur.

1.2.3. M Fazının Başlaması

G₂ fazı sonlandığında hücreler kritik genişlik seviyesindeyken, Cdc2-Cdc13 aktivitesinin başlamasıyla M-fazı indüklenir. Cdc2 ve Cdc13'ün S fazındaki ilişkisi ve Cdc13'ün G₂ boyunca ilişkili kalması, Cdc2'nin Tyr15'ten fosforilasyonu ile aktiviteleri düşük seviyede korunur. Cdc2 fosforile olur Tyr15' ten sonra hücreler S faza girmeye başlar. Ardından M fazı tetiklenir. Cdc25, Cdc2'yi Tyr15'ten defosforile eder. Cdc2'nin aktivasyonu iki kontrol noktasını harekete geçirir; Bunlar, Cdc25'in aktivasyonu ve Wee1 ile Mik1'in inaktivasyonudur (Şekil 1.4b). Wee1 kinaz Nim1/Cdr1 tarafından inhibe edilir ve kinaz ilişkili Cdr2 için işlevsel rol; Wee1 direk kinaz aktivitesine yönelik değildir, fakat Nim1/Cdr1 ve Cdr2 bağımsız olarak tanımlanmıştır (Wu ve Russell, 1993).

Mitotik kontrol proteinlerinin izolasyonu, slm9; Cdc2 regülasyonunun karmaşıklığını arttırmaktadır (Kano ve Russell, 1998). Genetik çalışmalar Nim1/Cdr1 ve Cdr2 içeren farklı bir mekanizmalar ile sağlanan Wee1 inhibisyonu yoluyla, slm9-Cdc2 aktivitesi sağlar. İlk olarak, Wee1 ve Mik1 rolleri çok fazla benzer gözükmektedir. Yani yapılan araştırmalar Mik1 ve Wee1 aktivitesinin birazda olsa farklı olduğunu göstermektedir. Mik1'in, mRNA ve protein seviyesi S fazında artmaktadır (Baber-Furnari vd., 2000; Christensen vd., 2000). Bu Wee1'den farklı olarak, hücre döngüsü boyunca korunmaktadır. Bunların sonucunda Mik1 proteini varlığı baskındır, S fazının korunması için önemlidir, Cdc2-Cdc13 aktivitesi DNA replikasyonu ile sınırlanır. M fazına erken girmesini engellemek için. Mik1'in kısmi azalması, olasılıkla proteolitik mekanizma aktivitesidir (Baber-Furnari vd., 2000). Wee1, Cdc2'yi G₂ fazı boyunca inaktif tutar (Şekil 1.4b).

M fazında bir diğer önemli kontrol noktası da son kinetokorun tutulmasının ardından kardeş kromatitlerin birbirinden ayrılmasıdır. Cdc2-Cdc13 kompleksi tarafından uyarılan APC (Anafazı teşvik edici karışım) adı verilen protein kompleksi, Cdc20 ile birleşir. Ardından inaktif seperaz enzimine bağlı, sekürin proteini APC tarafından ubiquitin etki ile proteoliz edilir ve aktif seperaz enzimi oluşur. Seperaz enzimi kardeş kromatitler arasındaki kohezin kompleksini yıkarak anafazı başlatır. S fazında Cdc2-Cig2 birikimi, M fazında; Cdc2-Cdc13 birikimi ve kardeş kromatitlerin ayrılması ile birlikte bir diğer kontrol noktası da G₁ ve G₁/S fazında p53 tarafından DNA hasarı

kontrol yapılmaktadır. Mdm2-p53 kompleksinden kinaz aktivitesi ile ayrılan p53 DNA hasarı kontrolü yaparak G₁ fazı geçişine izin verilir.

1.2.4. Cdc25 Nasıl Regüle Edilir?

Cdc25 hücre döngüsü boyunca kararsızdır, M fazında pik yapar (Moreno vd., 1990). İmmüno-lokalizasyon analizleri bu çalışmaları doğrulamıştır ve anafaz yönündeki noktalarda (M fazı kromozom ayrılması periyodunda tanımlanmıştır) Cdc25 birikimi aniden azalır (Lopez-Girona vd., 1999). Cdc25'in miktarının kontrolü, translasyon faktörü eIF4A'nın kontrolünde (ökaryotlarda) *S. pombe*'de tifl ile kodlanmaktadır (Daga ve Jimenez, 1999). Tifl'in temel rolüne rağmen translasyon için birçok protein vardır, koşullu mutasyonlarda birçok proteinin aktivasyonu inhibe edilir. Dolayısıyla, bu hücreler büyümmez, G₂ de tutuklanır. Hücrelerde Wee1 ve Cdc25 eksilir ve G₂ atlanır. Bu durum tifl mutasyonuna bağımlı Cdc2'ye etki etmektedir. Ayrıca genetik datanın güçlü önerisi, translasyondaki kısmi azalma, cdc25 fonksiyonunun azalması ile M fazına girişi inhibe etmektedir. Ek olarak (aslında), Tifl'in aktivitesinin azalması sonucunda Cdc25'in seviyesi ciddi oranda düşer. Translasyon azalması belirir.

Sonuçta, Cdc25 mRNA'sı, tifl'in değişimine hassasiyet gösterir. İlginç olarak Cdc13 eş zamanlı olarak tifl inaktif hücrelerde azalır. Bu mitotik regülatörler Cdc25 ve Cdc13'ün translasyon kontrol mekanizmaları olağandışı bir şekilde ortakır. Bunlar 5' UTR'yi ortak olarak paylaşır. Eğer Cdc25 ve Cdc13'ün yüksek hassasiyet değişimi hücre protein mekanizmasını değiştirmiyorsa, Cdc25 ve Cdc13 hücre bölünmesi ve büyümesinde koordineli olarak çalışır.

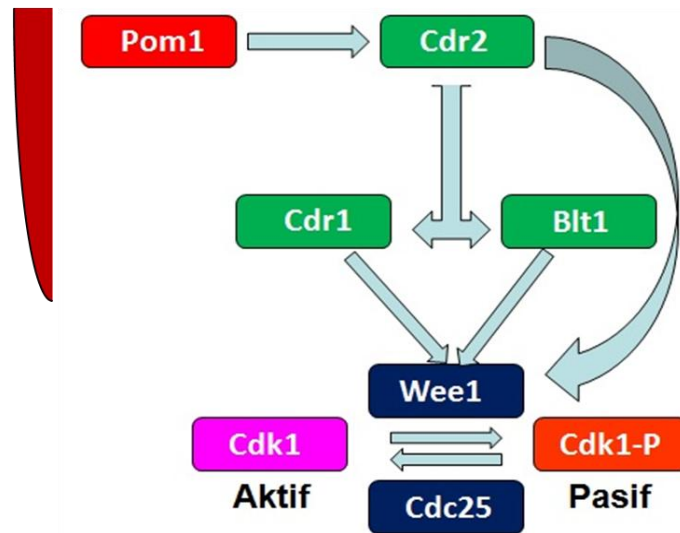
1.2.5. *S. pombe*'de Hücre Boyut Mekanizması

Fisyon maya hücreleri çubuk şeklinde olup ve asimetric şekilde sabit bir genişliği koruyup yalnızca uzunluğunu arttıran hücrelerdir. *S. pombe*'de yapılan çalışmalarda, hücre boyutu ölçülmesi için kullanılan bir mekanizma tespit edilmiştir (Martin ve Berthelot- Grosjean, 2009; Moseley vd., 2009). Birçok ökaryotik hücre tipinin boyut-bağımlı hücre döngüsü geçişi kontrolü sıklıkla bulunan siklin-bağımlı kinaz Cdk1 tarafından kontrol edilir (Mitchison, 2003–Dolznig vd., 2004). Cdk1 aktivitesini kontrol eden hücre boyutu izleme ile bağlantılı proteinler tanımlanmıştır. Fisyon mayası *S. pombe*'de, hücre mitoz girer ve Cdk1' in düzenleyici kontrolü sayesinde bölündüğü ve mitoz girirdiği saptanmıştır. (Jorgensen ve Tyers; 2004; Rupes,

2002). Bu boyut arttırma prensibi basittir: mitotik aktivatör Cdk1 hücrenin ortasında bir bölgesinde lokalize edilir ve aktivatör inhibitörü, hücre kutuplarından yerleşik bir gradyan ile düzenlenmiştir. Böylece hücre büyüdükçe, inhibitör miktarı mitozu yönlendiren mitotik siklin aktivitesinde artışa yol açan aktivatör ile etkileşimi azaltır. Spesifik bir boyut kontrolörü olarak tanımlanan ilk protein Wee1, sikline-bağımlı kinaz (Cdk1) aktivitesini Tyr15' ten fosforilleyerek sınırlamaktadır. Mitoza giriş için hız-sınırlayıcı Cdc25 tarafından fosfat çıkarılır (Russell ve Nurse, 1987; Nurse, 1990). Böylece, mitozu giriş sistemlerinde tekrarlanabilir hücre boyutunun kontrolü Wee1 ve Cdc25 kontrolü ile koordine edilir. Wee1 ve Cdc25' i düzenleyen çeşitli faktörler tespit edilmesine rağmen, hücre boyutu ve Wee1-Cdc25-Cdk1 modülü arasındaki bağlantıları pek anlaşılamamıştır. Bu negatif Wee1 sinyallerini düzenleyen Cdr2'nin interfaz hücrelerinin ortasına bir bant şeklinde lokalize olduğu gösterilmiştir (Morrell vd., 2004). Mekansal boyutu algılayıcı modelde, Wee1-inhibitör kinazlar Cdr1 ve Cdr2 (Coleman vd., 1993; Kanoh ve Russell, 1998), kendilerini inhibe eden, daha çok hücre morfolojisi ve büyüme üzerindeki etkileri ile tanımlanan bir kinaz Pom1 ile faaliyet göstermektedirler (Bahler ve Pringle, 1998). Pom1 hücre porlarından çıkan mekansal bir gradient içinde lokalize olurken, cdr1 ve cdr2 hücrenin ortasındaki kortikal boğumlarda lokalize olurlar (Morrell vd., 2004) Cdr2 diğer proteinlerin hiyerarşik lokalizasyonunu kurar ve Pom1'den negatif düzenleyici sinyalleri alır. Pom1 hücrenin uçlarından ortasına doğru polar bir gradient oluşturur ve Cdr2 yolağında mitozu girişte doza-bağımlı inhibitör olarak etki gösterir. Hücrenin uzaması gibi, Pom1 düzeyi mitozu girişte artarak, hücrenin ortasında azalır. Pom1'in polar gradienti ve medial kortikal düğümlerinde hücre boyutu hakkında bilgi oluşturulması, Cdk1 yolağıyla Pom1, Cdr2, Cdr1 ve Wee1 ile düzenlenir. Mitoza girişten sonra, miyozin II sitokinez faktör bir sitokinetik halka oluşturmak üzere yoğunlaşır (Wu vd., 2003). G₂ sırasında bu orta düğüm kısmında Cdr2 varlığı, G₂-M geçişinde Wee1 inhibisyonuna katkıda bulunur. Bu olasılığı araştırmak için, medial düğümü analiz edilmiştir. Bulunan protein Blt1 daha önce karakterize edilmemiştir (SPBC1A4.05 olarak ta bilinir), proteomik yaklaşım kullanılarak tanımlanmıştır, Mid1 ile birlikte medial interfaz düğümlerinde lokalize olmuştur. Ayrıca, Blt1-Mid1, Blt1-Cdr2 ve Cdr2-Mid1 arasındaki fiziksel etkileşimleri ortak immunopresipitasyon tarafından tespit edilmiştir. Cdr2-ilişkili kinaz Cdr1, direkt

olarak Wee1'i in vitro fosforiller ve inhibe eder, Blt1 ile birlikte lokalize olurlar (Şekil 1.6).

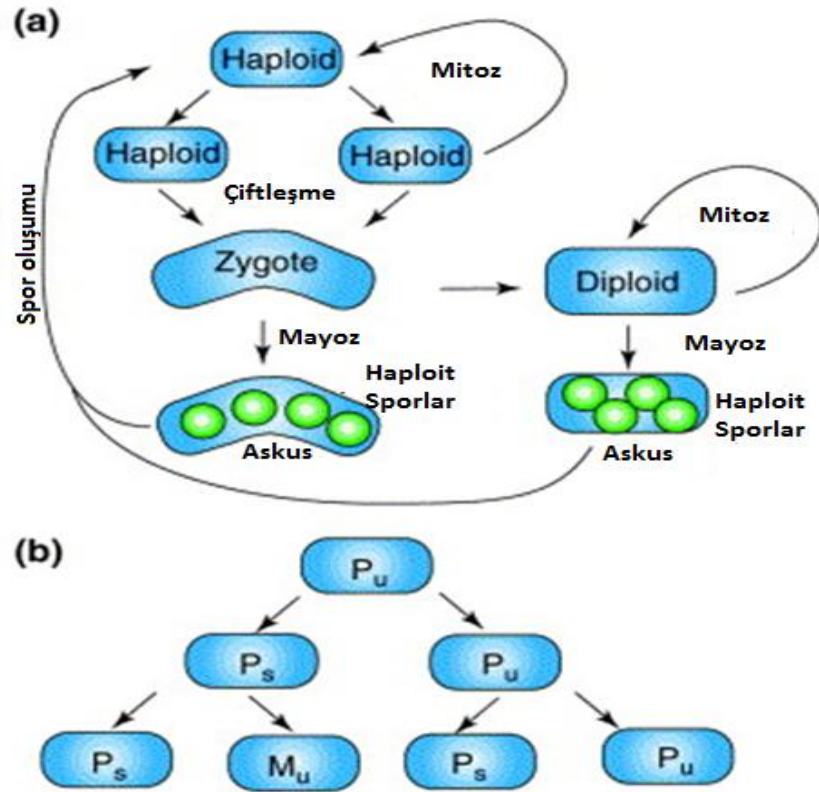
S. pombe boyut kontrol çalışmalarında mekansal olmayan mekanizmalar beklenmektedir. Cdc13' ün birikiminin geçiş sürecini kontrol ettiği önerilmiştir (Sveicz vd., 2001) ancak çoğu çalışma Wee1 ve ya Cdc25-aracılıklı mekanizmalara odaklanmıştır. Cdr2 ve Cdr1 kinazlar tarafından Wee1 düzenlenmesi esas olarak hücre boyutu besin modülasyonu ile ilişkili olduğu (Breeding vd., 1998; Young ve Fantes, 1987; Belenguer vd., 1997), boyut algılama mekanizması daha çok Cdc25' e bağlanmıştır. Önceki çalışmalarda Cdc25' in (Cdc13 yerine daha çok) bir birikim mekanizması ile mitozu indüklediği öne sürülmüştür (Moreno vd., 1990), Cdc25 seviyesinin hücre döngüsü tutuklama sırasında arttığı bulgular, hücre büyümesi ve Cdc25 sentezi arasındaki bağlantıyı güçlendirdiği önerilmiştir (Kovelman ve Russell, 1996; Rupes vd., 2001). Bu çalışmalar kesin olmaktan uzak olmasına rağmen, cdc25-bağımlı translasyonel ayırıcı, bir pom1-cdr2-wee1 mekansal sensor ile birlikte hareket ediyor olabilir. Ayrıca, Cdc2' de mutasyona uğramış iki anahtar fosforilasyon bölgesi ile hücrelerde bölünme uzunluğu büyük olsa da tutarlı bir korunması, diğer yolların mitotik boyut kontrolünü içermesi gerektiğini göstermiştir (Coudreuse ve Nurse, 2010) Bu veriler birlikte ele alındığında, birden fazla boyut algılama mekanizması fisyon mayada faaliyet göstermektedir.



Şekil 1.6. Hücre Boyut Kontrolü Mekanizması (Blt1 ve Cdr1 birlikte lokalize olur) Cdk1-P (fosforile olmuş inaktif Cdk1).

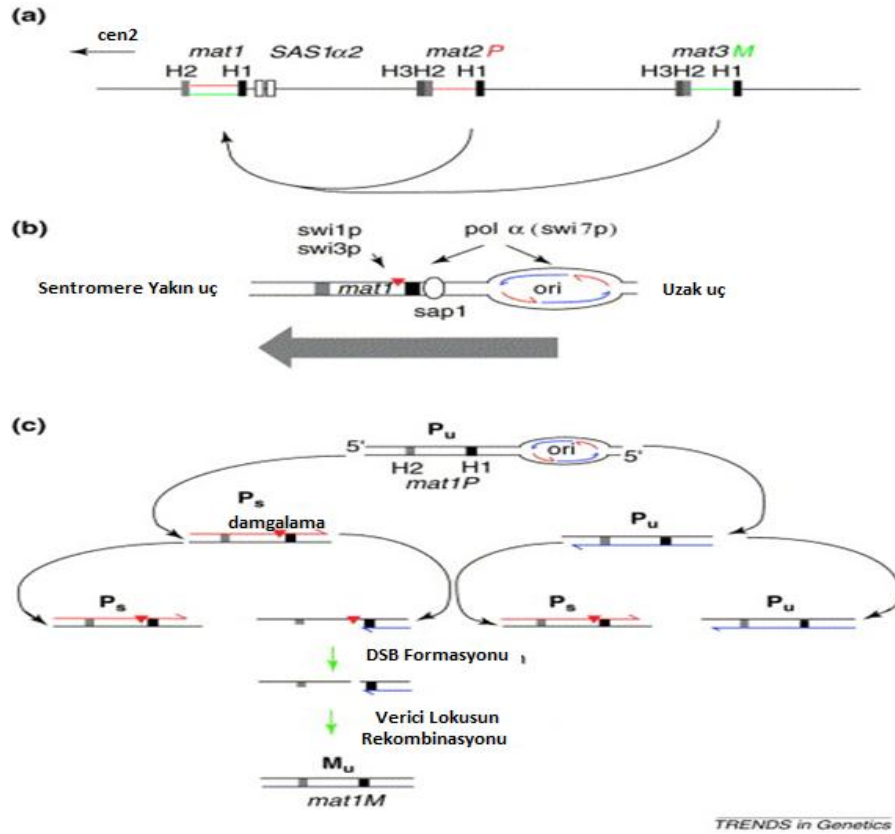
1.2.6. *S. pombe*' de Çiftleşme Tipi Aktarımı

S. pombe' de haploit yaşam döngüsü hakimdir (Şekil 1.7a). *S. pombe* hücreleri iki farklı çiftleşme tipine sahip olabilir, artı olarak adlandırılan (P) ve eksi (M). *S. pombe* hücreleri özellikle nitrojen kaynaklı besinsel açlık durumunda cinsiyet farklılaşma için gelişimini başlatırlar. İki zıt çiftleşme türü, P ve M adlandırılan zigot formlardır. Eğer beslenme koşulları kötü ise çiftler, zigotlar mayoza girer ve sporulasyon programı başlar (zigotik sporulasyon). Genellikle zigot, mayoz ve sporulasyona geçer. Bazen de, zigot mitoz girebilir, diploit ırklar meydana getirir. Yeni bir hücre bölünüyorken ('değiştirilemez'), iki yavru hücrenin gelişim programları farklı olduğu görülür. Bir hücre değiştirilebilir, bir sonra ki hücre bölünmesi değişmiş ve değiştirilebilir bir hücreye olanak verir, diğer hücrede ise aynı tip çiftin (anneden mirası koruyarak) değiştirilebilir ve değiştirilemez hücresi üretilir. *S. pombe* hücrelerinin dikkat çekici çiftleşme aktarımı paternleri Şekil 1.7b' de gösterilmiştir.



Şekil 1.7. a) *S. pombe* haploit yaşam döngüsü. b) Çiftleşme paternleri gösterimi (s: switchable, u : unswitchable) (Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S., TRENDS in Genetics Vol.17 (3) 2001) (uyarlanmıştır).

S. pombe'nin çiftleşme aktarımı *mat1* lokusunun alternatif alleleri ile sonlanır (Egel, 1977) (Şekil 1.8a). İki transkripsiyonel sessiz çiftleşme kasetleri, *mat2P* ve *mat3M*, P ve M bilgisi, sırasıyla, *mat1* ikinci kromozomda lokalize olmuştur (Beach, 1983; Kelly vd., 1988). Bu kasetler pek çok *trans*-acting faktörler ve *cis*-acting diziler ile transkripsiyonları susturulur (Klar vd., 1998). Benzer şekilde *S. Cerevisiae*'de çiftleşme aktarımı rekombinasyon ile verici lokusun kopyası ve *mat1*'in ekprese olmasıyla gerçekleşir (Beach, 1983; Beach ve Klar 1984). Genetik deneyler değiştirilebilir hücrelerde *mat1* lokusunun damgalanabileceğini göstermiştir (Egel ve Eie, 1987; Klar ve Bonaduce, 1993) (Şekil 1.8b ve 1.8c).



Şekil 1.8. *S. pombe*'de cinsiyet oluşumu (Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S., TRENDS in Genetics Vol.17 (3) 2001) (uyarlanmıştır).

Çiftleşme feromonu çeşitli mikroskobik canlıların çiftleşme öncesinde hücre-hücre iletişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte *S. pombe*'de, çiftleşme feromon sinyali temel olarak mayozun başlatılması için gereklidir (Egel, 1973; Kelly

vd., 1988; Kitamura ve Shimoda, 1991; Leupold vd., 1989; Obara vd., 1991; Tanaka vd., 1993; Willer vd., 1995). *S. pombe* hücre eşleşme tipi hücreleri Mat1 genini kromozom II' de h^+ hücrelerde Mat1-P ve h^- hücrelerde Mat1-M DNA kaseti olarak belirlenmektedir. Her ikisi de sırasıyla farklılaşmış-transkript genleri içerir, mat1-Pc ve mat1-Pi (Pm) ile mat1-Mc ve mat1-Mi (Mm) genlerinden oluşur (Kelly vd., 1988). Mat1-Mc ürün HMG ailesi proteini iken, başka bir Mat1-Pi bir ürünü bir homeobox proteindir (Kelly vd., 1988; Sinclair vd., 1999). Bunların böylece transkripsiyon faktörleri olması muhtemeldir, Mat1-Pc ve Mat1-Mc beslenme açlığına yanıt olarak ifade indüksiyonunda yer almaktadır. Bu iki genin hücre ekspresyonu üzerine çiftleşme feromon sinyalleri birbirleri ile iletişim kurmak için başlar. P-faktörü h^+ hücreleri tarafından salgılanan feromon (Imai ve Yamamoto, 1994) ve M-faktörü h^- hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Davey, 1992) (Kitamura ve Shimoda, 1991) (Şekil 1.9).

1.2.7. *S. pombe*' de Mayoz Bölünme ve Sporulasyon

Hücre geleceğini belirleyen temel bir yönde, kararlı bir fenotipin harici bir sinyal tarafından uyarılan, gen ekspresyonu ile geçici değişiklikler sağlamasıdır. Önemli ve son derece koordineli bir hücre geleceği kararı, gametogenez olarak bilinen bir süreçte diploit progenitor hücrelerden gamet üretimi (cinsiyet hücreleri)'dir. Gametogenezin bir önemli yönünde diploit genom progenitor hücreleri, gamet üretmek için birbirini takip eden iki kromozom segregasyon tarafından haploit hale indirgenmesi sırasında özel bir hücre bölünmesi, mayoz bölünme olur (Masayuki vd., 1996).

Mayoz ökaryotik organizmalarda eşeyli üreme için çok önemli bir adımdır. Mayoz hücre döngüsü haploit ürünleri, erkek hayvanlarda dişi hayvanlarda ve sperm yumurta oluşumu ile sonuçlanacak premayotik DNA sentezi ve birinci ve ikinci mayoz bölümler (mayoz I ve II)' den, oluşmaktadır (Werven ve Amon, 2011) Mayoz I' de redüksiyonun bozulmaz ve mayoz rekombinasyona bu bölünme ile eşlik eder. Mayoz II kardeş kromatitleri eşit olarak ayırır. Mayoz hücre döngüsü son derece korunmuştur, sadece hayvanlar değil, bitkiler, mantarlar ve mayalar arasında da korunur. Mayalarda gametlerin yerine haploit sporlar oluşmaktadır. Bununla birlikte zigot, zengin besiyeri kaybedilmeden önce diploit olarak çoğalabilir. Diploit hücreler zengin beslenme altında mitotik çoğalırlar ve doğrudan vejetatif büyüme (azigotik sporlanma) sonunda mayoz ve sporulasyona girerler.

1.2.7.1. *S. pombe*' de sporulasyonun başlaması

S. pombe ve *S. cerevisiae* yaklaşık 330–420 milyon yıl önce birbirinden ayrılmıştır. İki Ascomycete mantar böylece birbirinden evrimsel olarak yüksek ölçüde ıraksak olmaktadır (Sipiczki, 2000). Bu farklılığa rağmen, tomurcuklanan mayada sporlanma programına giriş için önemli olan sinyaller ve yolların birçok fisyon mayasında da faaliyetlerini sürdürmektedir. *S. pombe*' de vejetatif döngü haploittir. Fisyon mayasının çiftleme formu diploittir, fakat bu durum geçicidir. Çiftleşme formuna eşlik eden fisyon maya hücreleri mayoza geçerek sporulasyon programını başlatır ve dört hücreli haploit formu oluşturur. Böylece, fisyon mayasında besin sınırlandığı zaman çiftleşme-sporulasyon programı başlatılır. Açlık sınırlamasına cevap olarak, fisyon mayası G_1 evresinde tutulur, karşıt cins h^+ ve h^- çiftleşir ve konjugasyona geçiş olur. Elde edilen zigot mayoza uğrar ve haploit sporlar oluşur. Gamet oluşumunu başlatan proteinler tomurcuklanan maya ve fisyon mayası arasında korunmamıştır. Ime1 *S. pombe*'de bulunmaz, fakat Ste11 tomurcuklanan mayada bulunan master transkripsiyon faktörü ile analogdur hücrelerin sporlanma programına girmelerini belirler. Konjugasyon sporulasyon ile sıkıca birlikte olduğu gibi, Ste11'in çiftleşme regülasyonunu düzenlemesi de şaşırtıcı değildir.

1.2.7.2. Ste11: *S. pombe*' de cinsiyet farklılaşması ve sporulasyonun düzenlenmesi

Tomurcuklanma mayasında Ime1' de olduğu gibi, çok sayıda dış sinyal $ste11^+$ promoteri üzerinde birleşir. *S. pombe* açlık sınırlanmasına cevap olarak gametogeneze girer ve glukoz, mayoz ile sporlanma için önemli genlerin ekspresyonu üzerinde inhibitör etki yapar. Bu besinsel sinyalleri $Ste11^{+}$ in ifadesi ile kontrol edilir. $Ste11^{+}$ ikincil bir konstitütif gen olarak ifade edildiğinde, çiftleşen hücreler besin varlığında daha fazla spor oluşturur (Sugimoto vd., 1991). $Ste11^{+}$ etkinleştirildiğinde, çiftleşme ve sporlanma erken dönemleri için gerekli genlerin transkripsiyonuna neden olur. Ayrıca, $Ste11^{+}$ dolaylı olarak sporlanmada çiftleşme-tipi kontrolü içerir. Son olarak, tomurcuklanan mayada solunum aktivitesi sporlanma için gereklidir (Jambhekar ve Amon, 2008). Bununla birlikte, çiftleşmenin $Ste11^{+}$ promotörü üzerinde sinyal etkisi yoktur. $Ste11^{+}$ in kontrolü besin algılama yolları ile kontrol edilir.

1.2.7.3. TOR sinyallerinin baskılanması; Ste11

Tomurcuklanan mayada olduğu gibi TOR sporlanma sinyallerini kontrol eder. Isıya duyarlı bir $tor2^+$ alleli kullanımı yoluyla TOR sinyal kaybı ile inaktif TOR bir G_1 tutuklanmasına neden olmaktadır, cinsiyet farklılaşması ve daha sonra sporlanma başladığı gösterilmiştir (Matsuo vd., 2007; Alvarez ve Moreno, 2007) (Şekil 1.9).

Buna göre, $tor2^+$ inaktivasyonu da $ste11^+$ transkripsiyonu ile sonuçlanır. Bu TOR sinyalinin gametogenezde önemli bir regülatör olduğu açık olmasına rağmen, TOR sinyalinin $ste11^+$ 'i nasıl baskı altına aldığı bilinmemektedir. Tomurcuklanan mayadan farklı olarak, TOR sinyallerinin transkripsiyonel regülatörler tarafından tanınarak kontrol edilir. Bu TOR sinyalleri $ste11^+$ transkripsiyon aktivitesini düzenler, bunun aynı zamanda $Ste11^+$ aktivitesi olduğunu belirtmek gerekir. Tor2, Ste11 ve mei2 etkileşimi, sporlanmaya giriş için kritik bir faktördür, aşağıda açıklanan kendi hücrel fonksiyonu inhibe eder (Alvarez ve Moreno, 2006). Ayrıca, PKA ve TOR, Ste11 lokalizasyonunu ve kontrolünü, Ste11 bağımlı transkripsiyonu düzenlemek için birlikte hareket ederler (Valbuena ve Moreno, 2010). Böylece, TOR sinyal etkileri sonucu $ste11^+$, çeşitli şekillerde bu çiftleşmenin sağlanması ve sporlanmanın besin açısından zengin koşullar altında meydana gelmesini engeller.

1.2.7.4. Sporulasyonun çiftleşme-tipi kontrolü: *S. pombe*' de sporulasyonun pat1 ile engellenmesi

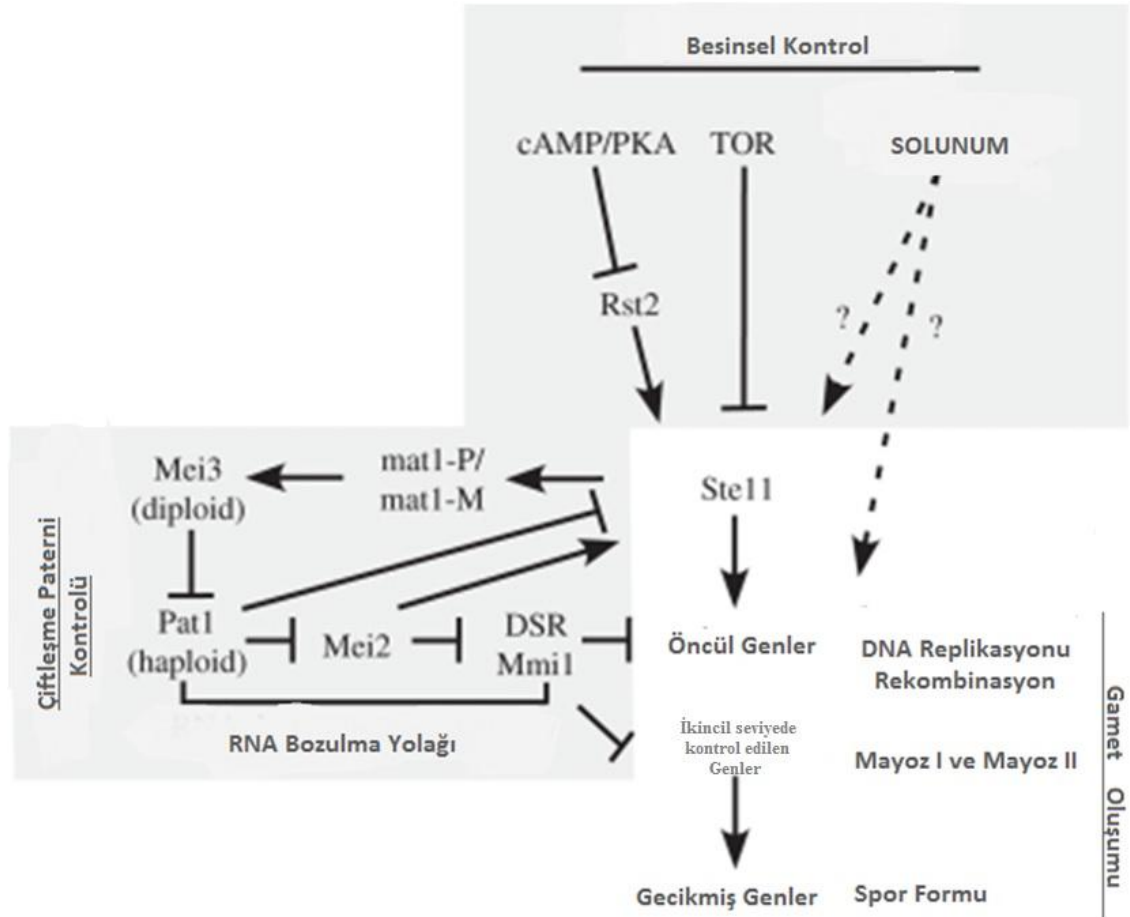
Haploit fisyon maya hücreleri, haploit tomurcuklanan maya hücreleri gibi, mayoz ve sporlanmayı başlatamaz. Her iki türde de, sporulasyon birbirine eş iki hücre tarafından temsil edilir. *S. pombe*'de sporulasyonun baskılanma mekanizması *S. cerevisiae* den farklıdır, çünkü sporulasyon ve çiftleşme kontrolü *S. pombe*'de birleşik olduğundandır. *S. pombe* haploit hücrelerde, sporlanma programına giriş Pat1 adı verilen bir protein kinaz ile bastırılır (Li ve McLeod, 1996; Kitamura vd., 2001) (Şekil 1.9). Pat1 iki tane erken sporlanma proteinlerinin aktivitesini bastırmıştır.

İlk olarak, Pat1 Ste11'i fosforile eder. Bu Rad24 ve Ste11'in transkripsiyonel aktivitesinin inhibisyonuna neden olur (Li ve McLeod, 1996; Kitamura vd., 2001). İkinci olarak, Pat1 erken mayozda DNA sentezinin başlatılması dahil olmak üzere sporlanma erken aşamaları için gerekli olan mei2 olarak bilinen bir RNA-bağlayıcı proteini fosfatlar (Kitamura vd., 2001; Watanabe ve Yamamoto, 1994) (Şekil 1.9). Pat1

tarafından mei2 fosforilasyonu ubiquitin-aracılı bozulma için proteini hedefler (Kitamura vd., 2001). Isıya dayanıklı mutant Pat1 tarafından Mei2 fosforilasyonu ile haploit hücreler ölümcül bir mayoza girer (Watanabe vd., 1997).

Mei2 mayoza giriş programını nasıl teşvik ediyor? Mei2 sporulasyon-spesifik transkripsiyonu kaldıran seçici (DSR)–Mmi1 sonlandırma RNA degradasyon sistemini düzenler (Harigaya vd., 2006) (Şekil 1.9). Mmi1, YT521-B homoloji (YTH) ailesinin bir RNA bağlayıcı protein üyesidir ve 30 UTRs öge içeren erken ve orta evrede mayoza transkript olarak bağlanır. Daha sonra, Mmi1;Pab1 ile etkileşir, bir polyA-bağlayıcı protein ve eksozom, RNA degradasyonu ile ilgili bir protein kompleksi, mayotik mRNA'lar ile etkileşime girer (Harigaya vd., 2006; Yamanaka vd., 2010) Mei2, Mmi1'e bağlanarak DSR-Mmi1 engeller. İki protein arasındaki etkileşim, çekirdekteki bir nokta benzeri bir yapı olarak görülebilir (Harigaya, vd., 2006). Sme2⁺ odağı tarafından kodlanan poliadenilat meiRNA, bu odak tarafından bulunan, mei2 ile etkileşimi mei2-Mmi1 nükleer lokalizasyonu için gereklidir (Watanabe ve Yamamoto, 1994; Harigaya vd., 2006; Yamashita vd., 1998). Bununla birlikte, mei2-Mmi1 karmaşık meiRNA rolü anlaşılmış değildir. Diploit hücrelerde özellikle de, Pat1 mei2 inhibisyonu için bağlanır ve DSR-Mmi1 inaktif olur. Ste11 dolaylı da olsa, bu inhibisyonu beraberinde getirmektedir (Şekil 1.9). Çiftleşme Ste11'in rolünün bir parçası olarak, transkripsiyon faktörü mat1-Mc/mat1-Mm (h⁻ hücreleri) ve Mat1-Pc / Mat1 Pm (h⁺ hücrelerde), Mat1-lokusa kaynaklı genlerin ifadesini indükler (Sugimoto vd., 1991). Diploid hücrelerde, Mat1-Pc ve Mat1-Mc bir feromon sinyali üretmek için ve sporlanma için gerekli olan Mat1-Pm ve Mat1-Mm, transkripsiyon etkinleştirmek için ilk indüklenir (Willer vd., 1995). Mat1-Pm, bir homeodomain protein ve Mat1-Mc, yüksek hareket kabiliyetine sahip grup (HMG) kutu protein, sinerjik mei3⁺ geninin transkripsiyonu aktive eder (Willer vd., 1995; McLeod vd., 1987) (Şekil 1.9). Mei3, Pat1 kinaz aktivitesini inhibe eder. Proteinler diğer substratların protein kinaz aktivitesini inhibe edici psödosubstrat olarak hareket ederler (Li ve McLeod, 1996) Mei3⁺ ektopik haploit hücrelerde ifade edildiğinde, bir öldürücü mayoza girecektir (Wang vd., 1998). Ste11⁺ promotörü, Ime1 promotörü gibi, çiftleşme-sporlanma programı başlatmak için beslenme sinyalleri ile bütünleşir. Ancak Ime1 aksine, kendi transkripsiyonu yerine, Ste11 sporlanma üzerinde çiftleşme tipi kontrol kurmak için gereklidir. Bu farklılıklar muhtemelen yaşam döngüsünde ki farklılıkları yansıtmaktadır. Tomurcuklanan mayada çiftleşme tipi ve

sporulasyon birleşik değildir, fisyon mayada ise ikisi de sıkıca birleşmiştir. Bu birleşme $Ste11^+$ tarafından sıkılaştırılır. Bu nedenle, $Ste11^+$ haploit ve diploit hücrelerde her ikisinde de aktif olmalıdır, çiftleşme tipinin kontrolü $Ste11^+$ aktivasyonu gerektirmektedir.

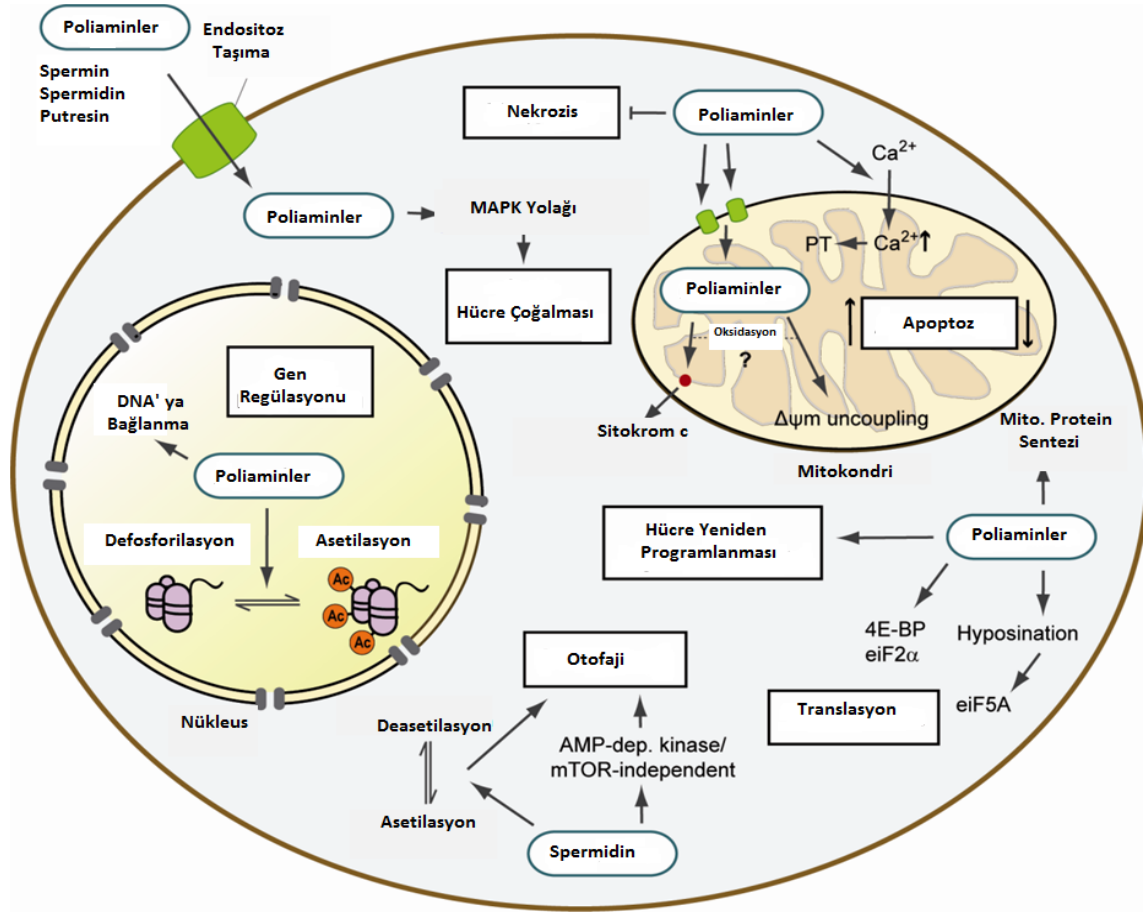


Şekil 1.9. *S. pombe*’ de sporulasyona giriş sinyal kontrol yolağı (F. J. van Werven ve A. Amon, 2011) (uyarlanmıştır).

1.3. Poliaminler ve Stres İlişkisi

Poliaminler (PA), tüm canlı organizmalar için her yerde (halofiller ve metanojen arkerler hariç) var olan düşük molekül ağırlıklı alifatik katyonlardır. Bunların ilk keşfi 1678 gibi erken bir tarihte insan menisinden gelen "üç taraflı" kristaller olarak tanımlanmıştır (van Leeuwenhoek, 1678). Ladenburg ve Abel (1888), bu bileşiği "spermin" olarak adlandırılıyorken Schreiner (1878) ise, bir organik baz olarak, bu yeni bileşiği tanımlamıştır. Putresin (Put) $[NH_2(CH_2)_4NH_2]$, spermin (Spm)

[NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH₂], ve ilişkili baz spermidin (Spd) [NH₂(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH₂] Rosenheim (1924) tarafından ilk kez bugün bildiğimiz poliaminler (PA) olarak sentezlenmiştir (tarihsel açıdan mükemmel bir inceleme için 'Bachrach 2010' bakınız). Poliaminlerde bulunan en karakteristik özellik; belirlenen uzaklıkta ve barındırdıkları metilen gruplarının varlığıdır. Poliaminlerde ki bu metilen grubunun bir bütün olarak PA aktivitesini etkileyen, hidrofobik etkileşimlere dahil olduğu bilinmektedir (Wallace vd., 2003). Bunların keşfinden beri, fizyolojik poliaminler putresin, spermidin ve spermin hücresel fonksiyonları çalışmanın odak noktası haline gelmiştir. PA'lerin hücrede çeşitli temel süreçlerine katıldığı ve nükleus dahil bitki hücresinin, tüm bölümlerinde mevcut olduğu tespit edilmiştir (Galston vd., 1997; Walden vd., 1997; Bouchereau vd., 1999; Bachrach 2010). Poliaminler hücre ölümünü, özellikle apoptozu düzenler (Thomas ve Thomas 2003; Seiler ve Raul 2005). Bakterilerde en çok poliaminlerden, putresin ve spermidin vardır. Kadaverin (putresin benzeri doğal bir poliamin) de vardır ancak diğer poliaminlere göre daha azdır (Wortham vd., 2007). Bunlar, asit direncinde önemli olan, oksijen toksisitesini önlemek için, etkili bir rol oynarlar, siderofor biyosentezine dahil olan, sık sık gram-negatif bakterilerin dış membran bileşenlerinin hücresel farklılaşması ve sinyal rolü için plak biofilm oluşumunda gereklidirler. Buna ek olarak, putresin poliamin alımı ve kullanımı ile ilgili genlerin transkripsiyonu aktive ettiği bilinmektedir. Memelilerde poliamin fonksiyonu üzerine yapılan yoğun araştırma bakterilerde de olduğu gibi; büyüme, gen transkripsiyonu ve ribozom-aracılıklı translasyon gibi temel düzenleyiciler ile ilişkilidir (Thomas ve Thomas, 2003; Umekage ve Ueda, 2006). Hormon benzeri, PA'ler replikasyon, transkripsiyon, translasyon, membran stabilizasyonu ve enzim aktivitesi modülasyonunun proseslerinde gerekir, aynı zamanda genom aktivitesi, hücre bölünmesi ve genişleme ve bitki büyümesini ve gelişmesini düzenlemek için gerektikleri bilinmektedir (Bouchereau vd., 1999; Kaur- Sawhney vd., 2003) (Şekil 1.10)



Şekil 1.10. Poliaminlerin hücredeki işlevleri (Minois vd., 2011'den) (uyarlanmıştır).

Stres kaynaklı PA birikimi ve biyotik ve abiyotik streslere karşı gösterdikleri koruyucu fonksiyona özel ilgi vardır (Bouchereau vd., 1999). Bitki hücrelerinde ki yoğunluğu fito-hormonlardan fazladır. Çünkü fizyolojik pH' da polikasyonik doğası, poliaminlerin nükleik asitler, proteinler ve fosfolipidler gibi güçlü bir negatif yüke sahip hücre bileşenlerine bağlanmasını sağlar. Bitkilerde abiyotik stresle mücadele etmek ve adaptasyon için, spermin, spermidin ve putresin gibi doğal olarak meydana gelen önemli poliaminler (PA) bulunmaktadır. K^+ eksikliğine bağlı Put artışı abiyotik stres altında poliaminlerin analizine yol açmıştır. O zamandan beri, araştırmacılar PA ve tek veya kombine streslere maruz kalan bitkilerin değişiklikleri araştırmakla meşgul olmuştur (Shen vd., 2000; Mo ve Pua, 2002; Urano vd., 2003; Camacho-Cristo'bal vd., 2004; Kuthanova' vd., 2004; Liu vd., 2005; Kusano vd., 2008; Groppa ve Benavides 2008; Gill ve Tuteja 2010; Alca'zar vd., 2010a, b; Hussain vd., 2011). Abiyotik stres

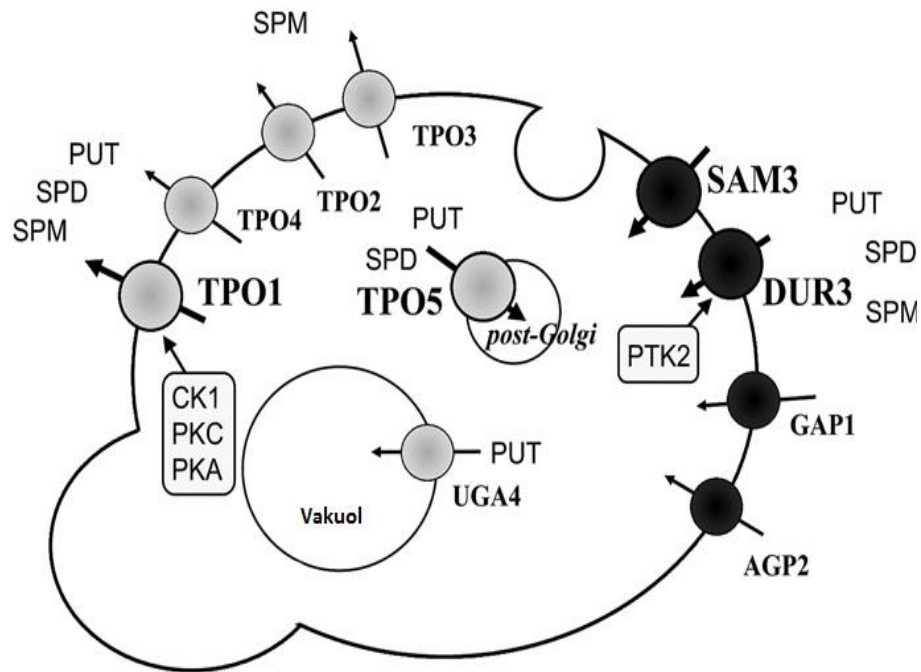
altında üç ana poliaminin birikimi ve bunların biyosentetik yolağının modülasyonu kuraklık ve tuz stresine karşı tolerans sağlar. Olumsuz çevre koşulları altında ürün verimini sürdürmek poliaminler için önemli bir görevdir. Son birkaç yılda; genetik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve fenomik yaklaşımlar bitki abiyotik stres toleransı düzenlenmesinde farklı PA' lerin çok önemli işlevlerini aydınlatmıştır. Son yıllarda, osmotik stres, kuraklık, ısı, soğutma, yüksek ışık yoğunluğu, ağır metaller, mineral besin eksikliği, pH değişimi ve UV ışınlaması gibi farklı çevresel streslere karşı PA' lerin katılımının olduğu görülmüştür.

1.3.1. Spermidin/Spermin- N^1 -Asetiltransferaz (SSAT) Önemi

Poliamin metabolizmasında ki enzimlerdir (Casero ve Pegg, 1993; Pegg ve McCann, 1982; Wallace vd., 2003). Bu enzim spermin ve spermidinin amino propil uçlarına asetil grupları ekler. Bu nedenle asetilasyon asidik makromoleküllere bağlanma kabiliyetini değiştiren ve bunların işlevini etkileyerek, poliaminler üzerindeki yükü azaltır. Asetillenmiş türevleri, asetilpoliamin oksidaz (APAO) ile etkili bir şekilde N-asetilaminopropanal ve daha küçük bir poliamin oluşturmak için molekülleri bölen bir peroksizom enzim için (Wang ve Cesero, 2006; Wu vd., 2005) uygun ortamlar oluşturmaktadır (Şekil 1.11a). Asetillenmiş türevleri de kolayca hücreden dışarı atılır. Böylece çok yüksek seviyede düzenlenmiş olan ve poliaminler ile indüklenebilir SSAT, poliamin homeostazının muhafaza edilmesi ve bu poliamin içeriği ile ilgili normal ve neoplastik büyüme gibi hücresel süreçleri etkileyen önemli bir rol oynar. Son zamanlarda, aşırı şişmanlık/glukoz toleransı, integrin fonksiyonu, stres tepkisi ve oksijen homeostazında SSAT' nin rol aldığı diğer olası fonksiyonlar önerilmiştir ve SSAT' da ki değişiklikler çeşitli patolojik koşullar ile bağlantılı olmuştur. Karbon tetraklorid ile indüklenebilir asetilenmiş poliaminler oldukları bulunmuştur ve asetilasyon ürünlerinin gerçek oksidaz substratı olduğu öne sürülmüştür (Matsui ve Pegg, 1981). Bu SSAT enziminin saflaştırılması ve karakterizasyonu, histon asetilaz benzeri diğer enzimlerden (poliaminler üzerinde bazı aktiviteleri var) epey farkı vardır ve spermidinin sadece N^1 pozisyonunu asetiller (aminopropil ucu; bak. Şekil 1.11b). Spermin, simetrik olarak her iki ucundan da asetilenmiş olabilir. SSAT' nin substrat özgülüğünün daha detaylı incelenmesi, N^1 -asetilspermin, *sym*-norspermin, ve *sym*-norspermidin' de içeren genel yapısı $H_2N(CH_2)_3NHR$ olan substratların SSAT için

1.3.2. Spermin Ailesinin Taşınması

Yakın zamanda, mayada vakuoler zar üzerinde bir poliamin taşıma proteini kodlayan bir gen (TPO₁, YLL028w) tespit edilmiştir (Tomitori vd., 1999). Vakuolar zar üzerinde bir poliamin taşıma proteini için, bir veya daha fazla başka genlerin varlığı bekleniyordu çünkü TPO₁ tarafından kodlanan protein homologları için dizi veri tabanlarını taranmıştır. Açık okuma çerçeveleri YGR138c (TPO₂), YPR156c (TPO₃) ve YOR273c (TPO₄) tarafından kodlanan membran proteinlerinin, poliamin vakuoler taşıyıcı proteinler olduğu öne sürülmüştür. Bu genleri aşırı ifade eden hücrelerde, poliamin toksisitesine karşı direnç ile poliamin alım aktivitesinde artış ve vakuol poliamin miktarında artış gözlenir. Bu genlerin delesyona uğratıldığı hücrelerde, poliamin toksisitesine duyarlılıkta artış ve poliamin alım miktarında azalma ile birlikte vakuolde ki poliamin içeriğinde hassasiyet gözlenir. TPO₂ ve TPO₃ spermin için TPO₁ ve TPO₄ spermin ve spermidin için tanımlıdır (Şekil 1.12). Bu sonuçlar mayanın sitoplazmasında bulunan poliamin miktarının, poliamin taşıma sistemi tarafından düzenlendiğini ortaya koymuştur.



Şekil 1.12. TPO₂ ve TPO₃ proteinlerinin plazma zarında ki gösterimi (Igarashi vd., 2011) (uyarlanmıştır).

1.3.3. *S. pombe*' de Strese Karşı Cevap Yolakları (SAPK)

Mikroorganizmaların hayatta kalma ve gelişme yeteneği, olumsuz çevre koşullarına karşı hızlı ve güçlü stres cevaplarına bağlıdır. Stres-aktif olan protein kinaz (SAPK) yolaklarının ökaryotlardaki stres sinyalizasyonunda önemli modülleri bulunur, ökaryotik mikroorganizmalarda, örneğin mantarlarda bulunur. Bu yolakların SAPK içeriği fosforilasyon boyunca kinaz kademeli olarak aktif olur ve bir kere aktif olur, SAPK fosforilasyonu çeşitli sitoplazmik ve nükleer hedefleri fosforiller, uygun cevap ile sonlanır. Dolayısıyla, mantarlarda korunmasına rağmen, SAPK modül mekanizmaları farklı mantarlarda evrimleşerek farklılaşmış sinyal yolaklarıdır. Burada, model mayaları *S. cerevisiae*, *S. pombe* ve patojen mantar *C. albicans* için çeşitli yolaklara yer verilmiştir.

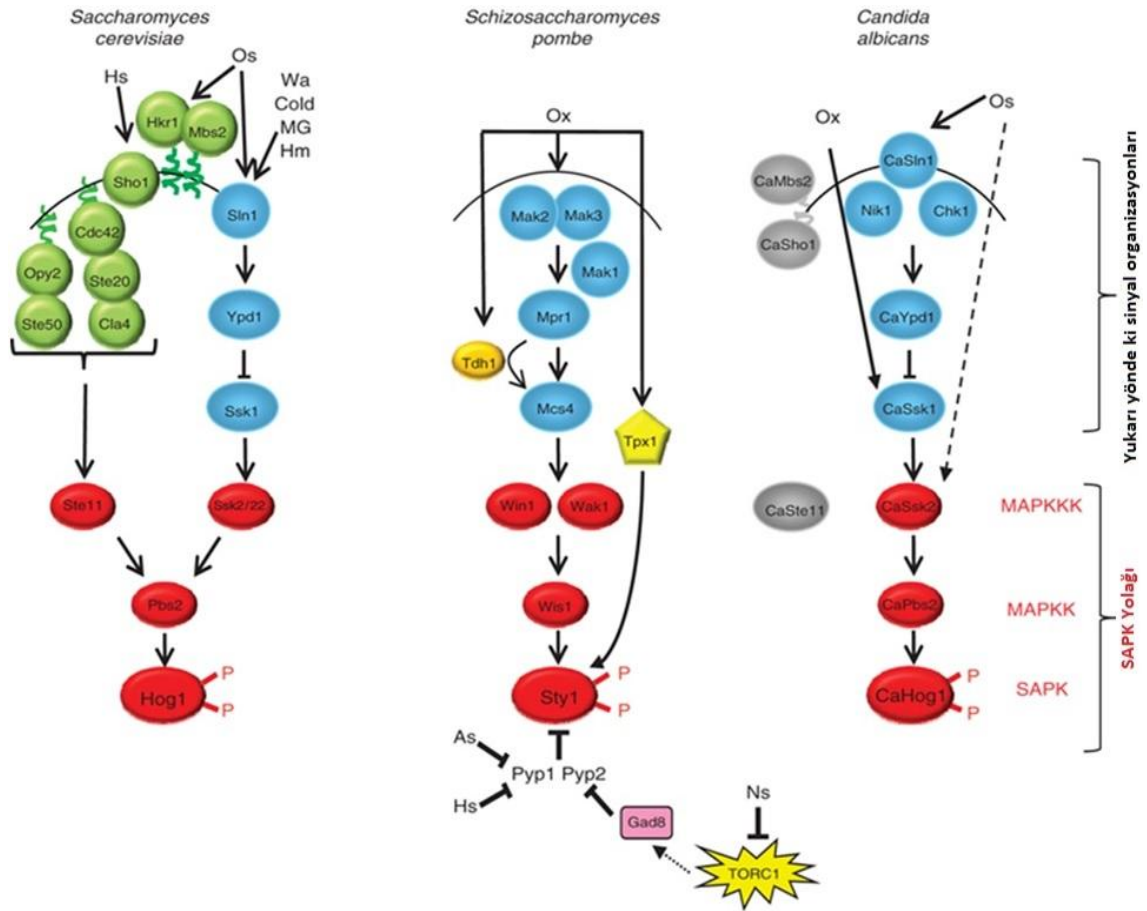
Stres-aktif edilmiş protein kinaz (SAPK), mitojen-aktif edilmiş protein (MAP) kinaz ailesi üyesidir ve ökaryot hücrelerde ki önemli stres-sinyalizasyon molekülerindendir (Nikolaou vd., 2009). Her SAPK yolağı protein kinazların üç aşamasının birleşmesinden oluşmuştur; SAPK kendisi, MAP kinaz kinaz (MAPKK) ve MAPKK kinaz (MAPKKK). MAPKKK fosforilasyonu ile MAPKK aktif olur daha sonra SAPK katalitik domainin aktivasyon lobunda ki korunmuş threonin ve tirozin dizilerinden fosforile olarak aktif hale gelir. Bu fosforilasyonun artışı kinaz aktivitesini ve SAPK'ın nükleer translokasyonu artırır, bunun sonucunda SAPK-bağımlı fosforilasyonun pek çok substratı içerir; transkripsiyon faktörleri, kinazlar, hücre döngüsü regülatörleri ve membran proteinleri, uygun hücrel cevapları tetikler. SAPK yolağı modeli, *S. cerevisiae* ve *S. pombe* ile patojenik mantar *C. albicans*' ta, çok iyi karakterize edilmiştir. Her bir mayada SAPK ve MAPKK içeriği, *S. Cerevisiae*' da Hog1 ve Pbs2 (Brewster vd., 1993), *C. Albicans*' ta CaHog1 ve CaPbs2 (San Jose vd., 1996; Arana vd., 2005) ve *S. pombe*' de Sty1 (şöyle de bilinir Spc1 veya Phh1) ve Wis1 (Millar vd., 1995) (Şekil 1.13).

İlginç şekilde, mantarlarda MAPKK stres sinyalleri MAPKKK ile yer değiştirir. Örneğin; *S. cerevisiae*' da Hog1 yolağı üç MAPKKKs ile düzenlenir yüksek homolojide ki Ssk2 ve Ssk kinazlar ve Ste11 (Maeda vd., 1995; Posas ve Saito, 1997), *S. pombe*' de Sty1 yolağı iki MAPKKKs tarafından düzenlenir, Wak1 (bir de Wis4 olarak bilinir) ve Win1 (Samejima vd., 1997; Shieh vd., 1997), oysa ki *C. albicans*' ta CaHog1 kinaz tek MAPKKK tarafından düzenlenir, CaSsk2 (Cheetham vd., 2007)

(Şekil 1.13). Mantarlarda stres-sinyal proteinleri SAPK' lar evrim boyunca korunmuşlardır (Nikolaou vd., 2009). Bundan dolayı, *S. cerevisiae* ve *S. pombe*' de SAPK stres sinyali yolağı mekanizması farklılaşarak önemli derecede gelişmiştir. Bundan başka, *C. albicans*' ta mayalardan farklı SAPK yolağı düzenlendiği ve bunun rolü kanıtlanmıştır. Dolayısıyla, farklılıklara rağmen, tek evrensel mekanizma stres sinyali algılanması ve SAPK modülünün iki-bileşenli sinyal transdüksiyon yolağıdır. İki-bileşenli yolaklarda, His-Asp phosphorelay sistemden meydana gelir, çevresel sinyallere karşı bakterilerde geniş olarak kullanılır (Egger vd., 1997). Aktivasyonun üstünde, korunmuş histidin rezidüleri otoposforile edilir, regülatör protein cevabında alıcı domain korunmuş aspartat rezidülerinden fosforile edilir, uygun cevabı tetikler. Dolayısıyla, mantarlarda ki sistemlerde hibrid sensör histidinkinazlardan oluşmakta, çok basamaklı üç bileşenli yaygın phosphorelay kompleksi içermektedirler, her iki kinazı ve alıcı domain içerirler, aracı phosphorelay proteini ve cevabı düzenleyen alıcı proteini içerirler. *S. cerevisiae*, *S. pombe* ve *C. albicans* da SAPK yolağının iki-bileşenli aracı sinyal transdüksiyon düzenlenmesine rağmen, stres sinyalleri önemli derecede farklılaşmalara sahiptir.

Çizelge 1.2. *S. pombe* Sty1 yolağı kullanımı.

Stres Şekilleri	<i>S. pombe</i> Sty1 Yolağı
Osmotik	+
Oksidatif	+
Ağır metal	+
Sıcaklık	+
Soğukluk	+
Metilgliksil	+
Suda çözünmüş asit	Çalışmalar devam ediyor
UV ışığı	+
Karbon açlığı	+
Nitrojen kısıtlaması	+
Basınç stresi	+
Glukoz	Çalışmalar devam ediyor
Katyonik peptitler	Çalışmalar devam ediyor



Şekil 1.13. Üç farklı organizmada sinyal iletim yollarının karşılaştırılması (FEMs Microbiology Letters, 2010) (uyarlanmıştır).

1.3.3.1. *S. pombe* Sty1 SAPK ‘in regülasyonu

S. pombe’de Sty1 SAPK yolağının çeşitli koşullarda güçlü olarak aktive olduğu tanımlanmıştır (Çizelge 1.2) osmotik stres (Millar vd., 1995), oksidatif stres ve sıcaklık şoku (Degols vd., 1996), nitrojen sınırlaması (Shiozaki ve Russell, 1996), karbon sınırlaması (Morigasaki vd., 2008), UV ışığı (Degols ve Russell, 1997), metilglioksal (Takatsume vd., 2006), soğuk stresi (Soto vd., 2002), arsenit (Rodriguez-Gabriel ve Russell, 2005) ve basınç stresi (George vd., 2007).

S. pombe, *S. Cerevisiae* ‘daki Sln1–Ypd1–Ssk1 yolağına mimari olarak benzer iki-bileşenli sistem içerir (bkz. Şekil 1.13). Dolayısıyla, dikkat çekici, fisyon mayalarında iki-bileşenli sinyal sistem H_2O_2 ’ye değiştirmesinde sinyal verir, fakat osmotikte değil, benzer şekilde *S. Cerevisiae*’da Ssk1-MAPKKK düzenlenmesi, Mcs4

düzenleyici yanıtı, Ssk' in homolog fonksiyonu, Wak1'in MAPKKK regülasyonu ve Sty1 yolağıyla direkt etkileşim (Buck vd., 2001).

S. pombe bir de Mpr1 proteini içerir, önerilen rolü Msc4'ü histidin kinaz phosphorelay ile fosforiller (Nguyen vd., 2000). Dolayısıyla, *S. cerevisiae*' nın aksine, fisyon mayasında üç histidin kinaz bulunur: İki yüksek ilişkili proteinler Mak2 ve Mak3, üçüncüsü ise Mak1' dir (Buck vd., 2001). Msc4 (Asp412) üzerinde korunmuş alanda aspartik asit veya Mpr1(His221) üzerinde korunmuş bölgede histidin fosforilasyonu mutasyonu, mak2⁺ mak3⁺ delesyonu (fakat mak1⁺ değil), Sty1 SAPK sinyal yolağında oksidatif role önemli derecede zarar verir (Nguyen vd., 2000; Buck vd., 2001; Quinn vd., 2002). Diğer taraftan, peroksidaz stresinin düşük konsantrasyonunda Sty1' de oksidatif stres yolağında Mak1'in inhibitör olarak rolü ortaya çıkmaktadır (Quinn vd., 2002). Bundan dolayı, mimari benzerliğe rağmen, *S. pombe* ve *S. cerevisiae*' de ki iki-bileşenli sistem farklı stres uyarılarından sorumludur. Sty1 in *S. pombe*' de Sty1 de stres sinyallerinin iki-bileşenli sinyalizasyon mekanizmasında tam olarak işlevi daha az bilinmektedir.. Dolayısıyla *S. pombe*'de Mak2 ve Mak3 histidin kinazlar potansiyel oksidatif stres- algılama domainleri olarak Sln1' de ki gibi yetersiz kalır. Örneğin, Mak2 ve Mak3 her ikisi de PAS ve GAF domainleri içerir bu bölgeler histidin kinaz domainine komşudur.

PAS domainleri sinyal transdüksiyonunda evrimsel olarak korunmuş motiflerdir redox sinyallerini verirler (Taylor ve Zhulin, 1999). GAF domainleri yapısal olarak benzerdir, fakat aminoasit dizileri ilişkili değildir, PAS domainleri ile (Hurley, 2003). GAF domainleri pek çok nükleotit bilgesine bağlanma durumu göstermektedir, yakınlarda ki pek çok çalışmayla birlikte, *Mycobacterium tuberculosis* DosS histidin kinazda redox-algılayıcı GAF domaini hem gruplarına bağlandığı ortaya çıkarılmıştır (Cho vd., 2009). PAS ve GAF domainleri Mak2 ve Mak3' te peroksidaz-algılayıcı fonksiyona sahiptir. Önemli biçimde, bununla birlikte, yakınlarda ki çalışmalar glikolitik enzim GAPDH (Tdh1) Sty1'in iki-bileşenli yolağı boyunca oksidatif stres sinyalizasyonunu desteklemek için gerekli olduğunu ortaya çıkarmıştır (Morigasaki vd., 2008). Tdh1 beklenmedik şekilde MAPKKK' ler Wak1 ve Win1 ile kompleks olarak bulunmuştur ve Msc4 ünde cevabını düzenler. Ayrıca, oksidatif strese maruz kalındığında, Tdh1 Cys152 redoks-duyarlı rezidüleri geçici olarak oksitlenmiştir ve Msc4 ile etkileşim bunu desteklemektedir. Önemli derecede, Cys152 nokta mutasyonu

Mcs4 ve Mpr1 arasında ki etkileşimi azaltır, iki-bileşenli fosforelay yolağı boyunca peroksidaz sinyalleri zarara uğrar (Morigasaki vd., 2008). Sty1 'in peroksidaz-indükleyici aktivasyonu için bir de Tpx1 (thioredoxin peroxidase enzyme), gereklidir, Wis1-bağımlı bir mekanizmada iki-bileşenli sistemin downstream bölgesinde görev alır (Veal vd., 2004). Tpx1, düşük peroksidaz düzeyinde görev alır ve Sty1 aktivasyonuna göre cevabı şekillenir (Quinn vd., 2002), Tpx1 ile Sty1 mekanizması tam olarak açık değildir, fakat Tpx1 ve Sty1 arasında ki korunmuş sistein rezidüleri arasında disülfid bağları oluşmaktadır. Bu bulunanlar antioksidant enzim Tpx1 bir de peroksit algılanması ve *S. pombe*'de ki sinyal iletim fonksiyonunu göstermektedir (Veal vd., 2004).

Peroksidaz stresine rağmen, ısı şoku-indükleyici aktivasyon farklı bir Sty1 SAPK mekanizması oluşumunu sağlar. Örneğin, oksidatif stres veya osmotik basınçta ki Wis1 MAPKK güçlü aktivasyonuna rağmen, Sty1 ve Pyp1 arasında ki etkileşim ile Sty1 fosforile olarak, ısı şoku üzerine önemli bir düzenleme oluşur. İki fosfatazdan biri Tyr173'ten defosforile eder ve Sty1 inaktive olur, inhibe edilir (Shiozaki vd., 1998; Nguyen ve Shiozaki, 1999). Böylece, fosfataz inhibisyonu ile Sty1 aktivasyonu ısı şokuna cevap oluşturur. Arsenit stres-indükleyici Sty1 aktivasyonu, ısı şokunda olduğu gibi Pyp1 aracılığıyla gerçekleşmektedir (Rodriguez-Gabriel ve Russell, 2005). Sty1 aktivasyonu nutrient kısıtlanmasına ve fosfataz inhibisyonuna cevaptır. Özellikle, besin durumunun değişimi sinyalizasyonda TORC (target of the rapamycin complex) ve downstream efektör hedefini değiştirmekte, AGC kinaz Gad8, sonucunda tirozin fosfotaz Pyp2'nin düzenlenmesini sağlayarak, Sty1' i hedefler (Petersen ve Nurse, 2007; Hartmuth ve Petersen, 2009).

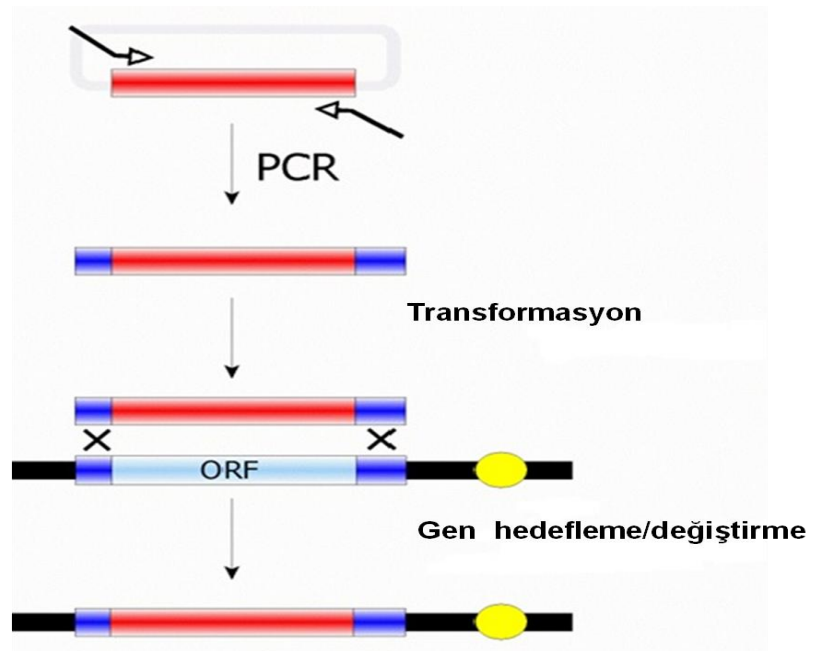
1.4. Knockout Genler (Genlerin Çıkarılması/İptali) : Gen Hedefleme Teknolojisi

Gen hedefleme teknolojisi ile serbest yaşayan organizmaların genomlarında değişiklik yapılabilir (mutasyonları meydana getirebilecek eklemeler), homolog rekombinasyon, seçilebilir bir üretim ve belirli bir bilimsel veya teknik kullanım amacı ile kalıtılabilir, genomik değişiklikleri olanaklı hale getirebilir. İn vitro ortamda tasarlanmış dış kaynaklı DNA kasetleri (plasmid, değiştirilebilir gen veya tasarlanabilir yıkım kasetleri) genetik yeniden düzenleme ile genomik benzerliklere yol açacak şekilde rekombine edilerek düzenlenebilir. Sonuçta, hedeflenmiş genomik diziler; eksik veya istenilen sonuçların olma olasılığı ile transforme edilebilir. Bu iki temel unsur, bilimsel çalışmalar ve araştırma stratejilerine teknolojik yaklaşımlara fayda sağlamıştır. Organizmalar bu yolla çeşitlilik gösterebilir, bu çeşitliliğe genetiği değiştirilmiş terimi daha uygundur. Şimdiye kadar, bu teknoloji birçok tek hücreli ökaryottan başlanarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve hatta insan hücrelerini de kapsayacak şekilde memelilerde de kullanılmaktadır (Langston ve Symington, 2004).

1.4.1. Gen Hedeflemesi ve “Ends-out” Strateji

Gen hedeflemesi ile temel ökaryotlarda moleküler dönemin açılışı *S. cerevisiae* ile geliştirilmiştir. Bu teknolojinin başlangıcında, maya transformasyon deneylerinin başlaması (Hinnen vd., 1978), replikatif-olmayan bir plazmid maya genomu içine entegre edilerek hücre genomunun değiştirilmesini içeriyordu (Ends-in strateji). Bu işlem sırasında plazmid dizisi ağırlıklı olarak yeniden birleştirme ile homolog genoma karşılık entegre olarak bulunmuştur. Alternatif olarak, Ends-in sınırlaması yaklaşımı yerine yeni teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlar mayalarda geliştirilmiştir (Rothstein, 1983) ve daha sonra memeli hücrelerinde de başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Thomas ve Capecchi, 1987). Burada bir de lineer eksojen DNA, hücrelere transforme için kullanılmış ve hedef istenilen genomik diziye aktararak modifiye edilmiştir. Ancak, tamamen çıkarılması gerektiği için ve bu yöntemin en belirgin kısıtlaması, yöntemin tekrar kullanılma olanağının sınırlı olmasıdır. Klasik Rothstein yaklaşımı sadece hedeflenen genomik sekansın gen fragmentini çıkararak uzaklaştırır, eksik genotip hakkında şüpheleri yükseltir. Bu dezavantajı gidermek için, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-temelli gen değiştirme geliştirilmiştir (Baudin vd., 1993). Bu yaklaşım istenilen genin, okzotrofik bir işaretleyici gen ile değiştirilmesine olanak vermektedir (Şekil

1.14). Bu muhteşem tekniği uygulamak için sadece genom dizisini bilmeyi gerektirir. Metot için aşağı yukarı her biri 60 nükleotidlik iki PCR primerinden yararlanılır. Bunun içinde, her primerin 3' ucunda amplifikasyon için kullanılan 20 nükleotidlik okzotrofik belirteç kullanılır. 5' ucunda ki 40 nükleotidlik kısım sağ veya solda ki ilgilenilen komşu genin genomik dizisi ile aynı ve hedefleme için kullanılır. Bu primer seti kullanılarak, değiştirilmek istenilen genin yanında ki gen dizisi ile aynı genomik diziye sahip 40 baz çiftlik yer değiştirilebilir kasetler üretilir ve gene hedeflenerek değiştirilir. Transformasyonun ardından, uygun bir ortamda kararlı transformatlar seçilir ve analiz edilir.



Şekil 1.14. (PCR)-temelli gen değiştirme yöntemi (Third Annual Conference for Biotechnology and Transplantation. Holliday Inn Skopje. Macedonia. 2012) (uyarlanmıştır).

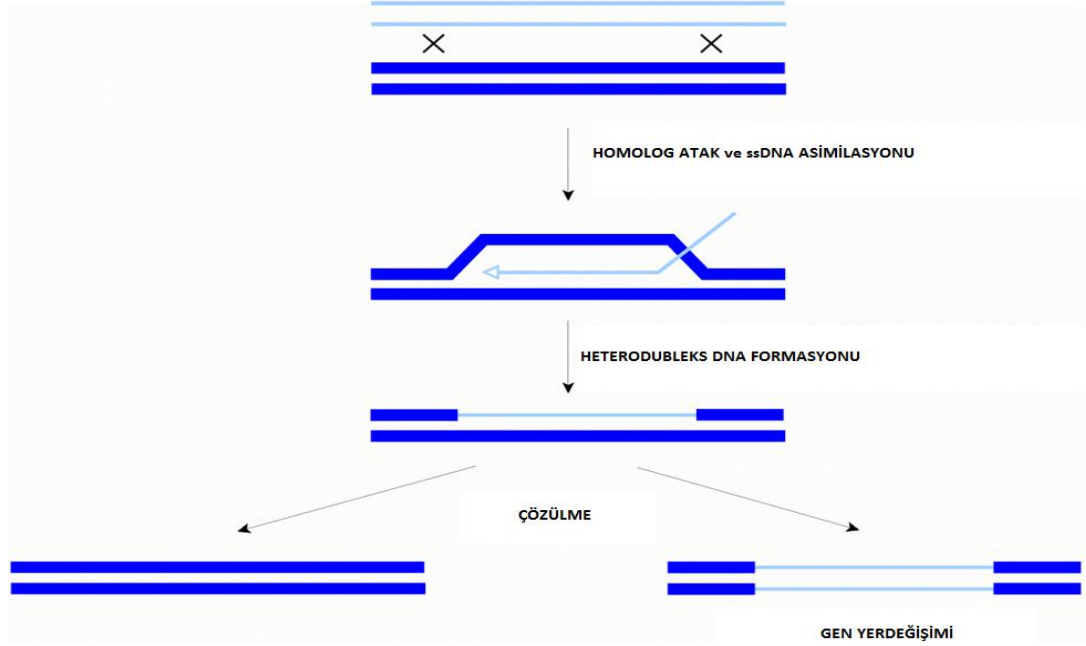
1.4.2. Gen Hedefleme/değiştirme Mekanizması

Gen bozulması/yer değiştirme mutasyonları gibi güçlü genetik mekanizmalar hedeflenen genom değişikliği alanında yeni teknolojik gelişmeleri sağlamak için potansiyel olarak önemlidir. Şimdiye kadar anlatılan tekniklerin hepsi homolog rekombinasyon tekniklerinden yararlanmak içindir, iki DNA molekülünün paylaşılan dizi homolojisi hücrenin rekombinasyon mekanizmasını kullanarak iplik aktarımını/değişimini sağlar. Sonuç olarak, yeni bir genetik lokusta yeterli seçim

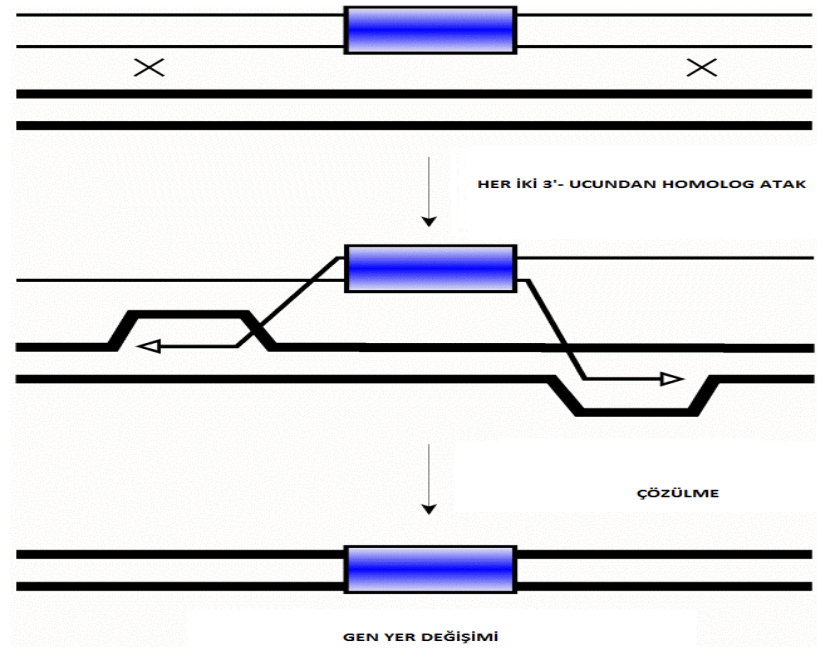
yapılarak alıcı bir hücre taranarak genom oluşturulur. Bu nedenle, temel olarak hedef genin homolog rekombinasyon ile DSB onarımı (DSBR) ifade etmektedir (mayalarda ki homolog rekombinasyon stratejileri/ yolları hakkında detaylı bilgi görmek için Szostak vd., 1983; Paques ve Haber, 1999). Strateji ends-in veya ends-out gen hedefleme mekanizması boyunca gerçekleşecek olan mutasyon mekanizmalarını çeşitli mekanizmalar ile açıklar.

Ends-out stratejisi ile hedeflenen entegrasyon sırasında gen değiştirme mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Çeşitli modellerin bu süreçle ilgili açıklamaları vardır. Modellerden birine göre (Paques ve Haber, 1999; Leung vd., 1997), Genomik hedefin yer değişimi eksojen DNA'nın transformasyonu ile eş zamanlı olarak doğrusal tek-iplikli (ssDNA)'nın asimilasyonu ile gerçekleşir ve beraberinde geçici hetero yapının oluşumu sağlanır (Şekil 1.15). Bu sonuçlar, ends-out DNA fragmentleri genomik hedefleme mekanizması ile entegre olabilir iki ayrı genetik değiştirmeye gerek kalmayabilir. Bu tahminlere göre, diğer modeller daha sonra önerilmiştir. (Manthey ve Bailis, 2002). Burada, hedef değiştirme, kesip/yerleştirme DNA'nın yapıştırılması ile sağlanır ve "Holliday" yapıların DNA replikasyonu, çözülmesi ve formasyonu bağımsız olarak gözükmemektedir (Şekil 1.16).

Bu nedenle, diğer iki model tam tersi bir varsayımdır. İlk modele göre, entegrasyona yol açan rekombinasyon ve daha sonra transforme fragment tarafından genomik hedef yeri bir-uç tarafında atak yapılarak işgal edilir fakat ikinci uyarıcı her iki ucunda atak yapmaya başlar. Etkili bir şekilde, hedefleme parçasının iki ucu olmayan kırık uçları böylece entegrasyon mekanizması genomunda, hedefleme parçası ve karşılık gelen her bir homoloji ucu arasındaki ilk koordine etkileşimleri dahil olabilir. Bununla birlikte, birçok çalışmanın sonuçları her iki modelin birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir, muhtemelen asimilasyon modeli yabancı-tip maya hücreleri için küçük bir yoldur (Langston ve Symington, 2004). Bu nedenle maya hedef genleri gen bölgesinin her iki ucunda da ayrı bir atak başlatmaktadır. Ancak, gen hedefleme, hetero bölge içine iki komşu homoloji bölgeleri kapsayan ssDNA asimilasyon ile oluşabilir.



Şekil 1.15. Ends-out teknolojide tek-iplik asimilasyonu ile gen entegrasyonu (Petar Tomev Mitrikeski, 2012) (uyarlanmıştır).



Şekil 1.16. Ends-out teknolojide iki uca yapılan ipli atak/çözülme entegrasyonu (Petar Tomev Mitrikeski, 2012) (uyarlanmıştır).

1.4.3. *S. pombe*'de Homolog Rekombinasyon ve ssDNA Asimilasyonu

Bu bölümde seçilebilir belirtecin genoma entegrasyonunda rol aldığı düşünülen homolog rekombinasyonu ve HR yolağının ssDNA (tek-iplikçikli DNA) asimilasyonu ile nasıl sonlandığını anlatacağız. Homolog rekombinasyon (HR) ile homolog DNA kalıbı kullanılarak, eksik dizi kopyalanır (kardeş kromatid veya homolog kromozom üzerinden) HR genellikle hatasızdır. Çift-iplikli kırık (DSB) onarımı boyunca HR nükleolitik DNA kesimi ile başlar 3' tek-iplik çıkıntısı şekli ile sonlanır. Bir Homolog DNA ipliği oluşturulabilir ve öncül bir kopyanın sentezi için imkân verir. Çift-iplikli kırık onarımı (DSBR) Szostak vd. tarafından önerilmiştir (Szostak vd., 1993). Bu iplik atağı, ikinci bir 3' çıkıntının oluşumu ve bir çift Holliday kavşağı oluşumuna yol açmak için, yer değişime ve D-loop formasyonuna neden olur. Parça değişimi ile ilgili gen değişimi bu Holliday kavşaklarının çözülmesi sonucudur.

Ends-out gen değiştirme teknolojisinde, DNA' nın hedeflenen gen bölgesi ile rekombinasyonu gerçekleştiren komşu genlere homolog diziler bulunmaktadır. Doğrusal olarak hedeflenmiş fragmentin uçlarının, hedeflenen genin uçları ile yer değiştirmesi rekombinasyonu kolaylaştırır. Bu yüzden entegrasyon mekanizması olasılıkla, kromozomdaki, hedef fragmentin her bir ucu ve ona karşılık gelen homolog bölge arasında koordine edilmemiş ilişkileri gerektirir. Böylece, ends-out DNA hedefleme ile kros-over ile beraber basit bir gen dönüşümünün üstünde bir mekanizma ile gerçekleşmesi beklenir. Bu varsayım bir gözlem ile desteklenmiştir. Yabanıl tip maya gen hedefleme mekanizmalarını araştırmak için, hedeflenmiş fragmentleri geliştirerek, istenilen entegrasyon boyunca komşu homoloji bölgelerinde heterodubleks DNA' nın (hDNA) kanıtı için transformatların incelenmesine olanak sağlanmıştır. Araştırmalarda, hedef molekülün iki ucundaki ayrı iplerde meydana gelen ataklar gen hedeflemenin başladığını göstermiştir (Şekil 1.16) ve çok sık olmayan hata-eğilimli onarımı takiben hDNA içine iki komşu homoloji bölgelerini kapsayan, DNA hedefleyen tek bir iplikçik asimilasyonu meydana geldiği gösterilmiştir (Şekil 1.16). İncelenen heterodubleks DNA (hDNA), bir fare hibridoma hücre hattında hedeflenmiş gen değiştirme sırasında, 26 transformanın 9' unda homoloji bölgelerinde atak yapan hDNA bulunmuştur, iki ucunda hedef DNA'nın farklı atakları bulunan sekiz tutarlı örnek bulunmuştur Leung vd., gen hedefleme uyumsuzluğu düzeltme ardından gelen kromozomal lokus ile hetero yapı içine hedefleme parçası tek bir iplikçik asimilasyonu

ile oluşabilir fikrini ortaya atmıştır (Leung vd., 1997). ssDNA asimilasyonu mekanizması ise aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.

MRN (Mre11–Rad50–Nbs1) kompleksi DSB uçlarını kesmede rol alarak, tek-zincir çıkıntılarının oluşumunu sağlar. Bununla birlikte, Mre11 3'→5' eksonükleaz aktivitesi içerir, DSB uçlarını 5'→3' ucundan kesip çıkartır. Bundan dolayı kesip-çıkarmadan sorumlu eksonükleaz gibi gözükür. *Sz. pombe*' de Exo1, DSB uçlarını Rad50' den bağımsız olarak kesebilir. Alternatif olarak, Mre11 endonükleaz aktivitesinin bir helikaz ile uyum içerisinde olarak 5'→3' kesiminden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Krogh ve Symington, 2004). Tek iplikli DNA çıkıntıları daha sonra heterotrimerik tek iplikli RPA bağlayıcı protein ile kaplanır, Rad51 yüklenmeden önce aradaki ikincil yapıların kaldırıldığı düşünülmektedir (Krogh ve Symington, 2004). *Sz. pombe*' de rad11, RPA' nın en büyük alt ünitesine homoloji gösterir.

Tüm HR yollarının merkezi, Rad51 tarafından katalizlenen iplik değiş-tokuşuna tepkidir. Bu proteinler bir nükleoprotein filaman oluşturan tek-iplikli DNA çıkıntılarını bağlayarak, iplikçik değiş-tokuşunu desteklerler. Rad51, *Sz. pombe* ' de günümüze kadar korunmuştur (Rhp51 diye adlandırılmaktadır). Rhp51 delesyonunda iyonize radyasyona çok büyük hassasiyet vardır (Jang vd., 1994; Muris vd., 1993; Shinohara vd., 1993). Rhp51, bir nükleoprotein filaman oluşturan tek- iplikçikli DNA'ya bağlanarak, DNA-uyarıcı ATPaz aktivitesi gösterirler ve homolog dupleks DNA iplik değişimini desteklerler (Sauvageau vd., 2005). RPA' nın, ssDNA' ya yüksek afinitesi vardır, bu nedenle Rad51 ile yarışarak bağlanmasını önler. Rekombinasyon aracı proteinler (Sung vd., 2003) RPA' nın açılmasında ve Rad51'in ssDNA'ya bağlanmasına yardımcı olur. Bu aracı proteinlerden Rad51 ile etkileşen proteinlerden biri Rad52'dir, ssDNA üzerinde Rad52–Rad51 kompleksinin yüklenmesi Rad51 nükleoprotein filaman yapısının oluşumunu temellendirmiştir. Rekombinasyon aracı proteinlerin başka bir grubu, Rad55/Rad57 proteinler (*S. cerevisiae*) ve memeli hücrelerinde Rad51 paralogları (Thacker, 1985) ile oluşturulmaktadır. Bunlar, ssDNA' ya bağlanmada Rad51'e göre düşük afiniteye sahiptirler. Ayrıca ssDNA çıkıntıları için Rad51 aracı olarak düşünülmektedir (Sung vd., 2003) ssDNA için Rad51' in bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülen başka bir protein, Rad54, Swi2/Snf2 kromatin yeniden düzenleme protein ailesinin bir üyesidir (Krogh ve Symington, 2004). *Sz. pombe* ' de iki tane Rad52 homologu tespit edilmiştir. Rad22, çiftleşme aktarımı ve

DNA onarımı ile ilgilenmektedir (Schmidt vd., 1989). *S. cerevisiae* Rad52 ile önemli homoloji göstermektedir (Osstermann vd., 1993). Rad22'nin DNA çift iplik kırıklarına bağlandığı bulunmuştur (Kim vd., 2002). İkinci Rad52 homologu Rti1' dir, Bir rti1 delesyonu sadece DNA hasarına neden olan ajanlara karşı çok az duyarlıdır ve biraz *rad22Δ* hassasiyeti artırmaktadır. Rad22 ve Rti1 hem birbirleriyle ve hem de Rhp51 ve RPA ile etkileşimde bulunmuştur (Kim vd., 2002; Tsutsui vd., 2001; van den Bosch vd., 2002). *Sz. pombe* Rad54 homologu içerir, Rhp54 diye adlandırılır. *Sz. pombe* 'de Rhp51 ile etkileşim ve delesyonunda iyonize radyasyona hem de UV duyarlı Rhp54 adı verilen bir Rad54 homologunu içerir. Rad51 için homoloji gösterir.

Çeşitli rekombinasyon arabulucu protein *Sz. pombe*'de tespit edilmiştir. Rad55 homologu Rhp55 dizisi homolojisi temelinde tespit edilmiştir. Çift mutant analizi rhp55 ile rhp51 ve rhp54' ü aynı yolda görür, ama DNA hasarının onarımı için rad22 farklı bir epistasi grubunda olduğu ileri sürülmektedir (Khasanov vd., 1999). Rhp57, homolog Rad57 (*S. cerevisiae*) ve XRCC3 (omurgalılar), MMS için aşırı duyarlılık gösteren bir mutant tamamlama yoluyla tespit edilmiştir. Bir rhp57 delesyon fenotipleri *rhp55Δ* (Tsutsui vd., 2000) ile çok benzerdir. Rhp55 ve Rhp57 birbirleriyle güçlü şekilde etkileşimde bulunmuştur. İki tane daha Rad51 benzeri proteinler *Sz. pombe* tespit edilmiştir: Rlp1, memeli Rad51'e paralog XRCC2 için homoloji gösterir (Khasanov vd., 2004.)

1.5. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, *Schizosaccharomyces pombe*'de sekans benzerlikleri ile spermin taşıyıcı ailesi ve poliamin N-asetiltransferaz oldukları düşünülen ancak deneysel karakterizasyonu yapılmamış olan SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerini karakterize etmeyi ve bu genlerin hücre döngüsü ile strese cevap oluşturmadaki potansiyel rollerini ortaya çıkarmayı hedeflemekteyiz.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Ascomycota sınıfına ait olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder liquifaciens maya türünün 975 h⁺ ve 972 h⁻ yabancı tipleri kullanılmıştır.

2.2. Besiyeri Ortamları

Gen karakterizasyonu amacıyla kullanılacak hücrelerin üretimi için YEA (Yeast Excract Adenin) içerikli besiyerleri hazırlanmıştır;

S. pombe zengin kültür YEA =

5 g/l yeast extract ,

30 g/l glukoz,

250 mg/l adenin oranı ile

YEA besiyerinin pH' ı 5,6' ya ayarlanmış ve bunun için HCl asit kullanılmıştır. Bu besiyerleri ihtiyaca göre sıvı ve katı olarak stoklanmıştır. Katı besiyerleri için % 2 (w/v) oranında agar kullanılmıştır.

S. pombe mutantlarının spor oluşumunu (sporulasyon) tetiklemek amacıyla nitrojen kaynağından yoksun sporulasyon kültürü (SPA) besiyeri kullanılmıştır.

Sporulasyon kültürü (SPA) =

Glukoz 10g/l,

KH₂PO₄ 1g/l,

1000x vitamin stok 1ml/l,

1000x vitamin stok= panthothenate 1 g/l, nikotinik asit 10 g/l, inositol 10 g/l, biotin 10 mg/l

SPA besiyerinin hazırlanmasının ardından ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. YEA ve SPA kültürleri hazırlandıktan sonra sterilizasyon için 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklavda tutulmuş ve sonrasında oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu besiyerlerinin

dışında transformatların seçimi ve spot testler amacıyla hazırlanan çeşitli besiyerleri de aşağıdaki başlıklarda açıklanmıştır.

NaCl İçerikli Besi Ortamı ile Muamele:

YEA+ 0,2 M NaCl ve **YEA+ 0,9 M NaCl** içeriğine sahip % 2 (w/v) agar içeren besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır; YEA besiyeri hazırlanırken maya ekstraktı, glukoz ve adenin eklenmesinin ardından bir besiyerine 0,2 M NaCl diğerine ise 0,9 M NaCl eklenmiş ve HCl yardımıyla pH: 5,6'ya ayarlanmıştır. Son olarak ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından hazırlanan 400 ml' lik YEA+NaCl besiyerleri 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon yapıp kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

KCl İçerikli Besi Ortamı ile Muamele:

YEA+ 0,5 M KCl ve **YEA+ 1 M KCl** içeriğine sahip % 2 (w/v) agar içeren besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır; YEA besiyeri hazırlanırken maya ekstraktı, glukoz ve adenin eklenmesinin ardından bir besiyerine 0,5 M KCl diğerine ise 1 M KCl eklenmiş ve HCl yardımıyla pH, 5,6' ya ayarlanmıştır. Son olarak ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından hazırlanan 400 ml' lik YEA+KCl besiyerleri 121 °C 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon yapıp kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

CaCl₂ İçerikli Besi Ortamı ile Muamele:

YEA+ 120 mM CaCl₂ ve **YEA+ 0,5 M CaCl₂** içeriğine sahip % 2 (w/v) agar içeren besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır; YEA besiyeri hazırlanırken maya ekstraktı, glukoz ve adenin eklenmesinin ardından bir besiyerine 120 mM CaCl₂ ve diğerine ise YEA+ 0,5 M CaCl₂ eklenmiş ve HCl yardımıyla pH, 5,6'ya ayarlanmıştır. Son olarak ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından hazırlanan 400 ml' lik YEA+ CaCl₂ besiyerleri 121 °C 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon yapıp kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

HU (hydroxyurea) İçerikli Besi Ortamı ile Muamele:

YEA+ 4 mM hydroxyurea ve YEA+ 10 mM hydroxyurea içeriğine sahip % 2 (w/v) agar içeren besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır; YEA besiyeri hazırlanırken maya ekstraktı, glukoz ve adenin eklenmesinin ardından HCl yardımıyla pH: 5,6'ya ayarlanmıştır. Son olarak ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. 400 ml YEA besiyeri 121 °C' de 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon yapılmıştır. Kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır. Bu işlemlerin ardından hazırlanan sterile edilmiş kültür mikrodalga fırında sıvı hale gelene dek ısıtılmış ve yaklaşık 50 °C'ye soğuduğunda 4 mM HU eklenerek 90 mm'lik petri kaplarına dökülmüştür.

Sorbitol İçerikli Besi Ortamı ile Muamele:

YEA+ 2 M Sorbitol içeriğine sahip % 2 (w/v) agar içeren besiyeri aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır; YEA besiyeri hazırlanırken maya ekstraktı, glukoz ve adenin eklenmesinin ardından HCl yardımıyla pH: 5,6'ya ayarlanmıştır. HCl asit yardımıyla pH, 5,6'ya ayarlandıktan sonra, 2 M sorbitol eklenerek çözündürülmüştür. Son olarak ise % 2 (w/v) agar eklenmiştir. Bu işlemlerin ardından hazırlanan 400 ml YEA+ sorbitol besiyeri 121 °C 20 dakika süre ile otoklavda sterilizasyon yapıp kullanılmak üzere oda sıcaklığında saklanmıştır.

2.3. *S. pombe*' nin Üretilmesi ve Saklanması

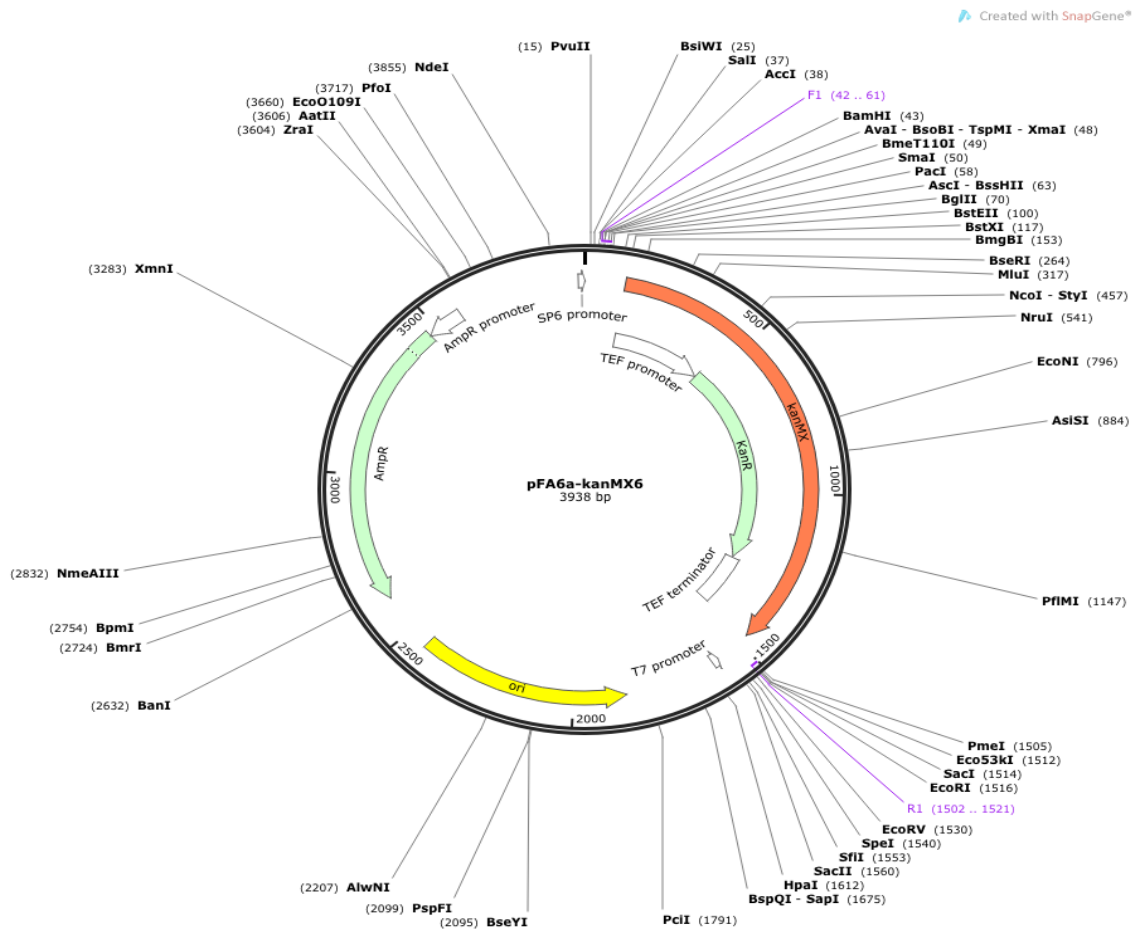
Çalışmada kullanılan *S. pombe* 975 h⁺ ve 972 h⁻ ırkı Gutz vd. (1974) önerdiği yöntemlerle üretilmiştir. *S. pombe* türünde yapılacak olan gen karakterizasyonları amacıyla, türün h⁺ ve h⁻ örneklerinden farklı besiyeri ortamlarına aktarım yapılmıştır. Koleksiyondan kürdan yardımı ile katı YEA besiyeri ortamına inoküle edilen örnekler 30 °C' de inkübatöre konularak yaklaşık üç gün beklenmiştir.

Transformasyon öncesi üremenin sağlanması amacıyla katı besiyerinden pipet uçları (tip) yardımı ile 100 ml' lik sıvı besiyeri ortamlarına aktarılan hücreler, bir gün süreyle su banyosunda erlenlerde 33 °C 80 rpm' de çalkalamalı inkübatörde üremeye bırakılmıştır. Gece boyunca bekletilen örnekler, koyu bir toz bulutu şeklinde görülene dek tutulmuştur.

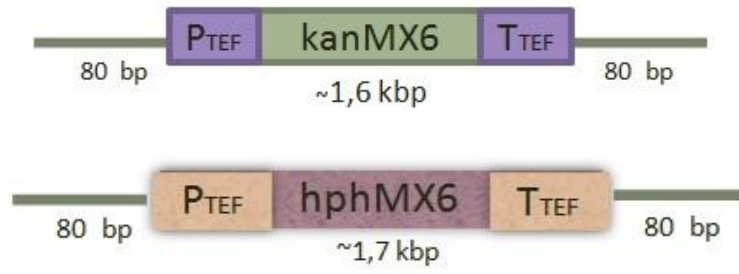
2.4. Kanamycin ve Hygromycin Direnç Geni Taşıyan Plazmidler

pFA6a-kanMX6 yapısı Şekil 2.1a.'da tanımlanmıştır (Wech vd., 1997). pFA6a-hph plazmidi, pFA6a-kanMX6 plazmidinden kanamycin direnç geni çıkartılıp yerine hygromycin direnç geni yerleştirilerek oluşturulmuştur (Hentges vd., 2005).

pFA6a-kanMX6 plazmidi 3938 bp büyüklüğünde, kanMX6 kaseti ~ 1,6 kb Şekil1b' deki gibi gösterilmiştir (Bahler vd., 1998). Başka bir plazmid olan pFA6a-hphMX6 4157 bp büyüklüğünde (Şekil 2.2), hphMX6 kaseti ise ~ 1,7 kb (Hentges vd., 2005) büyüklüğünde olup Şekil 2.1b.' deki gibi şematize edilmiştir. SPBC409.08 geninin delesyonu için kanamycin direnç geni, SPAC9.02c için hygromycin direnç geni kullanılmıştır.



Şekil 2.1a. pFA6a-kanMX6 plazmidi (Snap Gene).

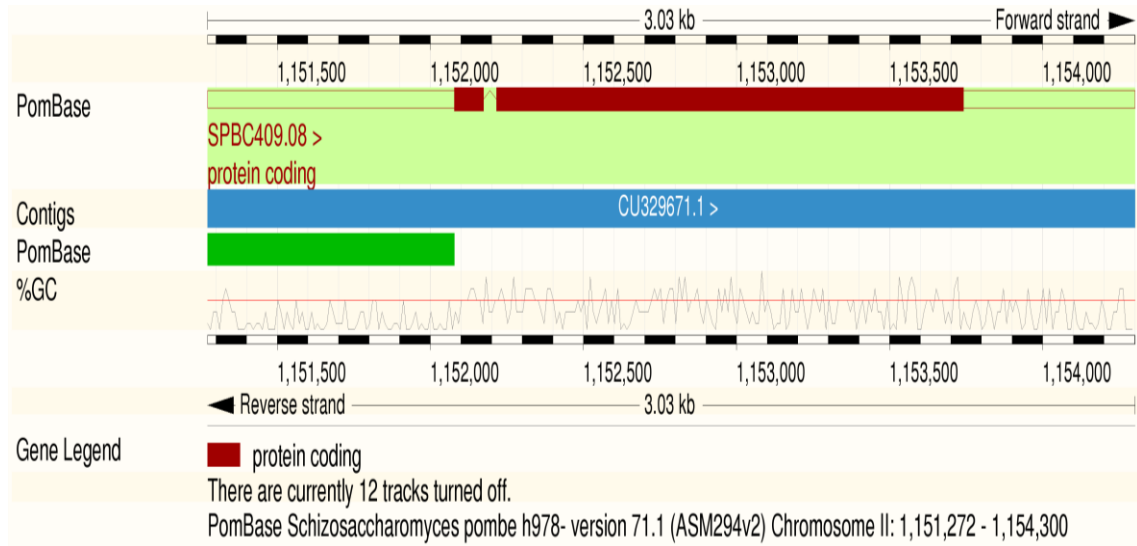


Şekil 2.1b. “kanMX6 (~ 1,6 kb) ve hphMX6 (1,7 kb)” doğrusal gen kasetleri.

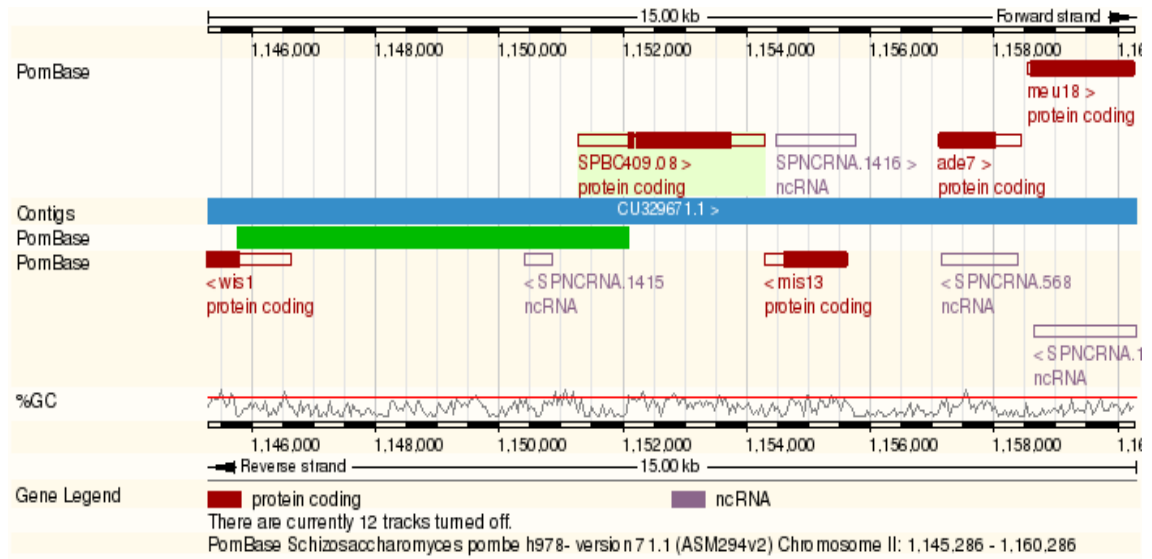
2.5. SPBC409.08 ve SPAC9.02c Genlerinin Genel Özellikleri

2.5.1. SPBC409.08 geni

Kromozom II üzerinde lokalize olmuş 3029 bp büyüklüğünde, 539 aminoasit kodlamakta ve 59,80 kDa ağırlığında protein yapısına sahiptir (Şekil 2.2a). Hücrede plazma membranında yerleşik ve spermine family transporter olarak görev yaptığı düşünülmektedir (UniProtKB curators., 2011). SPBC409.08 geni SPNCRNA1415 ve mis13 genlerine komşu olacak şekilde lokalize olmuştur (Şekil 2.2b). *S. cerevisiae*’da TPO₃ (YPR156C) ve TPO₂ (YGR138C) genleri ile ortolog olarak gösterilmektedir.



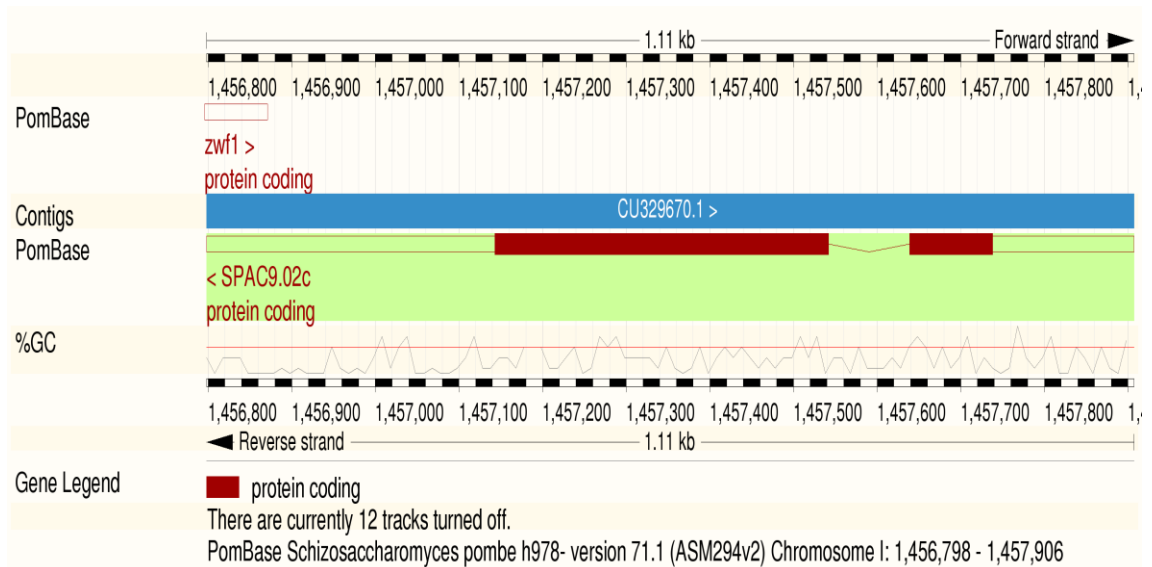
Şekil 2.2a. *S. pombe* 978 h⁻ yabanıl tipinde SPBC409.08 geni lokalizasyonu.



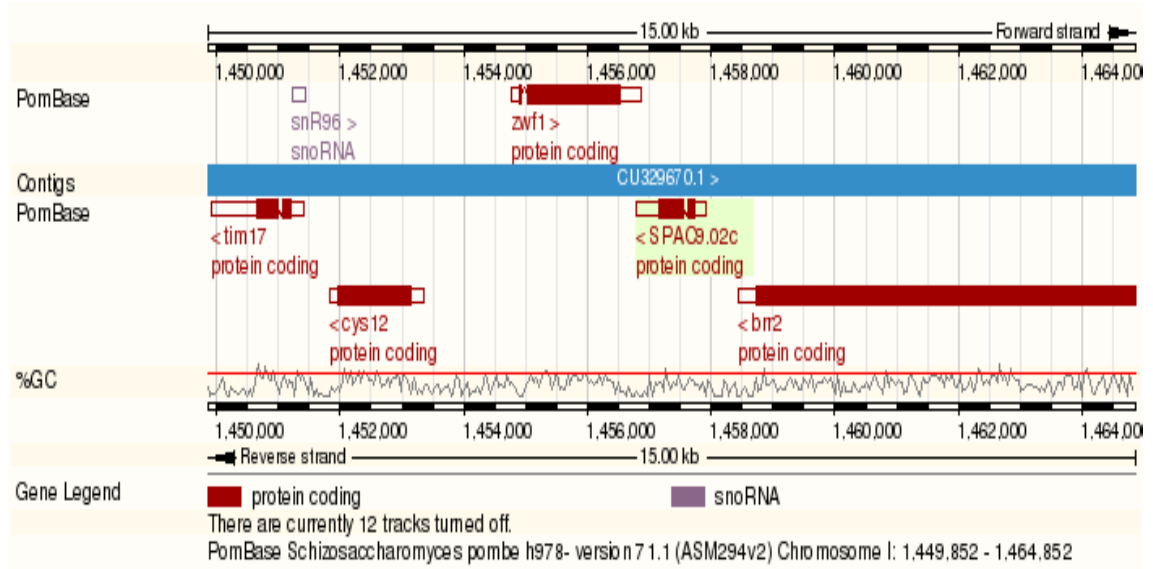
Şekil 2.2b. SPBC409.08 geni için komşu genlerin gösterimi.

2.5.2. SPAC9.02c geni

Kromozom I üzerinde lokalize olmuş 1109 bp büyüklüğünde, 165 aminoasit kodlamakta ve 18,79 kDa ağırlığında protein yapısına sahiptir (Şekil 2.3a). Hücrede polyamine N- acetyltransferase (diamine N- acetyltransferase ve ya aralkylamine N- acetyltransferase) olarak görev yaptığı düşünülmektedir (UniProtKB curators., 2011). SPAC9.02c genine zwf1 ve brr2 genleri komşudur (Şekil 2.3b). *H. sapiens*' te AANAT ve *S. cerevisiae*' da Paa1(YBR071C) genlerine ortolog olduğu gösterilmiştir.



Şekil 2.3a. *S.pombe* 978 h- yabanıl tipinde SPAC9.02c geni lokalizasyonu.

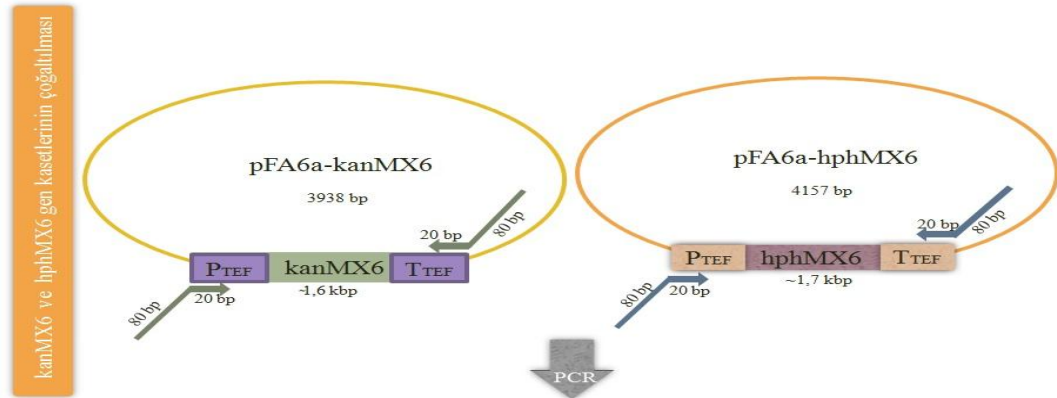


Şekil 2.3b. SPAC9.02c geni için komşu genlerin gösterimi.

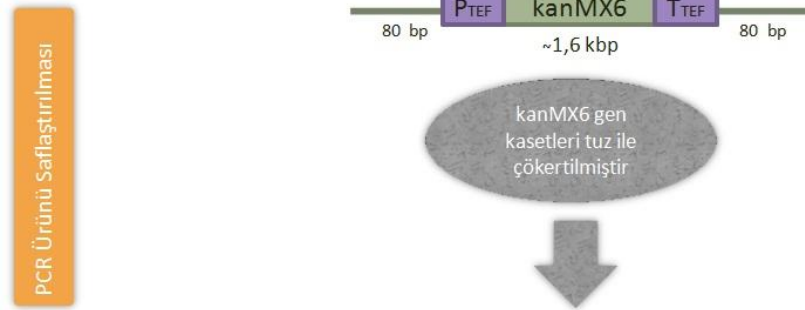
2.6. Delesyon Mutantlarının Oluşturulması

S. pombe'de gen karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yapılan işlemler birçok çalışma basamağını içermektedir. Bu çalışma basamakları aşağıdaki gibi şematize edilmiştir (Şekil 2.4). Canlıların gen yapıları üzerinde değişiklik yapmak amacıyla gen teknolojilerinden yararlanılmaktadır (bkz. Sayfa 34). Son yıllarda gelişen bu teknolojiler ile serbest yaşayan canlılara en uygun ve hasarsız şekilde istenilen gen bölgeleri transfer edilmektedir. Bu amaçla çalışmamızda ends-out (Hastings vd., 1993) gen teknolojisi kullanılmıştır. Deneylerde yabancı tip h^- ve h^+ *S. pombe* kullanılmıştır. SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin delesyon mutantları (*SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ*) Bahler yöntemi ile oluşturulmuştur (Bahler vd., 1998). Genlerin delesyonunda hygromycin ve kanamycin direnç genleri taşıyan kasetler kullanılmış ve delesyonlar koloni PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Hücrelerin büyümeleri 30 °C' de, YEA zengin besiyerinde sağlanarak, osmotik stres koşulları ve DNA hasarı testleri bu besiyerleri üzerinde uygulanmıştır.

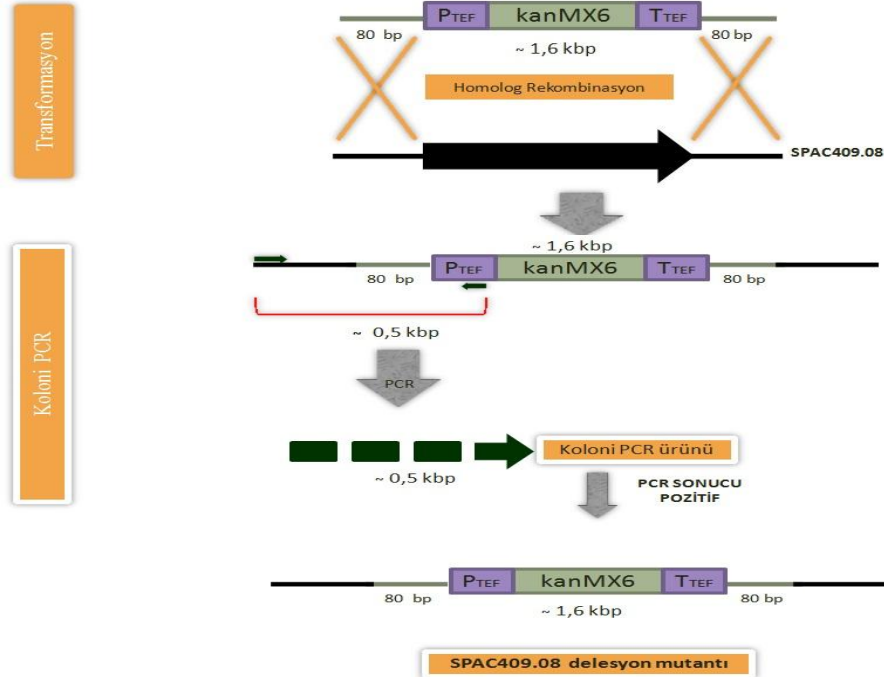
İlk aşamada kanamycin ve hygromycin gen plazmidlerinden P_{TEF} ve T_{TEF} bölgelerine komplementer 20 bp' lik primerler kullanılarak, klasik PCR ile “kan” ve “hph” gen kasetleri elde edilir.



İkinci aşamada NaOAc ile çöktürülen DNA, EtOH ile görüntülenmektedir.



Üçüncü basamakta, bir homolog rekombinasyon çeşidi olan tek-iplikli asimilasyon yöntemi ile transformasyon işleminin gerçekleştirilmesinin ardından, son olarak ise “Koloni PCR” ile delesyon oluşumu doğrulanmıştır. 80 bp' lik kısımlar genlere homolog olan gen değişimini başlatan bölgelerdir.



Şekil 2.4. *SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ* Bahler yöntemi ile oluşturulmuştur (Bahler vd., 1998).

2.6.1. Antibiyotik Direnç Genlerinin Çoğaltılması

Moleküler çalışmaların ilk basamağı olarak, hücre genomunda homolog rekombinasyonu gerçekleştirerek istediğimiz genin bölgeye entegre olması amacıyla; doğrusal gen kasetleri elde edilmiştir. Bu amaçla stokta plazmid halinde bulunan "pFA6a-KANMX6 (KAN)" ve "pFA6a-hphMX6 (hph) modülü" (Şekil 2.1a) direnç genleri iki aşamalı PCR yöntemi ile doğrusal DNA parçacıkları olarak çoğaltılmıştır.

SPAC409.08 geni için "birinci PCR" ve "ikinci PCR" da forward primeri; "TTTGTCAACCAAAAAACATCTATATACTGTTTTCTTCTTCATTATCTTTTGT TCTTTACTTGTGCGCATAAATTAATACGGATCCCCGGGTAAATTAA" ve revers primeri olarak ise; "TAATAGAGGCTTTAAATTCCTTGCATGTACACAACG CAAACCAATGCATAACGAAAAAAGACACAAATCAATCTGTGAATTCGA GCTCGTTTAAAC";

SPBC9.02c geni için ise "Birinci PCR" ve "İkinci PCR" da forward primeri; "CCCCCTTCAAATTGCAGAACAGTTTAAGAGGTCGTTTTCTGAACGCGCGTA TTTGATTGCTTATTTACCAAGAAAGTGTACGGATCCCCGGGTAAATTAA" ve revers primeri olarak ise; "ATACAGTTTCAATGTATATGAATATAAATATATA CGAGTCAAAAAGTAAACGGAACCCAGGTGTTGCATAACATAACGTCTGAATT CGAGCTCGTTTAAAC" kullanılmıştır.

2.6.1.1. "Kanamycin" ve "Hygromycin" gen kasetlerinin çoğaltılması – Birinci PCR

Plazmid yapıların içersinde lokalize olmuş durumdaki "kanamycin" ve "hygromycin" gen kasetlerinin doğrusal gen kasetleri olarak elde edilmiştir. Bu gen kasetlerini elde etmek amacıyla kullanılan "Polimeraz zincir reaksiyonu" yönteminin reaksiyon şeması ve ortam koşullarının optimize edilmiş durumu aşağıdaki gibi şematize edilmiştir (Çizelge 2.1a ve 2.1b).

Çizelge 2.1a. Birinci PCR içeriği.

PCR içeriği	Miktar(μl)
TaKaRa 10x ExTaq Buffer (25mM MgCl ₂ içerikli)	2 μl
dNTP karışımı (herbirinden 2.5mM)	1,6 μl
Primer(forward) (0.025 mM) 7,11	0,4 μl
Primer(revers) (0.025 mM) 8,12	0,4 μl
Template	0,5 μl
TaKaRa ExTaq (5unit/μl)	0,1 μl
dH ₂ O	15 μl
Toplam	20 μl

Çizelge 2.1b. Reaksiyon şeması- Birinci PCR

	Sıcaklık	Zaman
1	94°C	30 saniye
2	94°C	20 saniye
3	50°C	40 saniye
4	72°C	1dakika/kb
5	2. basamağa geri dön	29 kez
6	72 °C	5 dakika
7	4 °C	∞

2.6.1.2. "Kanamycin" ve "Hygromycin" gen kasetlerinin çoğaltılması- İkinci PCR

İlk PCR' da lineer olarak elde edilen kanamycin ve hygromycin gen kasetleri daha fazla ürün almak amacıyla tekrar çoğaltılmıştır. "Büyük PCR" olarak adlandırdığımız, bu ikinci klasik PCR metodunda sekiz tüp için hesap yapılmıştır ve bu amaçla ortak bir karışım tüpü hazırlanıp dağıtım yapılmıştır. " İkinci PCR" için kullanılan içerik ve değerleri aşağıdaki gibi verilmiştir (Çizelge 2.2a ve 2.2b).

Çizelge 2.2a. İkinci PCR içeriği.

PCR içeriği	Miktar(μl)× 8
TaKaRa 10x ExTaq Buffer (25mM MgCl₂ içerikli)	80 μl
dNTP karışımı (herbirinden 2.5mM)	64 μl
Primer(forward) (0.025 mM) 7,11	12,8 μl
Primer(revers) (0.025 mM) 8,12	12,8 μl
Template	80 μl
TaKaRa ExTaq (5unit/μl)	4 μl
dH₂O	552,4 μl
Toplam	800 μl

Çizelge 2.2b. İkinci PCR Reaksiyon şeması.

	Sıcaklık	Zaman
1	94°C	30 saniye
2	94°C	20 saniye
3	50°C	40 saniye
4	72°C	1dakika/kb
5	2. basamağa geri dön	29 kez
6	72°C	5 dakika
7	4°C	∞

2.6.2. PCR Ürünlerinin Tuzla Çöktürme ile Saflaştırılması

İkinci PCR sonucu elde edilen gen kasetleri tuz ile çöktürme (Kazuei Igarashi) protokolünde kalıp olarak kullanılmıştır. Öncelikle 50 μl NaOAc (1,5 M, pH 5,5), ardından ve 250 μl PCR ürünü eklenmiş ve ardından vorteks yapılmıştır. Son olarak ise 750 μl % 100 lük EtOH eklenerek tekrar vorteks yapıp -20 °C' ye kaldırılmıştır. Bir gece -20 °C' de bekletilen DNA kasetleri; -20 °C den alınarak alt üst edilip buzlanma yok olana kadar kontrol edilmiş ve ardından 4 °C derecede 14000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda alınan örneklerin üzerindeki süpernatant dökülürken, DNA peletine dokunmamaya özen gösterilmiştir. Örnekler üzerine 850 μl kadar % 70' lik etanol ile yıkanmıştır. Ardından 14000 rpm' de 10 dakika çevrilmiştir, bu isteğe bağlı olarak 5 dakikaya da düşürülebilir. Ardından alınan örneklerin

üzerindeki etanol uzaklaştırılmıştır. Tekrar 14000 rpm' de 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Süpernatant dökülüp ve pelet daha sonra kurumaya bırakılmıştır. Kuruma sonrası DNA peleti 10 µl distile suda çözülmüş ve DNA kasetleri transformasyona hazır hale getirilmiştir.

2.6.3. Transformasyon

S. pombe hücreleri, transformasyon için bir gece öncesinden katı kültürden 100 ml sıvı besiyeri içeren erlenlere aktarılmıştır. Tip yardımı ile alınan 975 h⁺ ve 972 h⁻ ırkı *S. pombe* hücreleri, 30 °C' de 80 rpm' de bir gece çalkalamalı su banyosunda büyümeye bırakılmıştır. *S. pombe* hücreleri gece boyunca YEA besiyerinde ~ 10⁷ hücre/ml yoğunluğuna ulaşana dek büyütülmüştür.

Su banyosundan alınan sıvı kültür, falkon tüplere aktarılmış ve 2 dakika 4000 rpm' de çevrilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet aynı miktarda distile suda çözülerek yine 2 dakika 4000 rpm' de çevrilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre peleti 1 ml LiOAc ile yıkanmıştır (0.1M Lityum Asetik asit, pH 4,9) ve 2 dakika 4000 rpm' de çevrilmiştir.

Daha sonra pelet yaklaşık 2 ml LiOAc ile çözündürülüp 1 saat 33 °C' de su banyosunda 80 rpm' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücreler 2 dakika 4000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası pelet 140 µl' lik LiOAc' ta çözülmüştür. İnkübasyonun ardından izole edilen 10 µl' lik DNA (bölüm 2.5.3) ile 140 µl kadar hücre ile elenmiştir. Daha sonra 350 µl % 50 PEG4000 ilave edilmiş, iyice karıştırılıp alt-üst olması için rotatörde bir saat bırakılmıştır. Rotatörden alınan örnekler 58 µl DMSO eklenmiştir. Ardından 5 dakika 42 °C' de ısı şoku yapılan örnekler, 2 dakika 4000 rpm' de santrifüj edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerindeki süpernatant çekilerek 120 µl dH₂O eklenerek pelet çözündürülmüş ve 2 dakika 4000 rpm' de santrifüj yapılmıştır. Yaklaşık 60 µl transforme olmuş hücre elde edilmiştir. Elde edilen *S. pombe* hücreleri YEA içeriğine sahip besiyerlerine öze yardımı ile tüm alanı kaplayacak şekilde ekilmiştir. Ekim işlemi için suda çözündürülmüş toplam 60 µl transforme hücre besiyerlerine eşit olarak paylaştırılmıştır. Ardından alınan örnekler besiyerlerine kuruluk hissedinceye kadar yayılmıştır. YEA (250 µl/plate) besiyerlerinde 33 °C' de bir gece bekletilmiştir.

2.6.3.1. Replica Plate yöntemi

Replica plate için yaklaşık 17×3 cm ölçülü alüminyum folyo ile kaplanmış silindirik bir düzenek kullanılmıştır. Üzerine aktarım sırasında kontaminasyonu önlemek ve düzgün bir aktarım için 11x14cm, 3mm Whatmann kâğıdı kullanılmıştır. SPAC409.08 geni için dört tane, SPBC9.02c geni için ise altı YEA plate replica yapılmıştır. Hücreler replica plate ile YEA (250 µl/plate) içeriğine sahip otoklavlanmış ve besiyerleri 4 °C' de saklanmıştır. Replica plate yapıldıktan sonra 27 °C' de yaklaşık dört gün inkübe edilmiştir.

2.6.3.2. Antibiyotiğe dirençli kolonilerin seçimi

Antibiyotikli besiyerlerini hazırlamak için 300 ml YEA çözündürülmüştür. kan-YEA besiyerlerine 200mg/l G418 kan antibiyotiği ilave edilmiştir. 300 ug/ml Hygromycin Replica plate sonrasında kan-YEA ve hph-YEA içerikli besiyerlerinde transformasyonun gerçekleştiği hücrelerin koloni oluşturduğu gözlenmiştir.

2.6.4. Koloni PCR

Kan veya hph transformatlarının homolog rekombinasyon ile DNA fragmentlerinin bütünleştiği PCR ile kontrol edilmiştir. Bir primer transforme edilmiş fragmente karşılık gelir ve kanMX6 kasetinin P_{TEF} bölgesine bağlanır. İkinci primer hedef genin yukarı bölgesine bir karşılık gelir. Fragmentlerin doğru bağlandığı bu primerler ile gözükür. Elimizde " pFA6a-kanMX6 (kan)" kaseti iç bölgesinin forward ve revers primerleri bulunmaktadır. Bu PCR' da pFA6a-kanMX6 (kan) ve pFA6a-hphMX6 (hph) modülünün iç bölgesine denk gelen P_{TEF} ' e bağlanan: "CTCTACAGGGGCGCGGCGTGGGGAC" dizisine sahip revers primeri kullanılmıştır.

Koloni PCR için SPAC409.08 ve SPBC9.02c genlerinin yukarı bölgesine denk gelen forward primerleri için sırasıyla; " GTCAACTTTGCTACCCCATCGTTGC" ve "ACTACTGAAGTGCGAAGTAACACCG" dizisine sahip primerler kullanılmıştır. Koloni PCR yönteminde, kalıp olarak canlı koloniler kullanılmıştır. Bu hücre topluluğunun genomik DNA' sının elde edilmesi amacıyla 10 dakika 98 °C' de hücreler

“thermal cycler” ’ da kaynatılmıştır (Çizelge 2.3a). Ardından kalıp olarak kullanılan koloni süspansiyonu, çizelge 2.3b’ de verilen içerikle PCR tüplerine dağıtılmıştır.

Çizelge 2.3a. Reaksiyon şeması.

Koloni	Pipet ucu ile yeteri kadar
dH ₂ O	10 µl

Bu karışım ilk olarak 98 °C' de 10 dakika kaynatılır ve ardından hemen 4 °C' ye soğutulur. Daha sonra, kaynatılan solüsyona aşağıda gösterilen enzim karışımı eklenir.

Çizelge 2.3b. Koloni PCR içeriği.

PCR içeriği	Miktar(µl)×16
TaKaRa 10x ExTaq Buffer (25mM MgCl₂ içerikli)	2× 16 = 32 µl
dNTP karışımı (herbirinden 2.5mM)	1,6×16 = 25,6 µl
Primer(forward) =	0,4× 8 = 12,8 µl
Primer(revers) = 2	0,4 × 8 = 12,8 µl
Colony suspension	5 µl
TaKaRa ExTaq (5unit/µl)	0,2× 8 = 3,2 µl
dH₂O	166,4 µl
Toplam	20 × 16=320 µl

Enzim karışımının eklenmesinden hemen sonra aşağıdaki reaksiyon başlatılır:

Çizelge 2.3c. Reaksiyon şeması.

	Sıcaklık	Zaman
1	94 °C	30 saniye
2	94 °C	20 saniye
3	50 °C	40 saniye
4	72 °C	1dakika/kb
5	2. basamağa geri dön	29 kez
6	72 °C	5 dakika
7	4 °C	∞

2.6.6. Agaroz Jel Elektroforezi

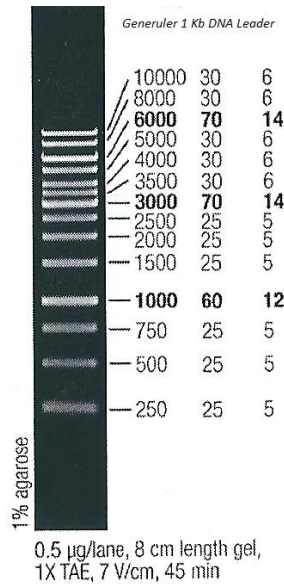
PCR ürünlerinin moleküler büyüklüklerinin tespit edilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforezi için 100 ml % 1' lik agaroz çözeltisi ve elektrik akımını iletilmesi amacıyla 1×TAE (Tris: Asetik asit: EDTA) çözeltisi kullanılmıştır. PCR ürünlerinin görüntülenmesi amacıyla ise Etidyum Bromür (2,5µl/100ml TAE) kullanılmıştır.

100 ml % 1' lik agaroz çözeltisi:

Agaroz: 2 g/l,

1×TAE: 10× TAE' den elde edilmiştir.

Agaroz jel elektroforezi klasik PCR' da ~1,6 kb gen parçası için ve koloni PCR' da ise ~0,5 kb gen parçası için 100 volta 1 saat yürütülmüştür. Ardından UV translüminatör ile DNA bantları görüntülenmiştir. Bu çalışmaların tamamında kullanılan DNA belirteci ise aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. DNA belirteci (1 kbp DNA leader).

2.7. Delesyon Mutantlarının Karakterizasyonu

SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin genomdan uzaklaştırılmasını sağlayarak delesyon mutantları oluşturulmuştur. Mutasyonlar koloni PCR yöntemi ile doğrulanmıştır. Sonraki aşamada bu mutantlar üzerinde hücre döngüsü ve strese hassasiyet analizleri yapılmıştır. Bu genlerin hücre döngüsündeki rollerini anlamak için hücrelerin büyüme grafiği, hücre boyu analizleri, morfolojik analizler, sporlanma testleri ile mitoz ve mayoz bölünme gözlemlenmiştir. Ayrıca hücreler besiyerlerinde farklı stres koşullarına maruz bırakılarak, bu genlerin strese cevaptaki potansiyel rolleri incelenmiştir. Hücreler osmotik stres (NaCl, CaCl₂, KCl, sorbitol) ve DNA hasarı (UV ışınması, hydroxyurea) stresine maruz bırakılmıştır.

2.7.1. Büyüme analizleri

Deneylerde yabanıl tip *S. pombe* hücreleri ile bunların *SPBC9.02cΔ* ve *SPAC409.08Δ* mutantları kullanılmıştır. Hücrelerin büyümeleri 30 °C' de, YEA zengin besiyerinde sağlanmıştır.

Yabanıl tip 972 h⁻ *S. pombe* hücresi ve *SPBC9.02cΔ* ve *SPAC409.08Δ* mutantları, 100 ml YEA içeren besiyerlerine tip ucu ile yeteri kadar eklenmiştir. Ardından gece boyunca çalkalamalı su banyosunda 33 °C 80 rpm' de büyümeye bırakılmıştır. Bu süre sonunda alınan 10 µl su + 10µl hücre içeriği süspansiyonu thoma lamına alınarak hücre sayımı yapılmıştır. Birim kare başına 4 hücre gelecek şekilde seyreltmeler yapılmıştır. Daha sonra iki saat süre aralıklar ile thoma lamında hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Bu iki saat aralıklarda kültürler 33 °C 80 rpm' de su banyosunda bekletilmiştir. Toplamda 6 sayım yapılmış ve sonuçlar kaydedilmiştir.

2.7.2. Stres Analizleri

Mutantlar üzerinde hücre döngüsü ve strese hassasiyet analizleri yapılmıştır. Bu genlere sahip hücreler besiyerlerinde farklı stres koşullarına maruz bırakılmış ve bu genlerin strese cevaptaki potansiyel rolleri incelenmiştir. Hücrelere uygulanan stresler içerisinde osmotik stres uygulamaları (NaCl, CaCl₂, KCl, sorbitol) aşağıda verilmiştir. Koloni PCR sonucu transformatların belirlenmesinin ardından, mutant *S. pombe* hücrelerinin fizyolojik ve hücresel düzeydeki özelliklerinde meydana gelen değişimlerin belirlenmesi ayrıca çevresel stres koşullarına karşı dirençlerinin ölçülmesi amacıyla

aşağıdaki verilen işlemler gerçekleştirilmiştir. Bu işlemlerin doğru sonuç verebilmesi için yabancıl tip hücreler ile SPAC409.08 ve SPBC9.02c genleri bakımından mutant hücrelerden eşit miktarda alınmıştır. Bu amaçla thoma lamı üzerinde sayım yapılarak birim kareye ne kadar hücre düştüğü hesaplanmıştır. Ardından gerekli seyreltmeler yapılarak hücre sayıları eşitlenmiştir. İlk olarak, 5×10^4 hücre/ml oranına ulaşılmıştır. Daha sonra şekilde görüldüğü gibi 1/10 oranında yapılan seri seyreltmelerle petri kaplarına ekim yapılmıştır.

Spot testler için hazırlanmış YEA ve YEA+X içerikli besiyerlerine ekim yapılırken damlatma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hücre miktarlarının çevresel faktörlere verdiği cevap karşılaştırılmıştır. Damlatma yöntemi ile hücreler sırasıyla aşağıdaki gibi sıralanmıştır.

	5×10^4	5×10^3	5×10^2	5×10^1	5	hücre/ml
WT(975 h⁺ ve 972 h⁻) :						
SPAC409.08Δ :						
SPBC9.02cΔ :						

SPAC409.08Δ ve *SPBC9.02cΔ* mutantı *S. pombe* hücrelerinin, yabancıl tip *S. pombe* ırklarına oranla osmotik basınç değişimlerinin tespiti amacıyla YEA besiyeri içeriğine farklı kimyasallar eklenmiştir.

2.7.2.1. NaCl içerikli besi ortamı ile muamele

YEA + 0,2 M NaCl besiyeri daha önce 2.6.2 'de spot testlerde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile ekim yapılarak osmotik stres oluşumunda normal hücreler ile mutant yapılan hücreler arasında ki farklılıklar gözlenmiştir.

YEA + 0,9 M NaCl besiyeri ile birlikte yoğunluğu arttırılmış, ikinci bir stres testi yapılmıştır. Bunun için ise YEA + 0,9 M NaCl içeriğe sahip besiyeri kullanılmıştır.

2.7.2.2. KCl içerikli besi ortamı ile muamele

YEA + 0,5 M KCl besiyeri daha önce 2.6.2'de spot testlerde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile ekim yapılarak osmotik stres oluşumunda normal hücreler ile delesyon mutantı yapılan hücreler arasında ki farklılıklar gözlenmiştir.

YEA + 1 M KCl besiyeri ile birlikte yoğunluğu arttırılmış, ikinci bir stres testi yapılmıştır. Bunun için ise YEA + 1 M KCl içeriğe sahip besiyeri kullanılmıştır.

2.7.2.3. CaCl₂ içerikli besi ortamı ile muamele

YEA + 120 mM CaCl₂ besiyeri daha önce 2.6.2'de spot testlerde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile ekim yapılarak osmotik stres oluşumunda normal hücreler ile mutant yapılan hücreler arasında ki farklılıklar gözlenmiştir.

YEA + 0,5 mM CaCl₂ besiyeri ile birlikte yoğunluğu arttırılmış ikinci bir stres testi yapılmıştır. Bunun için ise YEA + 0,5 M CaCl₂ içeriğe sahip besiyeri kullanılmıştır.

2.7.2.4. Sorbitol içerikli besi ortamı ile muamele

YEA + 2 M sorbitol besiyeri daha önce 2.6.1.1' de spot testlerde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile ekim yapılarak osmotik stres oluşumunda normal hücreler ile mutant yapılan hücreler arasında ki farklılıklar gözlenmiştir.

2.7.3. DNA Hasarı Testleri

SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin genomdan uzaklaştırılmasını sağlayarak delesyon mutantları oluşturulmuştur. Sonraki aşamada bu mutantlar üzerinde hücre döngüsü ve strese hassasiyet analizleri yapılmıştır. Ayrıca hücreler besiyerlerinde farklı stres koşullarına maruz bırakılarak DNA hasarı (UV ışınması, hydroxyurea) stresi kontrol edilmiştir.

2.7.3.1. UV' nin mutant *S. pombe* hücrelerinin yaşama yeteneği üzerine etkisi

Ultraviyole ışınların öldürücü özelliklerinin saptanmasında Galli ve Schiest (1995) 'in geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Yabanıl 975 h⁺ ve 972 h⁻ ırkları, *SPBC409.08Δ* ve *SPBC9.02cΔ* mutantlarının değişik UV ışın konsantrasyonlarından sonra hayatta kalma oranları karşılaştırılmıştır. Bunun için YEA içeren besiyerlerine 5.6.1.'de spot testlerde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile hücre ekimi yapılmıştır. YEA' da 30 °C 'de üretilmiş 975 h⁺ ve 972 h⁻

kültürü 5 ml su ile süspanse hale getirilmiştir. 5×10^4 hücre/ml ilk hücre topluluğu damlatılmıştır. Ekimi yapılan YEA besiyerleri sırasıyla;

100 jull/m², 200 jull/m², 500 jull/m² ve 1000 jull/m² enerjisindeki UV ışınına maruz bırakılmıştır. Ardından bir de kontrol YEA besiyeri ile birlikte 3-4 gün süre ile 27 °C 'de inkübatörde bekletilmiştir. UV uygulamaları sonucunda üreyen koloni sayıları, kontrol grubundakilere oranlanarak, UV dozlarının öldürücülük etkileri belirlenmiştir.

2.7.3.2. HU (hydroxyurea) içerikli besi ortamı ile muamele

DNA sentezi ve dNTP düzeyleri arasındaki ilişki ribonükleotid redüktaz enzimi (RNR) inhibitörü hydroxyurea (HU) ile işlem görerek mayalarda senkronize edilerek araştırılmıştır (Koç vd., 2004). HU tarafından DNA sentezini bloke edilerek ve normal olarak G₁/S geçişinde dNTP havuzunun genişlemesi önlenmiştir.

YEA + 4 mM hydroxyurea besiyeri daha önce 2.6.2 'de stres analizlerinde anlatılan şekilde hücre sayımı ve damlatma metodu ile ekim yapılarak DNA hasarı oluşumunda normal hücreler ile mutant yapılan hücreler arasında ki farklılıklar gözlenmiştir. YEA +10 mM hydroxyurea besiyeri ile birlikte yoğunluğu arttırılmış ikinci bir stres testi yapılmıştır. Bunun için ise YEA + 10 mM hydroxyurea içeriğe sahip besiyeri kullanılmıştır.

2.7.4. *S. pombe*' de Boyut Analizi

Yabanıl tip 972 h⁻ *S. pombe* hücresi (Leupold, 1970), *SPBC409.08Δ* ve *SPBC9.02cΔ* mutantları, hücre-boyut ölçümleri için kullanılmıştır. Hücreler gece boyunca 33 °C' de 80 rpm' de çalkalamalı su banyosunda YEA besiyerinde büyütülmüştür (Creanor ve Mitchisin, 1982). Gece boyunca büyütülen hücrelerin yabanıl tip *S. pombe* ve mutantlarından 40 hücre rastgele seçilerek ışık mikroskopunda "stream basic" adı verilen bir yazılım ile boy ölçümleri yapılmıştır. Minimum ve maksimum değerler belirlenmiştir. Bu değerler ile "SPSS " yapılarak, sonuçların önem arz edip etmediğine bakılmıştır.

2.7.5. Spor Oluşumu ve Sporulasyonun Gözlenmesi

S. pombe hücrelerinde nitrojen kaynağı kesildiğinde oluşan stres koşulu altında hücrelerin mayoz II sitokinez evresinde tetrad yapısı oluşumu gözlenmiştir. Bu amaçla Yabanıl tip 972 h⁻ *S. pombe* hücresi (Leupold, 1970) , *SPBC409.08Δ* ve *SPBC9.02cΔ* mutantları, SPA agar besiyerlerine ekilmiştir. Bu ekim işleminde hücrelerin kros oluşturması için; yabanıl 972 h⁻ ile 975 h⁺, *SPBC409.08Δ* ile yabanıl tip 972 h⁻ , *SPBC9.02cΔ* ile *SPBC409.08Δ* son olarak ise *SPBC9.02cΔ* ile yabanıl tip 975 h⁺ hücreleri süspanse edilmiştir.

2.7.6. Verilerin İstatistiksel Analizleri

SPBC409.08Δ ve *SPBC9.02cΔ* mutantlarının hücre boyutu ile büyüme analizlerinin karşılaştırılması SPSS programı yardımıyla yapılmaktadır. SPSS bilgisayar programı (*Statistical Package for the Social Sciences*), ilk sürümü 1968 yılında piyasaya verilmiş istatistiksel analize yönelik bir bilgisayar programıdır. SPSS programının T-test adı verilen yöntemi, iki ortalama değerin karşılaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bizim elimizde bulunan delesyon mutanları verileri de bu türdendir. Hücre boyutu ve büyüme analizlerinde mutantlardan elde edilen veriler, yabanıl tip *S. pombe* hücresinin değerleri ile karşılaştırılarak sonuçlar yorumlanacaktır. T-test adı verilen yöntem ise kendi içinde dörde ayrılmaktadır. Biz burada hücre boyutu analizi için bağımsız T-test yöntemini kullanacağız. Bağımsız örneklem T-test yöntemi iki grubun ortalamasının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır. Büyüme analizlerinde ise eşleştirilmiş örneklem T-test kullanılacaktır. Eşleştirilmiş örneklem T-test bir verinin farklı zaman dilimlerinde veya başka bir deyişle bir deney öncesi ve sonrası gibi durumlar için kullanılmaktadır. T-testler sonucunda iki grup ortalamaları karşılaştırılmaktadır. T-test sonucunda elde edilen p adı verilen değerin < 0,05 olup olmadığına göre değerler yorumlanmaktadır. P- değeri, p < 0,05 ise elde edilen değer istatistiksel olarak anlamlıdır denilmektedir. Elde edilen p > 0,05 ise elde edilen değer istatistiksel olarak anlamlı değildir diye yorumlanmaktadır.

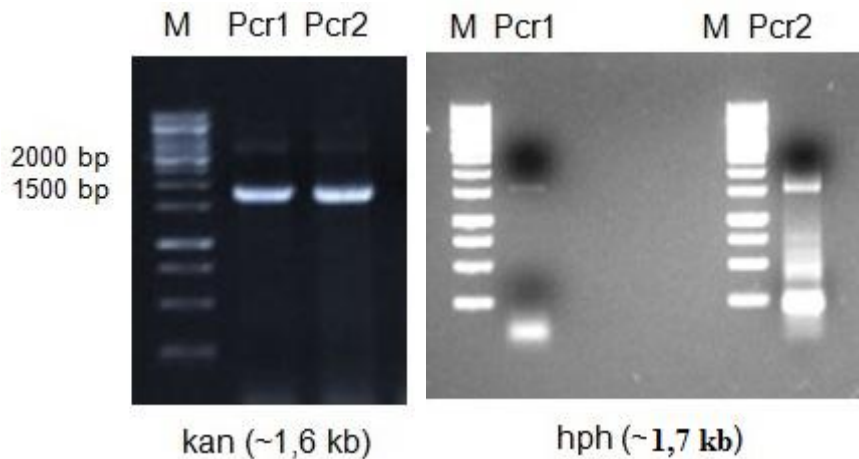
3. BULGULAR

3.1. Delesyon Mutantlarının Oluşturulması

SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin karakterizasyonunda ki ilk adım olarak, *S. pombe*' de bu genlerin delesyonu sağlanmıştır. Antibiyotik direnç genleri PCR ile çoğaltılıp yabancı tipte hücrelere transforme edilmiştir. Homolog rekombinasyon ile genom katılan antibiyotik direnç genleri, SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin genomdan uzaklaştırılmasını sağlayarak delesyon mutantları oluşturulmuştur. Mutasyonlar koloni PCR yöntemi ile doğrulanmıştır.

3.1.1. Antibiyotik Direnç Genlerinin Çoğaltılması

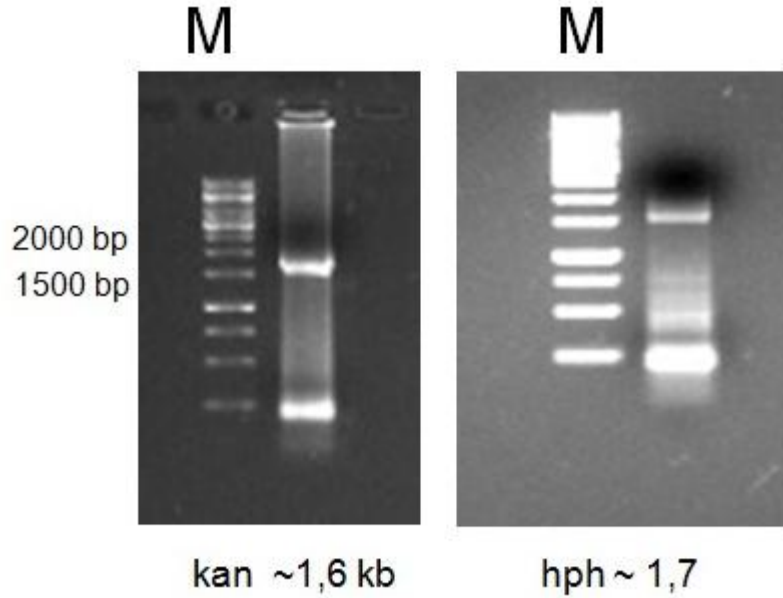
Delesyon mutantlarının oluşturulması amacı ile alıcı hücreye aktarılabacak doğrusal gen kasetleri "pFA6a-KanMX6 (Kan)" ve "pFA6a-hphMX6 (hph) modülü" (Şekil 2.3) direnç geni plazmidlerinden, polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) -temelli gen değiştirme yöntemi ile izole edilmiştir. Uygun primerler kullanılarak elde edilen doğrusal "kan" ve "hph" kasetlerinin, birinci PCR ve ikinci PCR sonuçları aşağıdaki gibi gösterilmiştir (Şekil 3.1). SPAC409.08 geni ve SPBC9.02c geni için primerler kasetleri ise 2.5.2.'de ki konu başlığında verilmiştir.



Şekil 3.1. Birinci PCR ve ikinci PCR sonucunda kan ve hph doğrusal kasetleri büyüklükleri.

3.1.2. PCR Ürünlerinin Tuzla Çöktürme ile Saflaştırılması

Elde edilen “kan” ve “hph” doğrusal gen kasetlerinden bölüm 2.5.2’ de belirtildiği yöntemle DNA saflaştırılmıştır. Saflaştırılan gen kasetleri kontrol amaçlı olarak agoroz jelde yürütülmüş ve görüntülenmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Tuzla Çöktürme sonucu “kan” ve “hph” gen kasetleri.

3.1.3. Transformasyon ve Antibiyotiğe Dirençli Kolonilerin Seçimi

PCR ürünlerinin saflaştırılması sonucu elde edilen doğrusal kan ve hph gen kasetleri kullanımına kadar – 20 °C’ de dH₂O ile süspansiyon halinde bekletilmiştir. Bu sırada yabancı tip (972 h⁻ ; *SPAC9.02cA* mutant hücresi için, 975 h⁺; *SPBC409.08A* mutant hücresi için) hücreler bölüm 2.5.4’ de belirtildiği şekilde transformasyona hazırlanmıştır. Transformasyona hazır hale getirilen örnekler, gen kasetleri ile muamele edildikten sonra normal besiyerine alınmasının ardından bir gün sonra oluşturulacak SPBC409.08 mutantı için G418 kan antibiyotiği ve SPAC9.02c mutantı için ise hph antibiyotiği içeren besiyerlerine bölüm 2.5.4.1’ de belirtildiği şekilde “replica plate” ile aktarılmıştır. Birkaç gün sonra oluşan antibiyotiğe dirençli koloniler şekildeki gibi gözlenmiştir (Şekil 3.3).



SPBC9.02C antibiyotiğe dirençli koloniler

Şekil 3.3. Koloni PCR öncesi doğru transformatlar seçilmeden önceki genel koloni durumu.

3.1.4. Koloni PCR

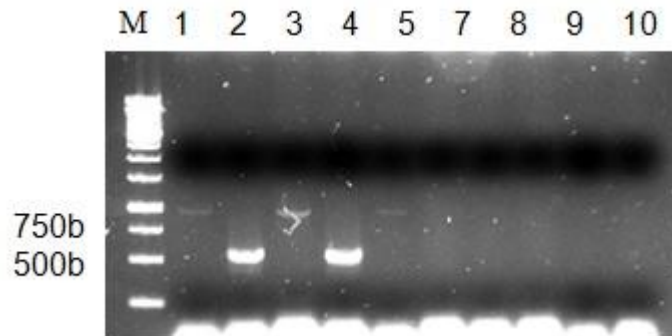
Kan ve hph direnç genlerinin genomda doğru yere entegre olup olmadığını kontrol etmek amacıyla “koloni PCR” olarak adlandırılan yönteme başvurulmuştur. Bu amaçla direnç geni üzerinde bir bölgeye komplementer olan bir primer ile hedef genimize komşu olan gen bölgelerinden biri üzerinde homoloji bölgesi bulunan bir primer dizayn edilmiştir (bkz. bölüm 2.5.4). Geleneksel PCR’ dan farklı olarak koşulları Çizelge 2.3a ve Çizelge 2.3b’ de belirtilen şekilde yapılan PCR ardından agaroz jelde yürütülen örnekler UV ışık altında görüntülenmiştir. Karşılaştırma sonucunda yaklaşık ~0,5 - 0,6 kbp büyüklüğünde olan DNA parçası belirlenen örnekler seçilmiştir (Şekil 3.4a ve 3.4b).

3 nolu mutant: (100ml'lik 10^7 hücre/ml konsantrasyonunda kültür alınmıştır) 10^9 hücre ile transformasyon yapılmıştır. G418⁺ petrilere 17 koloni oluşmuş, 2 koloni G418⁺ petrilere alınınca yaşamamıştır. PCR sonucunda 2 koloni pozitif çıkmıştır.



Şekil 3.4a. *SPAC9.02cΔ* mutantına ait koloni PCR.

2 nolu mutant: (100ml'lik 10^7 hücre/ml konsantrasyonunda kültür alındı) 10^9 hücre ile transformasyon yapılmıştır. G418⁺ petrilere 10 koloni oluşmuştur. PCR sonucunda 2 koloni pozitif çıkmıştır.



Şekil 3.4b. *SPBC409.08Δ* mutantına ait koloni PCR.

3.2. Delesyon Mutantlarının Karakterizasyonu

Deneylerde yabancı tip *S. pombe* hücreleri ile bunların *SPBC9.02cΔ* ve *SPAC409.08Δ* mutantları kullanılmıştır. Hücrelerin büyümeleri 30 °C' de, YEA zengin besiyerinde sağlanmıştır. Sonraki aşamada bu mutantlar üzerinde hücre döngüsü ve strese hassasiyet analizleri yapılmıştır. Bu genlerin hücre döngüsündeki rollerini anlamak için hücrelerin büyüme grafiği, hücre boyu analizleri, morfolojik analizler, sporlanma testleri ile mitoz ve mayoz bölünme gözlemlenmiştir. Ayrıca hücreler besiyerlerinde farklı stres koşullarına maruz bırakılmış ve bu genlerin strese cevaptaki

potansiyel rolleri incelenmiştir. Hücrelere uygulanan stresler içerisinde osmotik stres (NaCl, CaCl₂, KCl, sorbitol) ve DNA hasarı (UV ışıması, hydroxyurea) stresi de vardır.

3.2.1.Büyüme Grafiği

Yabanıl tip 972 h⁻ hücreleri ile *SPBC409.08Δ* ve *SPBC9.02cΔ* mutantı *S. pombe* hücrelerinin, bölüm 2.6.2’ de belirtilen yöntemle üremeleri izlenmiştir. Bilinen belli bir hacimdeki süspansiyonda üremeleri gerçekleşen hücrelerin (Çizelge 3.1)’ de ki verilerden yararlanılarak büyüme eğrisi grafiği çıkarılmıştır (Şekil 3.6).

Çizelge 3.1. Zamana bağlı olarak *S. pombe* ırklarında belirlenen hücre sayıları.

Zaman (t)	<i>S. pombe</i> ırkları		
	972 h ⁻	<i>SPBC409.08Δ</i>	<i>SPAC9.02cΔ</i>
<i>t=0</i>	8,16	6,66	6,16
<i>t=2</i>	13,33	13,33	11
<i>t=4</i>	21,5	18,83	23,16
<i>t=6</i>	54,66	49,33	34,33
<i>t=8</i>	94	91	62,16
<i>t=10</i>	171,66	136,66	102,5

Bu çizelgeye göre 8. saatte hücre sayısı başlangıçtaki değerinin iki katına yaklaşık 2×10^7 ‘ye çıkmıştır.

Çizelge 3.2a. Wild-type (972 h⁻) ve *SPAC9.02cA* mutan^tı hücrelerin üreme verilerinin SPSS programı yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırılması (SPSS eşleştirilmiş örneklem T-test analizi sonucu p- değeri 0,120 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağlamamaktadır).

Eşleştirilmiş Örneklem İstatistikleri

	Ortalama	N	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
Çift 1 SPAC9.02c	39,88888889	6	36,60246905	14,94289542
WT	60,55555556	6	63,24359139	25,81908807

Eşleştirilmiş Örneklem Testi

	N	İlişki	Anlamı
Çift 1 SPAC9.02c ve WT	6	,995	,000

Eşleştirilmiş Örneklem Testi

						t	df	Anlamı (2-kuyruklu)
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	Farkın % 95 güven aralığı				
				alt sınır	üst sınır			
Çift 1 SPAC.02c- WT	-20,66666667	27,05693585	11,04594781	-49,06117946	7,727846124	-1,871	5	0,120

Çizelge 3.2b. Wild-type (972 h⁻) ve *SPBC409.08A* mutan^tı hücrelerin üreme verilerinin SPSS programı yardımıyla istatistiksel olarak karşılaştırılması (SPSS eşleştirilmiş örneklem T-test analizi sonucu p - değeri 0,207 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri p < 0,05 şartını sağlamamaktadır).

Eşleştirilmiş Örneklem İstatistikleri

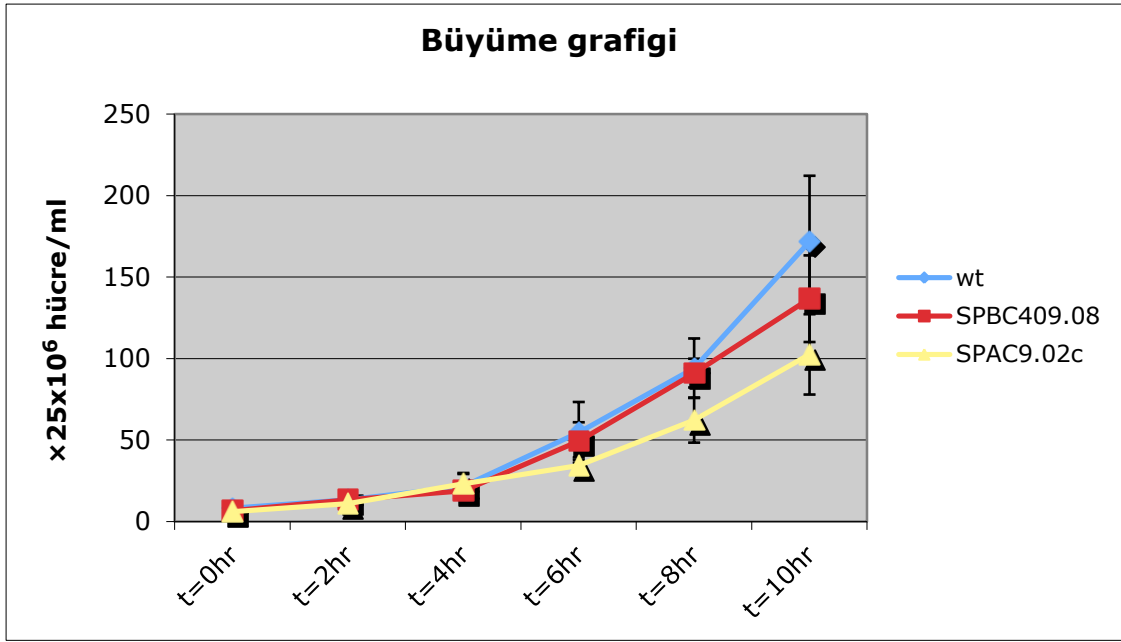
	Ortalama	N	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
Çift 1 SPBC409.08	52,63888889	6	51,66111977	21,09056383
WT	60,55555556	6	63,24359139	25,81908807

Eşleştirilmiş Örneklemler Arasındaki İlişki

	N	İlişki	Anlamı
Çift 1 SPBC409.08 ve WT	6	,993	,000

Eşleştirilmiş Örneklem Testi

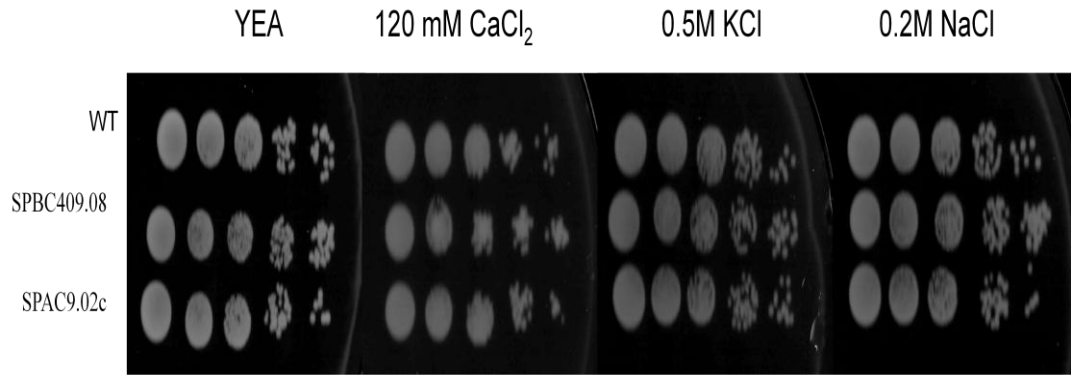
	Çiftlerin Farklılıkları					t	df	Anlamı (2-kuyruklu)
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	Farkın % 95 güven aralığı				
				alt sınır	üst sınır			
Çift 1 SPBC409.08- WT	-7,916666667	13,38479652	5,464320296	-21,96314916	6,129815830	-1,449	5	0,207



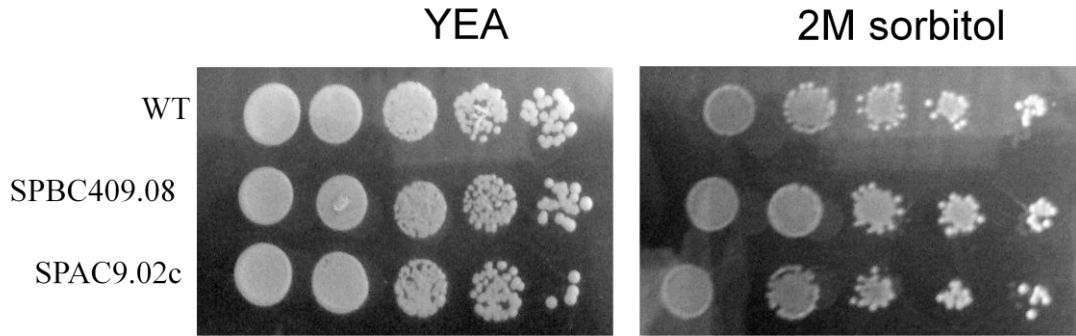
Şekil 3.5. *S. pombe* (972 h⁻¹) ile *SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ* mutantlarının ırklarının üreme eğrisi grafiği.

3.2.2. Stres Testleri

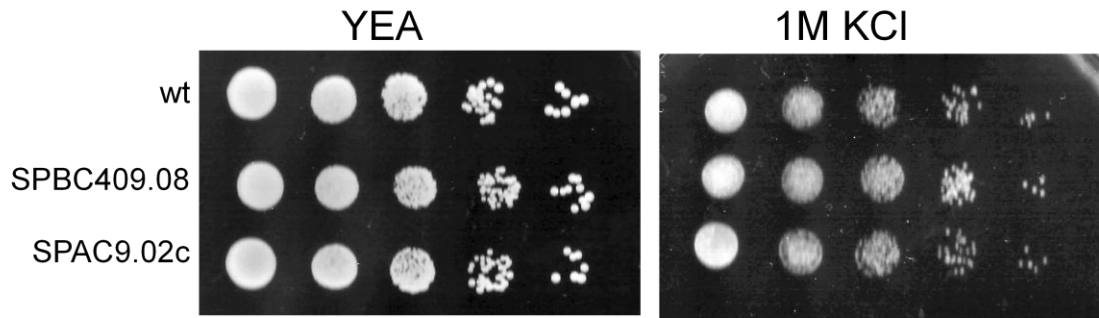
Besiyerlerine değişik yoğunluklarda NaCl KCl, CaCl₂ ve sorbitol eklendikten sonra, miktarında süspansiyon koloniler bölüm 2.6.2' de belirtildiği şekilde tek damla halinde ekilmiştir.. Ekim yapılmasının ardından 27 °C' de dört gün bekletilen örneklerin değişimin seçilmesi için üremelerinin uygun olduğu gözlenmiştir. 0,2 M NaCl, 0,5 M KCl ve 120 mM CaCl₂ içerikli besiyerlerinde yabancı tip (972 h⁻¹) hücresi ile delesyon mutantları (*SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ*) arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.6a). 0,9 M NaCl ve 0,5 M CaCl₂ besiyerlerinde aşırı tuz konsantrasyonu nedeni ile üreme görülmemiştir. 1 M KCl besiyerinde yaklaşık 6-7 gün beklenmesinin ardından sağlıklı üreme gözlemlenmiştir (Şekil 3.6b). 2 M sorbitol içeriğine sahip besiyerinde ise 5×10² miktarında ki kolonide ise üreme itibari ile yabancı tipe oranla daha çok azalma gözlenmiş, ancak bu azalmalar anlamlı bir değer ifade etmemektedir (Şekil 3.6c)



Şekil 3.6a. Farklı derişimlerde osmotik stres testine maruz bırakılan yabancı tip ve delesyon mutan $\acute{t}$ ı *S. pombe* hücreleri (YEA kontrol besiyeridir).



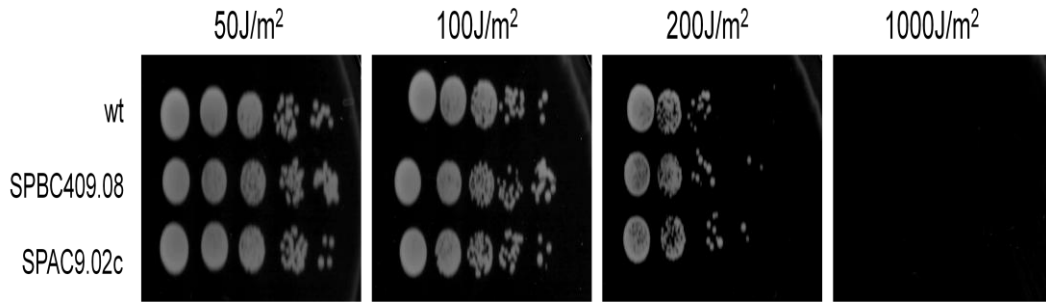
Şekil 3.6b. Sorbitol stresine maruz bırakılan yabancı tip ve delesyon mutan $\acute{t}$ ı *S. pombe* hücreleri (YEA, sorbitol içermeyen).



Şekil 3.6c. Yoğun tuz konsantrasyonu deneyleri sonucunda sadece 1 M KCl içeren besiyerinde yabancı tip ve delesyon mutan $\acute{t}$ ı *S. pombe* hücrelerine rastlanmıştır (YEA, KCl içermeyen).

3.2.3. UV' nin *S. pombe* Mutantlarına Etkisinin Analizi

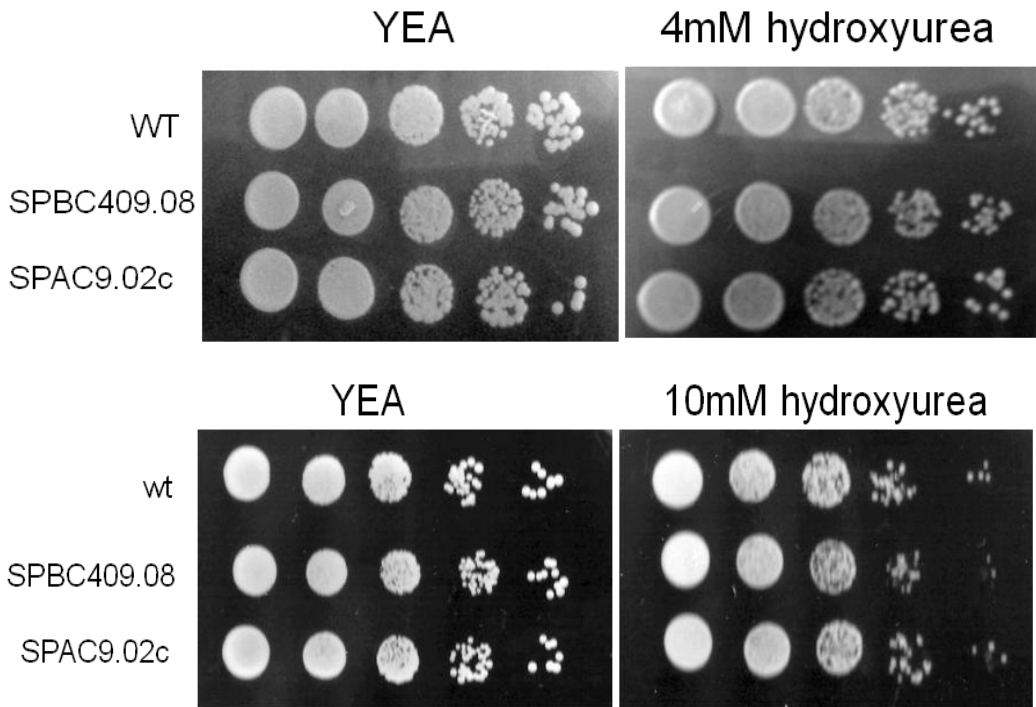
Mutant *S. pombe* hücrelerinin fiziksel bir mutagen olan UV ışık altında enerji miktarına göre öldürücü etkilerine bakılmıştır. UV ışığın enerji miktarının öldürücülük etkisi, UV ışığa maruz bırakılmamış kontrol grubu (972 h^- ve 975 h^+ yabancı ırkları) yardımı ile belirlenmiştir. Bu amaçla bölüm 2.6.3.1' de verilen enerji miktarları, damlatma yöntemi ile ekim yapılan besiyerlerine uygulanmıştır. Enerji değerleri belirlenen maksimum değerden minimum (UV' nin olmadığı) değere doğru hızlı bir azalma göstermiştir. UV ışığı öldürücü etkisi 500 jull/m^2 ve 1000 jull/m^2 düzeyinde tam olarak görüldüğünden sağlıklı üreme gözlenmemiştir. 100 jull/m^2 ve 200 jull/m^2 enerji düzeylerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında belli düzeyde üreme görüldüğünden, anormal bir farklılık gözlemlenmemiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Farklı enerji düzeylerinde UV ışığa maruz bırakılan yabancı tip ve mutant *S. pombe* hücrelerinin analizi.

3.2.4. HU (hydroxyurea) İçerikli Besi Ortamı Analizi

Hydroxyurea (HU) ile bölüm 2.2' de belirtildiği gibi hazırlanan besiyerinde, HU' nün ribonükleotid redüktaz enzimi (RNR)' i bloke ederek dNTP' lerin oluşumunu engellediği kolonilerin üremesine bakılarak gözlenmiştir. 4mM yoğunluğunda ki besiyerinde, delesyon mutanları koloniler ile aynı şartlara maruz bırakılan yabancı tip kolonilerin üremesinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 3.8). 10 mM' lık besiyerlerinde ise yabancı tip ile aynı oranda üreme gözlenmiştir.



Şekil 3.8. 4 mM ve 10 mM hydroxyurea içeriğine sahip besiyerlerinde yabanıl tip ve mutant *S.pombe* hücreleri (YEA, hydroxyurea içermez).

3.2.5. *S. pombe* Mutantlarının Hücre Boyu Analizi

SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin hücre boyuna etkisini anlamak amacı ile boyut analizi bölüm 2.6.4' te verilen şekilde yapılmıştır. Hücre boyutu ölçümleri sonucunda *SPAC9.02cΔ* ve *SPBC409.08Δ* mutantlarının ortalama boy uzunluğu, yabanıl tip 972 h⁻ *S. pombe* ırkları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. SPSS bağımsız T-test (bkz. Bölüm 2.6.6) yardımıyla yapılan hesaplamalar sonucunda *SPAC9.02cΔ* mutantının ~ 13,42 µm olan boy uzunluğu, yabanıl tiplerin boy uzunluğu olan 13,35 oranla anlamlı bir değer ifade etmemektedir (Çizelge 3.3a). *SPAC9.02cΔ* mutantı için $p = 0,753$ olduğundan, bu değer $p < 0,05$ şartını sağlamadığından anlamlı bir değer içermez. *SPBC409.08Δ* mutantının 11,89 olan boy uzunluğu ise yabanıl tip hücrelere oranlara boy kısalığı yönünden istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 3.3b). *SPBC409.08Δ* mutantı için, $p = \sim 0,000$ olduğundan, $p < 0,05$ şartını sağladığından dolayı anlamlı bir değer ifade etmektedir. *S. pombe* 972 h⁻ yabanıl tip, *SPAC9.02cΔ* ve *SPBC409.08Δ* mutantlarının Çizelge 3.2' de verilen boy uzunlukları bilgilerinden yararlanılarak elde edilen veriler Şekil 3.9' de ki grafikte gösterilmiştir.

Çizelge 3.3a. A) *SPAC9.02cΔ* mutanlığı ile yabancı tip hücrelerin ortalamalarının istatistiksel verileri. B) *SPAC9.02cΔ* mutanlığının SPSS bağımsız T-test analizi sonucu p - değeri 0,753 istatistiksel olarak anlamlı değildir (kırmızı ile belirtilen değeri $p < 0,05$ şartını sağlamamaktadır).

A)

Grup İstatistikleri

A	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
Boy WT	40	13,41616759	1,826432642	,2887843570
SPAC9.02c	40	13,24324121	2,935338564	,4641177783

B)

Bağımsız Örneklem Testi

		Dağılımların eşitliği için Levene testi		Ortalamaların eşitliği için t-test						
		F	Anlamı	t	df	Anlamı (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	Std. Sapma farkı	Farkın % 95 güven aralığı	
									alt sınır	üst sınır
Boy	Eşit dağılım varsayımı	4,677	0,034	,316	78	0,753	,1729263783	,5466275853	-,9153255476	1,261178304
	Eşit dağılım olmadığına			,316	65,262	,753	,1729263783	,5466275853	-,9186812107	1,264533967

Çizelge 3.3b. A) *SPBC409.08Δ* mutanlığı ile yabancı tip hücrelerin ortalamalarının istatistiksel verileri. B) *SPBC409.08Δ* mutanlığının SPSS bağımsız T-test analizi sonucu p - değeri 0,000 istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (kırmızı ile belirtilen değeri $p < 0,05$ şartını sağladığından anlamlıdır).

A)

Grup İstatistikleri

B	N	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması
Boy WT	40	13,41616759	1,826432642	,2887843570
SPBC409.08	40	11,89883277	1,628603917	,2575048892

B)

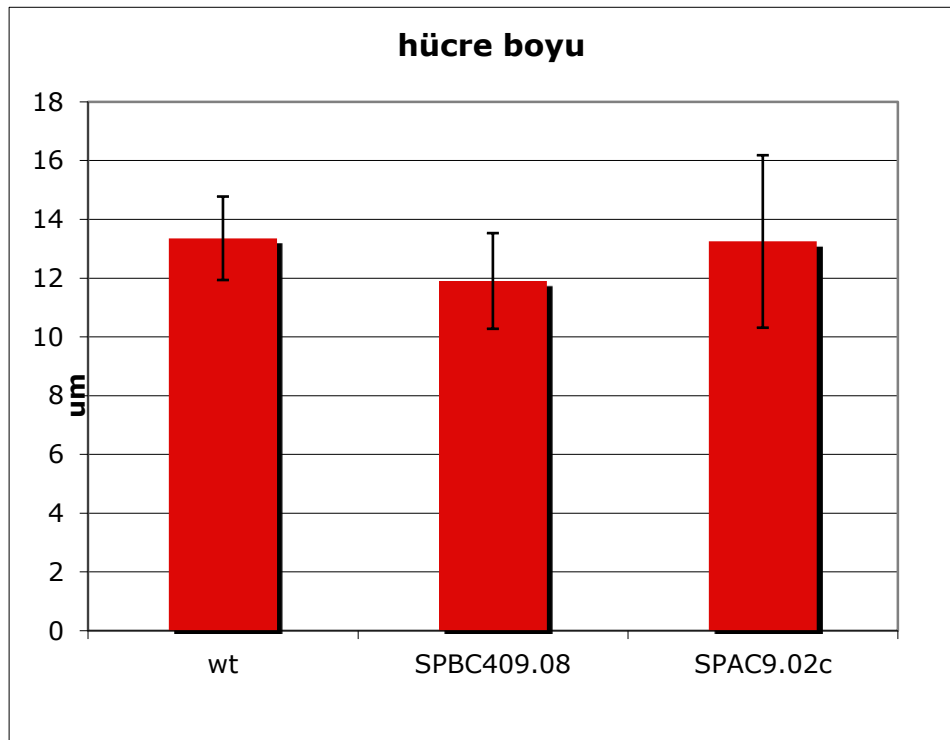
Bağımsız Örneklem Testi

		Dağılımların eşitliği için Levene testi		Ortalamaların eşitliği için t-test						
		F	Anlamı	t	df	Anlamı (2-kuyruklu)	Ortalama farkı	Std. Sapma farkı	Farkın % 95 güven aralığı	
									alt sınır	üst sınır
Boy	Eşit dağılım varsayımı	,027	0,869	3,922	78	,000	1,517334819	,3869175272	,7470411940	2,287628444
	Eşit dağılım olmadığına			3,922	76,997	,000	1,517334819	,3869175272	,7468830901	2,287786548

Çizelge 3.4. Hücre boyutu deneyinde, yabancı tip (972 h⁻ *S. pombe*), *SPBC409.08A* ve *SPAC9.02cA* mutantları için referans alınan boy uzunlukları (μm).

N		<i>SPBC409.08A</i> (μm)	<i>SPAC9.02cA</i> (μm)
1	12,594028	12,25924301	14,00184917
2	15,375506	9,808454514	14,89098167
3	12,544379	13,00039101	20,68027306
4	12,271962	10,95551014	16,46014214
5	18,961794	12,52363491	14,84901524
6	13,610111	11,858181	14,19366455
7	14,5125	11,654706	16,44750023
8	10,67665	14,99191475	17,10466576
9	11,893212	14,62316132	13,00039101
10	14,204652	9,675000191	13,61011124
11	13,471856	13,09604168	11,82744312
12	12,208233	9,133072853	8,222168922
13	15,078384	10,96500015	14,56972027
14	13,413829	9,680373192	10,34013653
15	12,680444	13,0443182	9,70183754
16	14,204652	11,45215607	15,81565762
17	15,815658	10,49983883	16,52635574
18	13,12777	12,07546139	21,63395691
19	12,8879	11,86694813	9,374714851
20	7,7935648	12,07546139	12,77034855
21	13,285277	12,64348125	10,30487156
22	11,936857	9,029999733	13,29701519
23	14,640932	10,49983883	11,52458191
24	9,3913422	12,96433926	14,32132435
25	15,375506	12,04959393	12,96433926
26	14,321324	10,84099007	7,368260384
27	13,882492	14,86651516	10,01309299
28	12,643481	11,98468304	13,0443182
29	13,548839	13,60628986	10,77845001
30	13,871249	13,88249207	12,00202751
31	14,167994	11,45215607	13,56418324
32	13,788526	12,59402752	10,09584713
33	14,105458	13,15546989	13,12777042
34	12,839389	13,56034851	14,19366455
35	14,167994	10,0182848	13,22249985
36	10,73494	13,22249985	13,29701519
37	14,204652	13,09604168	13,15942287
38	13,545	10,56402874	13,22249985
39	14,001849	12,46119308	13,88249207
40	14,866515	8,222168922	10,32503796

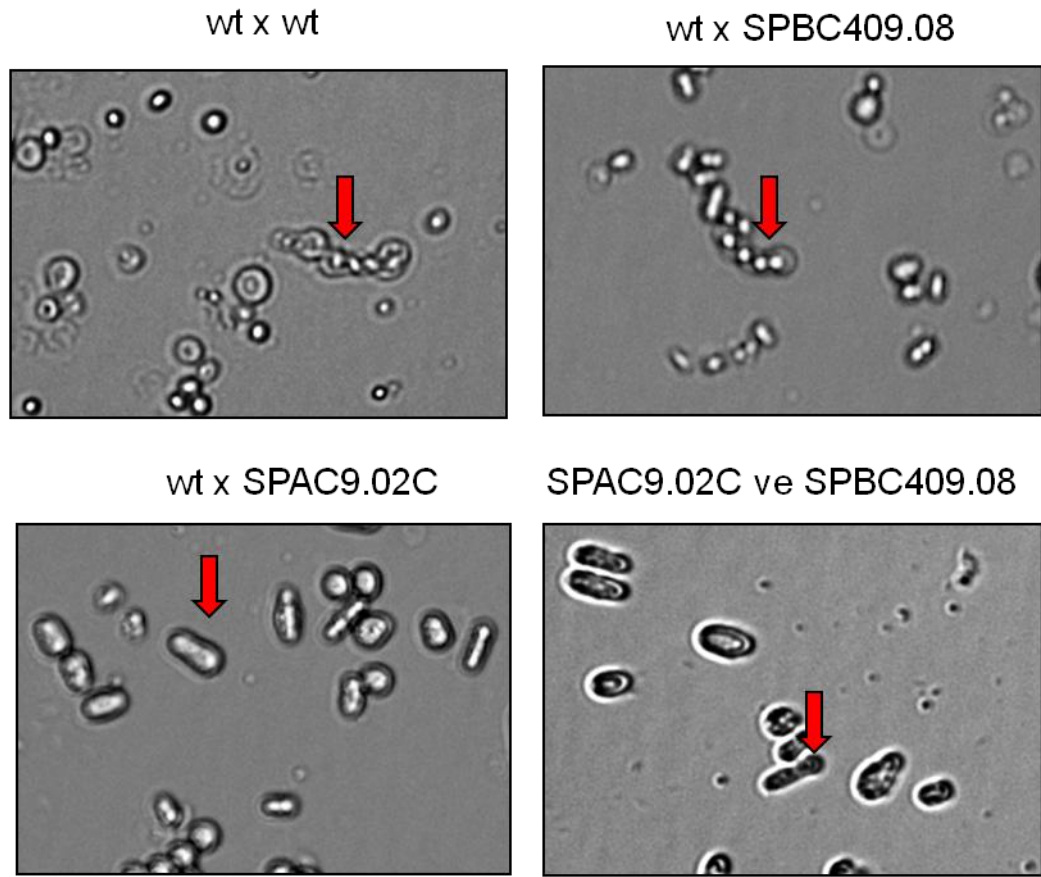
N: Hücre sayısı, WT: 972 h⁻ *S. pombe* hücresi



Şekil 3.9. Yabanıl tip ve delesyon mutanlığı *S. pombe* hücrelerinin boyut analizi grafikte ki gibidir. *SPBC409.08Δ** mutanlığının p-value değeri istatistiksel olarak anlamlıdır.

3.2.6. Spor Oluşumu Analizi

S. pombe hücrelerinin, nitrojen yokluğunda akrospor adı verilen yapıları oluşturduğunun gözlemlenmesi amacıyla bölüm 2.2' de verilen besiyerleri hazırlanmıştır. Yabanıl tip *S. pombe* (972 h⁻) ve *SPBC409.08Δ* ile *SPAC9.02cΔ* mutanları bölüm 2.6.5' te verilen şekilde çaprazlanmıştır. 27 °C' de dört gün süre bekletildikten sonra mikroskopta spor oluşumu analizleri yapılmıştır. Gözlemler sonucunda yabanıl tip hücreler ve delesyon mutanlığı hücrelerinin tamamının spor oluşturduğu belirlenmiştir (Şekil 3.10a ve 3.10b).



Şekil 3.10a. Yabanıl tip ve delesyon mutan hücrelerin birbirleriyle çaprazlanması sonucu elde edilen askus yapıları. 3. 10' daki şekilde daha açık olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 3.10b. Sporların askus (tetrad) yapısı.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

S. pombe tek hücreli ökaryotik bir model organizmadır (Wood vd. 2002). Mitchison tarafından (Mitchison, 2003) bu model organizma, potansiyel olarak basit düzenleyici mimarisi, genetik analiz için güçlü sistematik araçlar ve basit hücre geometrisi gibi çeşitli avantajlarından dolayı seçilmiştir. Daha da önemlisi, büyüme ve bölünme düzenlenmesinde mayanın özellikle izlenebilir olması onu model organizma olarak daha avantajlı kılmaktadır. *S. pombe*' de Wood vd. (2002) tarafından yapılan genom analizi çalışmaları ile moleküler boyutta gen karakterizasyonları için yeni bir fırsat ortaya çıkmıştır. Yapılacak olan karakterizasyon çalışmaları ile fisyon mayasında genlerin fonksiyonları, hücre döngüsü çalışmaları, hücre-hücre etkileşimleri, sinyal iletim mekanizmaları, strese karşı yanıt oluşumu gibi pek çok alanda incelemeler artmıştır. Bu çalışmada hücre poliamin metabolizmasında görevli olduğu düşünülen SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin karakterizasyonu ve gen profillerinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

SPBC409.08 geni, *S. cerevisiae*' da bulunan TPO₃ (YPR156C) ve TPO₂ (YGR138C) genleri ile ortolog olarak gösterilmektedir. TPO₂ ve TPO₃ tarafından kodlanan proteinler spermin için spesifiktir ve TPO₁ ile TPO₄' ün ise spermidin, spermin ve putresin için spesifik olduğu tanımlanmıştır (Tomitori vd., 2001). Bundan dolayı, SPBC409.08 geninin hücrede spermin taşıyıcı ailesi olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Gao vd. 2011).

SPAC9.02c geni ise *S. cerevisiae*' da Paa1 (YDR071C) geni ve insanda AANAT (Arylalkylamine N-asetiltransferaz) ile ortolog olarak gösterilmektedir. Veri tabanı taramalarında iki mayada AANAT saptanmıştır. Bunlardan *S. pombe* sırasıyla omurgalı scAANAT ve OAANAT proteinlerine benzerdir (Ganguly vd., 2001). Paa1 ve AANAT tarafından kodlanan genlerin Spermidin/spermin N¹-asetiltransferaz (SSAT1) olarak poliamin homeostazisi için kritik rol oynayan katabolik bir enzim oldukları varsayılmaktadır (Gao vd., 2011).

Bu çalışmada, ökaryotik tek hücreli *S. pombe* mayasında SPBC409.08 ve SPAC9.02c genlerinin delesyon mutantları Bahler (1998) yöntemine göre başarıyla oluşturulmuş ve bu genlerin ilk kez deneysel karakterizasyonu yapılmıştır. Oluşturulan *SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ* mutantları ile yabancı tip hücrelerin, hücre döngüsü ve

strese cevap profilleri karşılaştırılmış ve karakterizasyonuna yönelik ilk bulgular elde edilerek değerlendirilmiştir.

SPBC409.08Δ mutanlığı için yapılan karakterizasyon çalışmalarından ilki hücre döngüsü çalışmalarıdır. Bu amaçla mitoz bölünme (vejetatif üreme) döngüsü testi, mayoz bölünme için sporulasyon deneyi ve hücre boyutu ölçümü gerçekleştirilmiştir. *SPBC409.08Δ* delesyon mutanlığı ile yapılan üreme testinde elde edilen değer yabancı tip hücrelerin üremesi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. Ardından nitrojen kaynağından yoksun SPA besiyeri ortamında 972 h⁻ yabancı tipi ile çaprazlanması sonucu elde edilen sporların sağlıklı bireyler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu verilerle, *SPBC409.08* gen ürününün mitoz ve mayoz bölünme düzenini bozmadığı açıkça söylenebilmektedir. Ayrıca bu gen ürünü, mayoz bölünme ile koordineli yürüyen çiftleşme paterni oluşumunda olumsuz bir etki göstermemiştir. *SPBC409.08Δ* mutanlığı ve yabancı tip 972 h⁻ *S. pombe* hücrelerin boyut analizi sonucunda yabancı tip örneklerin ortalaması ~13,35 µm, *SPBC409.08Δ* delesyon mutantlarının ortalaması ise ~11,89 µm olarak ölçülmüştür. Bu değerler SPSS programında bağımsız T-test yardımıyla hesaplandığında, *SPBC409.08Δ* mutantının boyutu istatistiksel olarak anlamlı bulunmaktadır. Daha önce yapılmış hücre döngüsü çalışmalarına geçmeden önce, özellikle *SPBC409.08* geni ile ortolog gen olarak ifade edilen TPO₂ (YGR138C) ve TPO₃ (YPR156C) genleri ile ilgili yapılan çalışmalara bakmak gerekmektedir. Yoshikawa tarafından (Yoshikawa vd., 2011). yapılan *S. cerevisiae* mayasında gen delesyonları ve over-ekspresyon çalışmaları ile 4300 kadar tomurcuklanan maya geninin büyüme davranışlarını nasıl etkilediği gözlemlenmiştir. Bu amaçla büyüme oranları çeşitli aralıklarla hesaplanmıştır (Yoshikawa vd., 2011). TPO₂ ve TPO₃ geninin delesyon mutantlarının büyüme davranışı üzerine etkisinin olmadığı büyüme oranları yardımıyla gözlemlenmiştir. Delesyon mutantları ve ekspresyon çalışmaları ile büyüme davranışlarını etkileyen genler gruplandırıldığında hücre döngüsü ve mRNA sentez yolağındaki genlerin büyüme oranlarını etkilediği saptanmıştır (Yoshikawa vd., 2011). Bu verilere dayanarak mitoz ve mayoz bölünme süreçlerinde değişim göstermeyen ancak hücre boyutu yönünden anlamlı değişimler ifade eden bu gen ile ilgili olarak akla bazı sorular gelmektedir. Özellikle ortolog olunan genlerin delesyon mutantlarının, büyüme davranışlarında kayda değer bir etkisi olmamasına rağmen, büyümeyi etkileyen olguların hücre döngüsü ve mRNA ile

ilişkilendirilmesi önemlidir. Buna göre *SPBC409.08Δ* mutantı hücrelerin ortalama boyunun, yabani tip hücrelere göre daha kısa olması ve bu değerin istatistiksel olarak anlamlı olması akla şu üç soruyu getirmektedir. İlk olarak hücre büyümesi (hücre boyutu) ve hücre bölünme döngüsü kontrolü arasında ilişki var mıdır? İkinci olarak *SPBC409.08* gen ürünü hücre boyut mekanizmasında görevli olabilir mi? Son olarak ise spermin ailesi taşıyıcısı olduğu öne sürülen bu genin taşınmasına aracılık ettiği spermin poliamini hücre döngüsünde-özellikle büyüme kontrolünde- ne derece öneme sahiptir?

Fisyon mayada çeşitli büyüme parametreleri, hücre döngüsü boyunca oran-değişim noktaları (RCPs) ile izlenebilmektedir. Bu parametreler hücre boyu uzaması (Mitchison ve Nurse, 1985; Baumgartner ve Tolic, 2009), kuru ağırlık birikimi (Mitchison, 1957), bazı enzimatik aktiviteler (Mitchison vd., 1969), protein miktarı (Creanor ve Mitchison, 1982), ribozomal RNA ve poliaadenilat mRNA sentezi (Fraser ve Moreno, 1976)'dir. Oranlardaki kademeli olarak değişiklik, hücre döngüsü boyunca farklı noktalarda büyüme için oran-sınırlayıcı mekanizmanın varlığını göstermektedir.

S. pombe' de bölünme için boyut şartına kanıt olarak, S-fazda durması, eşitleme sonrasında hücrelerin büyümesi ve bölünmesini izleyen deneylerdir (Mitchison ve Creanor, 1971). Bu kısaltılmış döngülerin anormal derecede büyük hücrelerinin, öncelikle erken-orta G₂-M (sıcaklığa bağlı olarak) geçişinde, bir boyut eşik seviyesini aştıkları için tutuklandıkları ortaya çıktı (Nurse, 1975; Fantes ve Nurse, 1977). Daha sonra olumsuz büyüme koşulları ya da mutasyonlara karşı hücre boyutunu azaltarak, G₁-S geçişinde ek bir boyut gereksinimini ortaya çıkarmaya çalışmışlardır (Nurse ve Thuriaux, 1977; Martin-Castellanos vd., 2000). Fisyon mayanın G₁-S' de ikincil boyut kontrolü, *S. cerevisiae*' da boyut kontrolünde öncelikle yavru hücrelerine G₁-S geçişinde etki etmesine benzer. Mayada yapılan son çalışmalarla, hücre boyutunu ayarlayan ve algılayan çeşitli etkileyici mekanizmalar önerilmiştir (Turner vd., 2012). Bu verilere dayanarak hücre boyutu bağımlı bir hücre döngüsünden rahatlıkla bahsedilebilmektedir.

Yukarıda ki bilgiler ışığında *SPBC409.08Δ* delesyon mutantından kaynaklı gen ürünü eksikliğinin, oran-değişim noktası (RCP) adı verilen mekanizmayı etkilediği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı çalışmamızda, bilinen iki RCP' nin, ilk aşamada daha çok çalışılan G₂/M ve S boyut-bağımlı kontrol noktalarına yoğunlaşmıştır.

Genetik taramada, bölünmede hücre boyutunu kontrol eden bileşenler tanımlanmıştır (Nurse vd., 1976 ; Nurse,1975). Fisyon mayası *S. pombe*' nin, Cdk1' in düzenleyici kontrolü sayesinde bölündüğü ve mitozaya girdiği saptanmıştır (Jorgensen ve Tyers, 2004; Rupes, 2002) Bölüm 1.2.5' de (bkz. Sayfa 18) ayrıntılı bilginin verildiği hücre boyut kontrolü Cdk1 yolağında Pom1, Cdr2, Cdr1 ve Wee1 kontrolü ile düzenlenmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Cdr1 ile lokalize olan Blt1' de bu yolağa eklenebilir. Hücre boyut kontrolü ile ilgili yapılan birçok çalışmaya rağmen bu yolak tam olarak aydınlatılamamıştır. Özellikle Wee1 ve Cdc25' i düzenleyen çeşitli faktörler tespit edilmesine rağmen, hücre boyutu ve Wee1-Cdc25-Cdk1 modülü arasındaki bağlantıları pek anlayılamamıştır (Moseley vd., 2009). Bu nedenle ilgili yolağın anlaşılmasına yönelik daha önce yapılan çalışmalarla, çalışmamızdaki *SPBC409.08Δ* delesyon mutantından elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak, benzer sonuçlar değerlendirilmiştir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Moseley vd. (2009) hücre boyut yolağındaki genlerin delesyon mutantları ile çalışmamızda ki *SPBC409.08Δ* mutantının boy uzunluğu değerleri.

İrk	Hücre Bölünme Uzunluğu (μm)
<i>SPBC409.08Δ</i> *	11.89*
WT (972h)	13.35
WT (Moseley vd., 2009)	14.3 ± 0.9
<i>Pom1Δ</i>	11.7 ± 2.0
<i>Pom1Δ Cdc25^{ts}</i>	17.0 ± 1.6
<i>Cdr2Δ</i>	20.4 ± 1.3
<i>Cdr1Δ</i>	19.5 ± 1.3
<i>Pom1Δ Cdr1Δ</i>	19.2 ± 1.4
<i>Pom1Δ Cdr2Δ</i>	19.6 ± 1.6
<i>Wee1^{ts}</i>	6.8 ± 0.9
<i>Cdc25^{ts}</i>	21.0 ± 2.4

Yukarıda hücre boyut kontrolünde görev alan proteinlerin eksikliklerinde başta mitozaya giriş süresi ve hücre boyunda ki değişimler analiz edilmiştir (Moseley vd., 2009).

Dikkat edildiği takdirde hücre boyut kontrol yolağında Wee1'in uyarılmasındaki gecikmeler hücrenin mitozaya girişini geciktirmiş ve hücre boyları daha uzun olarak elde edilmiştir. Cdr2 ve Pom1 arasındaki ilişki incelendiğinde ise hücre polarite faktörlerinin delesyonu, Cdr2'nin inhibisyonunun önüne geçtiğinden hücreler uyarılması gereken vakitten daha önce uyarılmışlar ve mitozaya erken giriş yapmışlardır. Wee1 delesyonunda ise Cdk1'e müdahale eden ana protein ortadan kalktığından şiddetli bir hücre boyu kışalmasına sebebiyet vermiştir (Jorgensen ve Tyers, 2004) (Çizelge 4.1).

Moseley vd. yaptığı bu çalışma göstermektedir ki, hücre polarite faktörlerinin delesyonu hücre boyutunda çok şiddetli olmasada anlamlı kışalmalara neden olmaktadır. Bizim *SPBC409.08Δ* mutantımıza bakıldığında ise hücre boyutunda benzer değişiklik göstermektedir. *Pom1Δ* (Moseley vd., 2009) ve *SPBC409.08Δ* için hücre boyutu değerleri gösterilmiştir (Çizelge 4.1). Hücre boyutu mekanizmasının birçok delesyona rağmen çalışıyor olması ve henüz boyut yolağının tam olarak aydınlatılmamış olması *SPBC409.08* geninin özellikle bir hücre polarite faktörü veya Cdk1 yolağını etkileyen herhangi protein olmasını muhtemel kılmaktadır.

SPBC409.08 geni için spermin taşıyıcı ailesi olarak görev yaptığı düşünülmektedir (Geo vd., 2011). TPO_2 ve TPO_3 olarak bilinen *S. cerevisiae*'da bulunan bu transmembran protein kanallar, spermin transferini kontrol etmektedir. Bunların seviyelerini sıkı bir şekilde düzenlenmektedir ve bunların homeostazında ki herhangi bir hata hücre büyümesi için zararlıdır. Bu moleküller, DNA yapısı, gen ekspresyonu, protein sentezi, ve sinyal iletimi düzenlenmesi yanı sıra, hücre büyümesini ve farklılaşmasının modülasyonunda stabilizasyon için temel bir rol oynamaktadır (Hayashi ve Murakami, 1995; Fredlund vd., 1995; Bello-Fernandez vd., 1993; Gerner ve Russell, 1977).

Poliamin metabolizması ve *SPBC409.08* gen ürünü arasında ilişki kurabilmek için eldeki veriler yetersizdir. Spermin miktarı hücre döngüsü ve büyüme gibi süreçleri etkilemektedir. Ancak bunun bizim geni ürünümüzle ilişkilendirilebilmesi için yabancı tip ve delesyon mutantı hücrelerin poliamin miktarları ölçülebilir (Tomitori vd., 1999) veya hücre boyutunda ki değişimler dışsal spermin uygulaması (Kuznetsov vd., 2006) ile giderilmeye çalışılabilir. Bu gibi deneyler sonucunda, *SPBC409.08Δ* mutantının hücre büyüme davranışı hakkında daha net bilgi elde edilebilir. Ancak poliaminlerin tükenmesi sonucunda büyümenin G_1/S ve G_2/M geçişinde tutuklanması bu süreçlerin

boyut kontrolünde yer alan oran-değişim noktaları (RCP)' ler ile aynı fazda olması, poliaminlerin hücre bölünmesi ve büyümesi kontrolündeki diğer proteinler ile ilişkisinin olabilme ihtimalini güçlendirmektedir.

SPAC9.02cΔ mutantı ile hücre döngüsü çalışmaları amacıyla vejetatif üreme (mitoz bölünme) ile hücre boyut analizi, çiftleşme paterni oluşumu ve mayoz bölünme için sporulasyon testi yapılmıştır. Daha önce hücre bölünmesi ve hücre boyutu arasında ki ilişkiyi göstermiştik. Şimdi rahatlıkla hücrede büyüme oranının her iki süreçte etkilediğini söyleyebiliriz. *SPAC9.02c* geni ile daha önce yapılan büyüme oranı çalışmalarında yabancı tip değeri ortalama $\sim 13,41\mu\text{m}$ ve *SPAC9.02cΔ* mutantının boyu ortalama $\sim 13,24\mu\text{m}$ olarak hesaplanmıştır. *SPAC9.02cΔ* boy uzunluğu ortalamasının p-value değeri yabancı tipe oranla anlamlı değildir. *SPAC9.02c* geni ile ortolog olan *Paa1* geninin büyüme oranı verileri karşılaştırılmak istenmiştir. Bu amaçla, Yoshikawa vd. (2011) tarafından *S. cerevisiae*' da yapılan büyüme davranışı analizlerinde genlerin over-ekspresyon ve delesyon mutantları incelenmiştir. *SPAC9.02c* geni ile ortolog olan *Paa1* geninin delesyon mutantının büyüme davranışına herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde over-ekspresyon çalışmalarında da aynı sonuçlar alınmıştır (Yoshikawa vd., 2011). Bu sonuçlara göre *SPAC9.02c* geni mitoz bölünme ve hücre boyutu değişiminde ve mekanizmasında etkili değildir. Ortolog gen ile yapılan hücre büyüme çalışmaları bizim elde ettiğimiz bulgular ile örtüşmektedir. Poliamin katabolizmasında olduğundan dolayı Spermidin/spermin atılımını etkileyebileceğinden, bu gibi maddelerin fazla birikimi hücre homeostasisine olumsuz etki edebilir. Ancak büyüme oranında etkisinin gözükmemesi, hücrede aynı işleve sahip başka asetil transferazların varlığından kaynaklanabilir.

Bu çalışmada *SPAC9.02c* geni ile yapılan mayoz bölünme ve sporulasyon çalışmalarında askus spor adı verilen tetrat yapıların oluşumuna rastlanmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak *SPAC9.02c* geni ve 975 h^+ yabancı tip *S. pombe* hücreleri arasında çiftleşme paternlerinin normal gelişim gösterdiği ve mayozun gerçekleştiği gözlemlenmiştir. *SPAC9.02c* geni ortologu olan *Paa1* ile yapılan karakterizasyon çalışmalarında sporulasyon ile ilgili bulguya rastlanmamıştır.

SPBC409.08Δ mutantı ile yapılan diğer bir karakterizasyon çalışmasında, hücrelerin osmotik strese karşı verdiği yanıtın gözlemlenmesi amacıyla farklı yoğunluklarda NaCl, KCl, CaCl_2 ve sorbitol besiyerlerinde testler yapılmıştır. 0,2 M

NaCl içeren besiyerindeki *SPBC409.08Δ* mutantı ve yabanıl tip 972 h⁻ hücrelerinin oluşan koloni büyüklükleri arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Erika Shor vd. (2013) tarafından 1 M NaCl kullanılarak yapılan deneylerden yola çıkarak, daha az konsantrasyonda stres testleri yapılmıştır. Bunun üzerine 0,9 M NaCl besiyerinde tekrarlanan deneylerde yaklaşık dört gün süre beklenmesine rağmen üreme gözlemlenmemiştir. *S. cerevisiae*' da ise TPO₂ (YGR138C) ortolog geni ile yapılan mutant fenotip sonuçlarına bakıldığında benzer şekilde 0,4 M NaCl besiyerinde *YGR138CΔ* mutantların muamelesine rastlanmıştır. *YGR138CΔ* mutantlarının 0,4 M NaCl ile muamelesinin ardından vakuol büyüklüğünde ki değişimin anormal olduğu ve % 5-10 arasında küçüldüğü tespit edilmiştir (Michaillat ve Mayer, 2013). 0,5 M KCl uygulanması sonucunda ise besiyerlerinde oluşan yabanıl tip hücreler ve *SPBC409.08Δ* mutant hücreleri arasında şekil 3.5' ta belirtildiği gibi herhangi bir üreme farklılığı gözlenmemiştir. Markus Proft ve Ramón Serrano (1999) tarafından yapılan osmotik stres deneyinde benzer şekilde 0,5 M KCl şartları altında üreme gözlemlenmiştir. Ancak stres yolağında görevli olan *Hog1Δ* mutantında ise aynı şartlar altında üreme görülmemiştir (Markus Proft ve Ramón Serrano, 1999). Bunun üzerine KCl hücreleri miktarları artırılarak şiddetli tuz konsantrasyonunda oluşabilecek strese verilecek yanıt merak edilmiştir. Gözden geçirilen stres koşulları literatür taranarak tekrar düzenlenmiştir. KCl oranı 1 M olarak değiştirilmiştir (Giaever vd., 2002). 1 M KCl içeren besiyeri ortamına eklenen *SPBC409.058Δ* mutantları bu ortamda birkaç gün fazla beklenmesinin ardından, yabanıl tiplere benzer oranda üreme göstermişlerdir. Diğer bir yandan 1 M KCl ile yapılan başka bir deneyde ise yabanıl tiplerin sorunsuz bir şekilde üremeye devam ettiği izlenmiştir (Stiefel vd., 2004). Stiefel vd. (2004) tarafından yapılan deneylerde *wis1Δ* ve *atf1Δ* gibi sinyal iletim yolağı proteinlerinin yokluğunda üreme gözlenmemiştir. İlk olarak 125 mM alınan CaCl₂ oranında sorunsuz bir şekilde aynı oranlarda üreme takip edilmiştir. Benzer şekilde 200 mM CaCl₂ ile yapılan deneylerde yabanıl tiplerde üreme görülürken, aynı şartlarda *atf1Δ* mutantları ile yapılan deneylerde üremeye rastlanmamıştır (Lawrence vd., 2007). Daha sonra konsantrasyonu arttırılmak istenen CaCl₂'in, literatürde genellikle 0,1 M CaCl₂ (Subhashini vd., 2011) oranı ile kullanıldığı bulunmuştur, ancak daha yüksek CaCl₂ oranı denenmek istendiğinden 0,5 M olarak alınmıştır. Bu CaCl₂ oranında besiyeri üzerinde ki hiçbir hücre yoğunluğunda üreme gözlemlenmemiştir. Sorbitol için ise yoğun bir

konsantrasyon kullanılarak üreme gözlemlenmiştir. 2 M sorbitol (Suga vd., 2004) varlığında besiyerinde yabanıl tip ile *SPBC409.08A* mutantları yaklaşık aynı oranlarda üreme göstermiştir. Stiefel vd. (2004) tarafından yapılan 2 M sorbitol kullanılan deneylerde yabanıl tiplerde üreme görülmüştür.

SPAC9.02cA mutanlığı ile yapılan osmotik stres analizleri amacıyla ilk olarak 0,2 M NaCl, 0,5 M KCl, 120 mM CaCl₂ ve 2 M sorbitol YEA besiyerleri hazırlanmıştır. 0,2 M NaCl ile yapılan deneyler sonucu besiyerlerinde yabanıl tip hücreler ile *SPAC9.02cA* mutantları ile benzer üremeler gözlenmiştir. *SPAC9.02cA* mutanlığı ile yapılan osmotik stres çalışmalarında kullanılan minimum ve maksimum besiyeri konsantrasyonları aynıdır. Bu nedenle, *SPBC409.08A* ve *SPAC9.02cA* mutanlığı için kullanılan besiyeri referansları ortaktır. 0,2 M NaCl kullanılarak yapılan deneylerde yabanıl tip *S. pombe* hücreleri ile ve *SPAC9.02cA* mutantları aynı oranda üreme göstermişlerdir. 1 M NaCl (Erika Shor vd., 2013) referans alınarak hazırlanan, 0,9 M NaCl besiyerinde tekrarlanan deneylerde yaklaşık dört gün süre beklenmesine rağmen üreme gözlemlenmemiştir. *S. cerevisiae*' da ortolog gen Paa1 (YDR071C) ile yapılan deneylerde 0,4 M NaCl ile muamelesi sonucunda vakuol hacminde ki büyüklüğün % 20-50 oranında azaldığı tespit edilmiştir (Michaillat ve Mayer, 2013). 0,5 M KCl ve 1 M KCl (Giaever ve vd., 2002) uygulanması sonucunda ise besiyerlerinde oluşan yabanıl tip hücreler ve *SPAC9.02cA* mutant hücreleri arasında şekil 3.5' de belirtildiği gibi herhangi bir üreme farklılığı gözlenmemiştir. 125 mM alınan CaCl₂ oranında yabanıl tip ve *SPAC9.02cA* mutanlığı hücrelerde sorunsuz bir şekilde aynı oranlarda üreme takip edilmiştir. Daha sonra konsantrasyonu arttırılmak istenen CaCl₂'in, literatürde genellikle 0,1 M CaCl₂ (Subhashini vd., 2011) oranı ile kullanıldığı bulunmuştur, ancak daha yüksek CaCl₂ oranı denenmek istendiğinden 0,5 M olarak alınmıştır. Bu CaCl₂ oranında besiyeri üzerindeki hiçbir hücre yoğunluğunda üreme gözlemlenmemiştir. *S. cerevisiae*' da ortolog Paa1 geni ile yapılan osmotik stres deneylerine bakıldığında ise 0,2 M CaCl₂ ile muamele sonucunda *YDR071CA* mutantlarının CaCl₂ 'e karşı aşırı hassasiyet gösterdiği bulunmuştur (W. J. de Groot vd., 2001). Sorbitol için ise yoğun bir konsantrasyon kullanılarak üreme gözlemlenmiştir. 2 M sorbitol (Suga vd., 2004) varlığında besiyerinde yabanıl tip ile *SPAC9.02cA* mutantları yaklaşık aynı oranlarda üreme göstermiştir. W. J. de Groot vd. (2001) tarafından kafein ile yapılan deneyler 0,5 M sorbitol ile stabilize edilmiştir. Bu deneylerde *YDR071CA* mutantının içinde olduğu

17 delesyon mutantında hassasiyet gözükmüş ve Sty1 yolağının aktif olduğu görülmüştür.

Maya hücrelerinin yüksek osmolariteye maruz kalması plazma zarı ve canlılığı üzerinde iyon geçişinin çöküşü ve su kaybına neden olur (Mark Toone ve Jones, 2004). Genellikle deneysel osmolite olarak kullanılan NaCl ve KCl gibi bileşiklerin yüksek konsantrasyonlarına maruz kalınması, sadece yüksek sodyum iyon konsantrasyonu- ya da muhtemelen klorür- toksik etkileri tarafından uyarılan osmotik stres aynı zamanda tuz stresi ile sonuçlanır. *S. pombe*' de, osmotik strese transkripsiyonel yanıt Sty1 SAPK yolağı ile düzenlenir (Millar vd., 1995). Mikro dizi analizleri Sty1'in hemen hemen tüm osmotik stres yolağı için gerekli olduğunu göstermektedir (Chen et al. 2002/3). Gerçekten de, Sty1 veya atf1 mutantlar osmotik strese çeşitli şekillerde aşırı duyarlıdır. Bu nedenle, bu Sty1 yolağı gibi stres ile aktive olan MAP kinaz yollarının evrimsel kökeni osmotik stres düzenleyicileri olmaları mümkündür. Na^+ ve Li^+ dahil olmak üzere toksik katyon düzeylerinin regülasyonu spesifik membran ve vakuolar iyon pompaları ve plazma membran potansiyelinin düzenleyicileri tarafından kontrol edilir (Mark Toone ve Jones, 2004). *S. pombe*' de, Na^+ ve Li^+ *sod2⁺/SPAC977.10* tarafından kodlanan Na^+/H^+ antiporter içerir (Jia vd., 1992). Her iki mayada da K^+ iyonu için Trk1 ve Trk2 taşıyıcıları ile hücreden atılır (Mark Toone ve Jones, 2004). KCl, NaCl ve CaCl_2 gibi tuzların ilk uygulanan konsantrasyonları dikkate alındığında vakuol hacimlerinin NaCl' de olduğu gibi küçüldüğü düşünülebilir. Canlılığın ve üremenin devam ederek yabani tip oranla benzer sonuçlar alınması, Sty1 SAPK yolağı adı verilen sinyal iletim yolağının osmotik strese karşı regüle olduğunu göstermektedir. Regülasyonun gerçekleşmesi SPBC409.08 ve SPAC9.02c gen ürünlerinin bu yolda doğrudan bir etkisinin olmadığını söylemek için yeterlidir. İkinci olarak uygulanan yüksek tuz konsantrasyonlarında ise toksik etki birikiminden dolayı, Na^+/H^+ benzeri transport taşıyıcı sisteminin çökmüş olduğu ve vakuol hacminin yüksek oranda hacimsel azalmaya maruz kaldığı söylenebilir. Bu süreç ise strese bağlı apoptoza veya epey beklendikten sonra bazı üremelerin gözükmesi üremenin aşırı bir şekilde yavaşlamasına neden olabilir. Bu sürecin ise devam ediyor olması canlılık ve üreme yeteneği üzerine olumsuz etki göstermiştir. Diğer taraftan, *SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ* mutantları ile yapılan deneylerde ilk uygulanan tuz konsantrasyonlarında 0,2 M NaCl, 0,5 M KCl, 120 mM CaCl_2 ve 2 M sorbitol için üremenin gözükmesi,

hücre canlılıklarının yitirilmesi için konsantrasyon sınırlarının aşılmadığını göstermektedir. Çünkü benzer deneylerde aynı aralıklarda üreme sonuçlarına rastlanmıştır. Diğer yandan 0,9 M NaCl, 1 M KCl ve 0,5 M CaCl₂ gibi ortamlardan sadece 1 M KCl’ de üremenin gözlenmesi tuz konsantrasyonları açısından eşik değerlerin farklı olduğunu göstermektedir. 0,9 M NaCl ve 0,5 M CaCl₂ için canlılık eşik değerinin daha düşük bir aralıkta olması beklenmektedir. Bu amaçla NaCl ve CaCl₂ için farklı değerlerde deneyler tekrarlanabilir. *SPAC9.02cA* mutantının osmotik strese karşı verdiği tepkileri yorumlamak amacıyla, *SPBC409.08A* mutanti için yapılan değerlendirmelere ek olarak, 0,4 M NaCl için vakuol büyüklüğü değişiminin % 20-50 arasında olması göz önünde bulundurulabilir. *SPBC409.08A* mutanti hücrelerin gösterdiği vakuol büyüklüğü değişimi % 5-10 arasında iken, *SPAC9.02cA* mutantında bu oranın daha fazla olması gen ürününün işlevinin gerçekleşmemesi ile hücrede spermin/spermidin miktarının artması ile ilişkili olabilir. Hücre içerisinde Na⁺ ve Cl⁻ toksik iyonlarının artması ve bir yandan da hücre içerisinde mevcut poliaminlerin dışarı atılamaması vakuolün su kaybetmesini hızlandırmaktadır. 0,9 M NaCl oranında canlılığın olmaması, bu oranlara bakılarak vakuolün aşırı su kaybetmesini ve plazma zarı ve canlılığı üzerinde iyon geçişinin çöküşüne ve su kaybına neden olur (Mark Toone ve Jones, 2004). Diğer yandan ortolog gen *YDR071CA* ile yapılan 0,2 M CaCl₂ deneyinde aşırı hassasiyet gözlenmiştir. Oysa 0,5 M CaCl₂ ‘de herhangi bir yaşam bulgusuna rastlanmamıştır. *SPAC9.02cA* mutantının canlılık aktivitesi göstermesi ve hassasiyet değerlerinin gözlenebilmesi amacıyla ~0,2 M civarında ve 0,5 M’ dan aşağı değerlerde CaCl₂ spot testleri yapılabilir.

Son olarak ise delesyon mutanti *S. pombe* hücreleri üzerinde DNA hasarı oluşturmak amacıyla UV ve hydroxyurea testleri yapılmıştır 4 mM hydroxyurea ile muamele edilen yabanıl tip, *SPAC9.02cA* ve *SPBC409.08A* mutanti hücreler şekil 3.7’ de gösterildiği oranlarda üreme göstermiştir. Daha sonra hydroxyurea konsantrasyonu arttırılarak 10 mM’ a çıkarılmıştır (Ronald W. Pero vd., 1990; Pao-Chen Li vd., 2013) Arttırılan bu konsantrasyon altında yabanıl tip, *SPAC9.02cA* ve *SPBC409.08A* mutantlarında da üreme gözlemlenmiştir. Bu oranlarda yabanıl tipte üreme gözlenmesi normal karşılanmaktadır. Daha önce mayalarla yapılan deneylerde, yabanıl tip *S. pombe*’ de 5 mM’ da (Frazer ve G. Young, 2011) ile yabanıl tip *S. cerevisiae*’ da 50 ve 100 mM’ da (Unnikrishnan vd., 2011; María Soriano-Carot vd., 2012) üreme

gözlemlemiştir. UV ışığı ile radyasyona maruz kalma sonucunda ise 50 jull/m², 100 jull/m² ve 200 jull/m² enerji seviyelerinde yabancı tipler, *SPAC9.02cA* ve *SPBC409.08A* mutantında üremeler gözlenmiş ve birbirine yakın koloni büyüklükleri oluşturmuşlardır. Literatüre bakıldığında ise 120 jull/m² ve 150 jull/m² değerlerinde yabancı tip *S. pombe* hücreleri üremelerini sürdürmüşlerdir (Qiu vd., 2012). 200 jull/m² veya üzerinde üreme ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Bundan dolayı bizim 200 jull/m² değerimiz üremenin gözüktüğü üst sınırlardan biri olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte 500 jull/m² ve 1000 jull/m² ‘ de üreme bulgusuna rastlanmamıştır. Bu değerlerle başta *S. pombe* olmak üzere diğer maya türlerinde de çalışmaya rastlanmamıştır. Bundan dolayı bu iki değer üremenin olmadığı üst sınırlar olarak nitelendirilebilir.

Hydroxyurea (HU), dNTP oluşumunu engelleyerek DNA replikasyonunu bloke etmektedir (Koç vd., 2003). UV ışıması ise DNA üzerinde hasarlara yol açmaktadır (Rajeshwar ve Donat-P., 2002). Bundan dolayı HU ve UV ışıması hücre için oksidatif stres olarak değerlendirilmektedir. Reaktif oksijen türleri (ROS), süper oksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), ve hidroksil radikali (OH[·]), kimyasal indirgeme tarafından oluşturulan hücresel oksidaz, peroksidaz ve mono-ve dioksijenaz ile oksijen ve UV veya diğer çevresel ajanlara maruz kalma birer oksidatif stres çeşididir (Toone ve Jones, 2004). Ayrıca HU işlemi de, yanlış protein katlanmaları ve toksik maddelerin aktivasyonu ile oksidatif strese ve hücre ölümüne yol açmaktadır (Davies vd., 2009). Bu nedenle oksidatif stres oluşumuna verilecek cevapların yetersizliği hücrenin ölümüne yol açacağından, bu deneyde ilk olarak strese karşı etkili mekanizmalar incelenmelidir. Çeşitli HU miktarlarında ve UV enerji seviyelerinde hayatta kalma ile sonuçlanan deneylere bakıldığında, bu mekanizmalarda doğrudan görev alan proteinlerin *SPBC409.08* ve *SPAC9.02c* geni ile ilişkisinin bulunmadığı söylenebilmektedir. Ancak stres yolağı sonucunda ki cevap ile oluşan, bazı moleküllerin hücreyi korumaya yönelik tepkilerine bakılabilir. Bu moleküllerden biride pek çok canlıda fizyolojik ve gelişimsel süreçleri kontrol ettiği düşünülen spermin (Spm), Spermidin (Spd) ve bunların öncülü putresin(Put) gibi poliamin molekülleridir (Kusano vd., 2007). Poliaminler için önerilen bir işlev de, reaktif oksijen türlerinin hasarı (ROS)’ tan hücreleri koruyan bir rolü olduğudur (Singh Gill ve Tuteja, 2010). Ha vd. (1998) tarafından yapılan çalışmalarda, hücresiz sistemlerde fenton reaksiyonları ile üretilen ROS, spermin tarafından temizlenmiştir. UV ile yapılan çalışmalarda ise bazı laboratuarlarda endojen hücresel

poliaminlerin çıkarılması sonucu radyasyona maruz hassasiyette artmıştır (Arundel vd., 1988; Courdi vd., 1986; Snyder ve Schroeder, 1994; Snyder ve Sunkara, 1990; Williams vd., 1994) diğer laboratuarlarda ise hassasiyetlerde bir artış olmamıştır (Gerner vd., 1988; Kuo vd., 1987; Seidenfeld vd., 1980).

SPBC409.08A mutantına baktığımızda spermin taşıyıcı ailesi yönünden oluşan kusur, hücre içerisinde spermin miktarını etkileyebilmektedir. Daha önce poliaminler ve bunlardan spermin ile ilgili oksidatif strese karşı nasıl etkisinin olabileceğinden bahsetmiştik (bkz. Sayfa 29). HU' da 4 mM ve 10 mM konsantrasyonlarda hücrenin birkaç gün içerisinde hayatta kalıp üremeye devam etmesi iki olasılıkla mümkün olmaktadır. Öncelikle hydroxyurea miktarının belli eşik değeri altında olması muhtemeldir. Bunun en iyi kanıtı farklı maya tiplerinde daha yüksek konsantrasyonda üremelerin gözükmesidir. Hücre içerisindeki redüktaz miktarı tekrar dengelenmiş ve replikasyona devam edilmiştir. İkinci olasılıkta ise hücre içerisinde TPO₂ veya TPO₃ olarak öngörülen proteinlerin kusuru nedeni ile hücre dışına atılamayan spermin miktarından dolayı HU faktörüne karşı, Ha vd. (1998) tarafından belirtilen aşırı spermin müdahalesi hayatta kalma ve devamlılığı sağlamıştır. Ancak ilk olasılıkta farklı konsantrasyonlarda hayatta kalma ve üreme durumu göstermektedir ki, *SPBC409.08* geni için yapılan delesyon çalışmaları bu genin stres mekanizmasında herhangi işlevi olup olmadığı konusunda yeterli bilgi vermemektedir. Ayrıca çok farklı konsantrasyonlarda deneyler tekrarlanmalıdır. Diğer yandan başka bir sonuçta, yabancı tip *S. pombe* ve *SPBC409.08A* mutantları ile yapılan HU çalışmalarında alınan sonuçlar *SPBC409.08* geninin stres yolları ile özellikle poliaminler ile ilgili ilişkisinin olmadığı yönündedir. *SPAC9.02cA* mutantına baktığımızda Spermidin/spermin N¹-asetiltransferaz (SSAT1) aktivitesi yönünden oluşan kusur, hücre içerisinde spermin/spermidin miktarını etkileyebilmektedir. Öncelikle hydroxyurea miktarının belli eşik değeri altında olması muhtemeldir. Bunun en iyi kanıtı farklı maya tiplerinde daha yüksek konsantrasyonda üremelerin gözükmesidir.

UV ışıması ile yapılan deneylerde 150 jull/m² 'nin üzerinde referans alacağımız bir değerin bulunmaması bizim için dezavantajdır. Elimizde var olan bilgiler ışığında 50 jull/m², 100 jull/m² ve 200 jull/m² değerlerinde üremenin yabancı tip ve delesyon mutantlarında gözükmesi, hücrelerin belli bir eşik şiddetini geçmemiş DNA hasarlarına karşı aynı tepkiyi verdiğini söylememiz için yeterli olabilir. Burada *SPBC409.08* ve

SPAC9.02c gen ürününün UV ile oluşan DNA hasarının tamir yolağında doğrudan herhangi bir etkisinin olmadığını görmekteyiz. UV stresinde poliamin rollerinden bahsedebilmemiz için yabanıl tip ve delesyon mutantı hücrelerin poliamin içeriği ölçülmeli ve farklı değer aralıklarında UV ışıması yapılmalıdır. 500 jull/m² ve 1000 jull/m² UV değerlerinde üremenin gözükmemesi, hücrenin geri dönüşümsüz fizyolojik ve patolojik hasarlar meydana gelmesi sonucu apoptoza gitmesi ile açıklanabilir.

Bu çalışmada *SPBC409.08Δ* ve *SPAC9.02cΔ* mutantları ile yapmış olduğumuz hücre döngüsü ve stres analizleri sonucunda, *SPBC409.08Δ* mutantının hücre boyut kontrolü için önem arz eden bir gen ürününün eksikliğine neden olduğu düşünülmektedir. Ancak diğer testlerde herhangi anlamlı bir bulgu elde edilmemesi bizi yanıltmamalıdır. Bu delesyon mutantları ile yapılacak olan hücre içi poliamin miktarı değişiminin ölçülmesi (Tomitori vd., 1999), dışsal poliamin uygulanması (Kuznetsov vd., 2006) ve içsel poliamin miktarlarının azaltılması (Samartzidou ve Delcour, 1999) over-ekspresyon çalışmaları, farklı toksik maddelerle yapılacak stres testleri ile gen ürünlerinin hücre döngüsü boyunca yerleşiminin izlenmesi gibi hücre biyolojisi çalışmaları bu genlerin karakterizasyonuna önemli katkılar yapacaktır. Yapılacak bu çalışmalar gerek *S. pombe* model organizmasının yaşamsal faaliyetlerinde ki mekanizmaların aydınlatılmasını sağlayacak gerekse de yapılacak filogenetik analizler ve karşılaştırmalı genom analizleri yoluyla, diğer organizmalardaki ilişkili genler aydınlatılabilecektir.

5. KAYNAKLAR

- Alani, E., Cao, L. ve Kleckner N., “A method for gene disruption that allows repeated use of URA3 selection in the construction of multiply disrupted yeast strains”, **Genetics**, 116: 541-545 (1987).
- Albertsen, M., Bellahn, I., Krämer, R. ve Waffenschmidt, S., “Localization and function of the yeast multi drug transporter Tpo1p”, **J. Biol. Chem.**, 278: 12820-12825 (2003).
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Knocz, C., Carrasco, P. ve Tiburcio, A.F., “Polyamines: Molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance”, **Planta**, 231: 1237–1249 (2010a).
- Alcázar, R., Planas, J., Saxena, T., Zarza, X., Bortolotti, C., Cuevas, J., Bitrián, M., Tiburcio, A.F. ve Altabella, T., “Putrescine accumulation confers drought tolerance in transgenic Arabidopsis plants over-expressing the homologous Arginine decarboxylase 2 gene”, **Plant Physiol Biochem**, 48: 547–552 (2010b).
- Alvarez, B. ve Moreno, S., “Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation”, **J. Cell. Sci.**, 119: 4475–4485 (2006).
- Arana D.M., Nombela, C., Alonso-Monge, R. ve Pla J., “The Pbs2 MAP kinase kinase is essential for the oxidative-stress response in the fungal pathogen *Candida albicans*”, **Microbiology**, 151: 1033–1049 (2005).
- Arundel, C.M., Nishioka, K. ve Tofilon, P.J., “Effects of alpha-difluoromethylornithine-induced polyamine depletion on the radiosensitivity of a human colon carcinoma cell line”, **Radiat Res.**, 114: 634–640 (1988).
- Baber-Furnari, B.A., Rhind, N., Boddy, M.N., Shanahan, P., Lopez-Girona, A. ve Russell, P., “Regulation of mitotic inhibitor Mik1 helps to enforce the DNA damage checkpoint” **Mol. Biol. Cell**, 11: 1-11 (2000).
- Bachrach, U., “The early history of polyamine research”, **Plant Physiol Biochem**, 48 (7): 490–495 (2010).
- Bähler, J. ve Pringle, J.R., “Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis”, **Genes Dev.**, 12: 1356–1370 (1998).
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., Pringle, J.R., “Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Yeast**, 14: 943–951 (1998).
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Deanouel, A., LaCroute, F. ve Cullin C., “A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*”, **Nucl. Acids Res.**, 21: 3329-3330 (1993).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Baum. B., Nishitani, H., Yanow, S. ve Nurse, P., “Cdc18 transcription and proteolysis couple S phase to passage through mitosis”, **EMBO J.**, 17: 5689-5698 (1998).

Baumgärtner, S. ve Tolic'-Nørrelykke, IM., “Growth pattern of single fission yeast cells is bilinear and depends on temperature and DNA synthesis”, **Biophys J.**, 96: 4336-4347 (2009).

Beach, D.H., “Cell type switching by DNA transposition in fission yeast”, **Nature**, 305: 682–687 (1983).

Beach, D.H. ve Klar, A.J.S., “Rearrangements of the transposable mating-type cassettes of fission yeast”, **EMBO J.**, 3: 603–610 (1984).

Beach, D. and Nurse, P., “High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **Nature**, 292: 140-142 (1981).

Belenguer, P., Pelloquin, L., Oustrin, M.L. ve Ducommun, B., “Role of the fission yeast nim1 protein kinase in the cell cycle response to nutritional signals”, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 232: 204–208 (1997).

Bello-Fernandez, C., Packham, G.ve Cleveland, J. L., “The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc”, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 7804-7808 (1993).

Berntsson, P.S.H. ve Oredsson, S.M., “Biochem. Biophys.”, **Res. Commun.** 263: 13–16 (1999).

Booher, R.N., Alfa, C.E., Hyams, J.S. ve Beach, D.H., “The fission yeast cdc2/cdc13/suc1 protein kinase: regulation of catalytic activity ve nuclear localization”, **Cell**, 58: 485-497 (1989).

Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. ve Martin-Tanguy, J., “Polyamines and environmental challenges: recent development”, **Plant Sci.**, 140: 103–125 (1999).

Breeding, C. S. vd., “The cdr21 gene encodes a regulator of G₂/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Biol. Cell**, 9: 3399–3415 (1998).

Breeding, C.S., Hudson, J., Balasubramanian, M.K., Hemmingsen, S.M., Young, P.G. ve Gould, K.L., “The cdr2⁺ gene encodes a regulator of G₂/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Biol. Cell**, 9: 3399–3415 (1998).

Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. ve Gustin, M.C., “An osmosensing signal transduction pathway in yeast”, **Science**, 259: 1760–1763 (1993).

Brown, G.W. ve Kelly, T.J., “Purification of Hsk1, a minichromosome maintenance protein kinase from fission yeast”, **J. Biol. Chem.**, 273: 22083-22090 (1998).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Buck, V., Quinn, J., Soto Pino, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.A. and Millar, J.B.A., "Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway", *Mol. Biol. Cell*, 12: 407–419 (2001).
- Casero, R.A., Jr, Celano P., Ervin, SA., Applegren, N.B., Wiest, L. ve Pegg, A.E., "Isolation ve characterization of a cDNA clone that codes for human spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase", *J. Biol. Chem.*, 266: 810–814 (1991).
- Casero, R.A., Jr. ve Pegg, A.E., "Spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase--the turning point in polyamine metabolism", *FASEB J.*, 7(8):653-61 (1993).
- Cheetham, J., Smith, D.A., da Silva Dantas, A., Doris, K.S., Patterson, M.J., Bruce, C.R. ve Quinn, J., "A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*", *Mol Biol. Cell*, 18: 4603–4614 (2007).
- Cho, Y.S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T.D., Guildford, M. ve Chan, F.K., "Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation", *Cell*, 137(6):1112-23 (2009).
- Christensen, P.U., Bentley, N.J., Martinho, R.G., Nielsen, O. ve Carr, A.M., "Mik1 levels accumulate in S phase and may mediate an intrinsic link between S phase and mitosis", *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 2579-2584 (2000).
- Coleman, C.S., Stanley, B.A., Jones, A.D. ve Pegg A.E., "Spermidine/spermine- N^1 -acetyltransferase-2 (SSAT2) acetylates thialysine and is not involved in polyamine metabolism", *Biochem. J.* 384: 139–148 (2004).
- Coudreuse, D. ve Nurse, P., "Driving the cell cycle with a minimal CDK control network", *Nature*, 468: 1074–1079 (2010).
- Courdi, A., Milano, G., Bouclier, M., Lalanne, C.M., "Radiosensitization of human tumor cells by alpha-difluoromethylornithine", *Int J Cancer*, 38: 103–107 (1986).
- Creanor J, Mitchison, JM., "Patterns of protein synthesis during the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*", *J Cell Sci.*, 58: 263-285 (1982).
- Daga, RR. ve Jimenez, J., "Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth", *J Cell Sci.*, 112: 3137-3146 (1999).
- Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S., "Orientation of DNA replication establishes mating-type switching pattern in *Schizosaccharomyces pombe*", *Nature*, 400: 181–184 (1999).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Dalgaard, J.Z. ve Klar, Amar J.S. “Does *S. pombe* exploit the intrinsic asymmetry of DNA synthesis to imprint daughter cells for mating-type switching? ”, **TRENDS in Genetics**, 17 (3) : 153-157 (2001).

Davey, J., “Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor isolation analysis of two genes encoding the pheromone”, **EMBO J.**, 11: 951-960 (1992).

Davies, B.W., Kohanski, M.A., Simmons L.A., Winkler, J.A., Collins, J.J. ve Walker, G.C., “Hydroxyurea Induces Hydroxyl Radical-Mediated Cell Death in *Escherichia coli*”, **Cell**, 36: 845-860 (2009).

Degols, G. ve Russell, P., “Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Cell Biol.**, 17(6):3356-63 (1997).

Della Ragione, F. ve Pegg, A.E., “Studies of the specificity and kinetics of rat liver spermidine/spermine N^1 -acetyltransferase”, **Biochem J.**, 213: 701–706 (1983).

Di Talia, S., Skotheim, J.M., Bean, J.M., Siggia, E.D. ve Cross, F.R., “The effects of molecular noise and size control on variability in the budding yeast cell cycle”, **Nature**, 448: 947–951 (2007).

Dolznic, H., Grebier, F., Sauer, T., Beug, H. and Mullner, E. W., “Evidence for a size-sensing mechanism in animal cells”, **Nat. Cell Biol.**, 6: 899-905 (2004).

Egel R., “Genes involved in mating type expression of fission yeast” **Mol. Gen. Genet.**, 122: 339-343 (1973).

Egel, R., “Frequency of mating-type switching in homothallic fission yeast”, **Nature**, 266: 172–174 (1977).

Egel, R. vd., “Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast”, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 81: 3481–3485 (1984).

Egel, R. ve Eie, B., “Cell lineage asymmetry in *Schizosaccharomyces pombe*: unilateral transmission of a high-frequency state of mating-type switching in diploid pedigrees”, **Curr. Genet.**, 12: 429–433 (1987).

Egger, L.A., Park, H. ve Inouye, M., “Signal transduction via the histidyl-aspartyl phosphorelay”, **Genes Cells**, 2: 167–184 (1997).

Fantes, P. ve Nurse, P., “Control of cell size at division in fission yeast by a growth-modulated size control over nuclear division”, **Exp. Cell Res.**, 107: 377–386 (1977).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Fisher, D.L. ve Nurse, P., “A single fission yeast mitotic cyclin B-p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G₁ cyclins”, **EMBO J.** 15: 850–860 (1996).
- Fraser, R. S. S. ve Moreno, F., “Rates of synthesis of polyadenylated messenger RNA and ribosomal RNA during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*, with an appendix: Calculation of the pattern of protein accumulation from observed changes in the rate of messenger RNA synthesis.”, **Cell Sci.**, 21: 497-521 (1976).
- Frazer, C. ve Young P.G., “Redundant Mechanisms Prevent Mitotic Entry Following Replication Arrest in the Absence of Cdc25 Hyper- Phosphorylation in Fission Yeast”, **PLoS ONE**, 6(6): e21348 (2011).
- Fredlund, J.O., Johansson, M.C., Dahlberg, E.ve Oredsson, T.M., “Ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase expression during the cell cycle of Chinese hamster ovary cells”, **Exp. Cell Res.**, 216, 86–92 (1995).
- Galston, AW., Kaur-Sawhney, R., Altabella, T. ve Tiburcio, AF., “Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress”, **Bot Acta.**, 110:197–207 (1997).
- Ganguly, S., Mummaneni, P., Steinbach, P.J., Klein, D.C. ve Coon, S.L., “Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of the Melatonin Rhythm Enzyme Arylalkylamine N-Acetyltransferase”, **J. Biol. Chem.**, 276:47239-47247 (2001).
- Gao, Q., Jin, K., Ying, S-H., Zhang, Y., Xiao, G., vd., “Genome Sequencing and Comparative Transcriptomics of the Model Entomopathogenic Fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. Acridum*”, **PLoS Genet.**, 7(1): e1001264 (2011).
- Gbelska, Y., Krijger, J.J. ve Breunig, K.D., “Evolution of gene families: themultidrug resistance transporter genes in five relatedyeast species”, **FEMS Yeast Res.**, 6:345–355 (2006).
- George, V. T., Brooks, G. and Humphrey, T. C., “Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast”, **Mol. Biol. Cell**, 18, 4168-417 (2007).
- Gerner, EW. ve Meyskens, FL., “Jr Polyamines and cancer: old molecules, new understanding”, **Nat Rev Cancer**, 4:781–792 (2004).
- Gietz, R.D. ve Woods, R.A., “Genetic Transformation of Yeast”, **BioTechniques**, 30: 816-831 (2001).
- Giga-Hama, Y., Tohda, H., Takegawa, K. ve Kumagai H., “*Schizosaccharomyces pombe* minimum genome factory”, **Biotechnol. Appl. Biochem**, 46: 147–155 (2007).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Gill, S.S. ve Tuteja, N., “Polyamines and abiotic stress tolerance in plants”, ***Plant Signal Behav.***, 5(1):26-33 (2010).
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y., ve Yamamoto, M., “*Schizosaccharomyces pombe* Spkl is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to Xenopus mitogen-activated protein kinase”, ***Mol. Cell. Biol.***, 13: 6427-6434 (1993).
- Groppa, M.D. ve Benavides, M. P., “Polyamines and abiotic stress: recent Advances”, ***Amino Acids***, 34, 35-45 (2008).
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U., Loprieno, N., “Handbook of Genetics”, Edited by King, R.C., ***Plenum Press***, Norwich, Norfolk, England, 1: 395-446 (1974).
- Gupta K., Dey A. ve Gupta B., “Plant polyamines in abiotic stress responses”, ***Acta Physiol Plant.***, 35: 2015–2036 (2013).
- Güldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, ve J.H. Hegemann A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast”, ***Nucleic Acids Res.***, 24: 2519-2524 (1996).
- Ha, HC., Sirisoma, NS., Kuppasamy, P., Zweier, JL., Woster, PM., Casero, RA. “Jr The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger”, ***Proc Natl Acad Sci USA***, 95: 11140–11145 (1998).
- Harigaya, Y. vd., “Selective elimination of Messenger RNA prevents an incidence of untimely meiosis”, ***Nature***, 442: 45–50 (2006).
- Hartmuth, S. ve Petersen, J., “Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress” , ***Journal of Cell Science***, 122 (11): 1737-1746 (2009)..
- Hayashi, S. ve Murakami, Y., “Rapid and regulated degradation of ornithine decarboxylase”, ***Biochem. J.*** 306:1–10 (1995).
- Hebby, O., Andersson, G. ve Gray, J.W., “Interference with S and G₂ phase progression by polyamine synthesis inhibitors”, ***Exp. Cell Res.***, 111: 461–464 (1978).
- Heby, O., Marton, L.J., Gray, J.W., Lindl, P.A. ve Wilson, C.B. “***In Proc. 9th Congress Nord. Soc. Cell Biol. (Biering, F., ed.)***”, Odense University Press, Odense, Denmark, 155–164 (1976).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Hegardt, C., Johannsson, O.T. ve Oredsson, S.M., “Rapid caspase-dependent cell death in cultured human breast cancer cells induced by the polyamine analogue N(1), N(11)-diethylnorspermine”, **Eur. J. Biochem.**, 269: 1033–1039 (2002).
- Hentges, P., Driessche, B.V., Tafforeau, L., Vandenhaute, J. ve Carr, A.M., “Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Yeast**, 22: 1013–1019 (2005).
- Hinnen, A., Hicks, J. B. ve Fink, G. R., “Transformation of yeast”, **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75: 1929–1933 (1978).
- Hughes, D.A. ve Yamamoto, M., “ras and signal transduction during sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **In Signal Transduction Prokaryotic and Simple Eukaryotic Systems (ed. Kurjan, J. and Taylor, B.L.)**, Academic Press, New York 123-146 (1993).
- Hunter, T. ve Pines, J., “Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age”, **Cell**, 79: 573–582 (1994).
- Hussain, S.S., Ali, M., Ahmad, M. ve Siddique, K.H.M., “Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants”, **Biotechnol Adv.**, 29: 300–311 (2011).
- Igarashi, K. ve Kashiwagi, K., “Characteristics of cellular polyamine transport in prokaryotes and eukaryotes”, **Plant Physiology and Biochemistry**, 48: 506-512 (2010).
- Imai, Y. ve Yamamoto, M., “The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G₁ arrest in the mating partner”, **Genes Dev.**, 8: 328-338 (1994).
- Jambhekar, A. ve Amon, A., “Control of meiosis by respiration”, **Curr Biol.**, 18(13): 969-75 (2008).
- Johnston, G.C., Pringle, J.R. ve Hartwell, L.H., “Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, **Exp. Cell Res.**, 105: 79–98 (1977).
- Jorgensen, P. ve Tyers, M., “How cells coordinate growth and division”, **Curr. Biol.**, 14: 1014–1027 (2004).
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R. ve Tyers, M., “A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size”, **Genes Dev.**, 18: 2491–2505 (2004).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Kanoh, J. ve Russell, P., “The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast”, **Mol. Biol. Cell**, 9:3321–3334 (1998).

Kearsey, SE., Montgomery, S., Labib, K. ve Lindner, K., “Chromatin binding of the fission yeast replication factor mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and cdc18”, **EMBO J.**, 19: 1681-1690 (2000).

Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A. ve Beach, D., “Four mating-type genes control sexual mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast”, **EMBO J.**, 7: 1537-1547 (1988).

Kim, W.J., Park, E.J., Lee, H., Seong, R.H. ve Park, S.D., “Physical interaction between recombinational proteins Rhp51 and Rad22 in *Schizosaccharomyces pombe*”, **J. Biol. Chem.**, 277:30264–30270 (2002).

Kitamura K, Maekawa H, Shimoda C., “ Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 ve Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G₁-phase”, **Mol. Biol. Cell**, 9: 1065-1080 (1998).

Kitamura, K., Katayama, S., Dhut, S., Sato, M., Watanabe, Y., Yamamoto, M. ve Toda, T., “Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis ve 14- 3-3 protein in fission yeast”, **Dev. Cell**, 1: 389–399 (2001).

Kitamura, K. ve Shimoda, C., “The *Schizosaccharomyces pombe* mam2 gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein”, **EMBO J.**, 12: 3743-3751 (1991).

Khasanov, F. K., Savchenko, G. V., Bashkirova, E. V., Korolev, V. G. et al., “A new recombinational DNA repair gene from gene from *Schizosaccharomyces pombe* with homology to *Escherichia coli* RecA”, **Genetics** 152: 1557–1572 (1999).

Khasanov, F.K., Savchenko, G.V., Bashkirova, E.V., et al., “A new recombinational DNA repair gene from *Schizosaccharomyces pombe* with homology to *Escherichia coli* RecA”, **Genetics**, 152: 1557–1572 (2002).

Khasanov, F.K., Salakhova, A.F., Chepurnaja, O.V., Korolev, V.G. ve Bashkirov, V.I., “Identification and characterization of the rlp1⁺, the novel Rad51 paralog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **DNA Repair**, 3: 1363–1374 (2004).

Klar, A.J.S. et al., “Multiple epigenetic events regulate mating-type switching of fission yeast”, **Novartis Foundation Symposium In Epigenetics (Cardew, G., ed.)**, 214: 87–103 (1998).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Klar, A.J.S. ve Bonaduce, M.J., “The mechanism of fission yeast mating-type interconversion: evidence for two types of epigenetically inherited chromosomal imprinted events.”, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 58: 457–465 (1993).
- Koç, A., Wheeler, L.J., Mathews, C.K. ve Merrill, G.F.,” Hydroxyurea Arrests DNA Replication by a Mechanism That Preserves Basal dNTP Pools”, *J. Biol. Chem.*, 279: 223-230 (2003).
- Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A. ve Thuriaux, P., “Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization”, *Genetics* 87: 471-489 (1977).
- Kovelman, R. ve Russell, P., “Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*”, *Mol. Cell. Biol.*, 16: 86–93 (1996).
- Kramer, D.L., Vujcic, S., Diegelman, P., Alderfer, J., Miller, J.T., Black, J.D., Bergeron, R.J. ve Porter, C.W., “Small Interfering RNA Suppression of Polyamine Analog- Induced Spermidine/Spermine N^1 -Acetyltransferase”, *Cancer Res.*, 59: 1278–1286 (1999).
- Krogh, B.O. ve Symington, L.S., “Recombination proteins in yeast”, *Annu Rev Genet.*, 38:233-71 (2004).
- Kuo, W.L., Deen, D.F., Marton, L.J. ve Shafer, R.H., “Filter elution analysis of the effect of alpha-difluoromethylornithine on X-ray-induced DNA damage in 9L cells”, *Radiat Res.*, 109: 68–77 (1987).
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C. ve Takahashi, Y.,” Polyamines: essential factors for growth and survival”, *Planta*, 228: 367–381(2008).
- Kuznetsov, V.I. V., Radyukina, N. L. ve Shevyakova, N. I., “Polyamines and Stress in Biological Role, Metabolism, and Regulation”, *Russian Journal of Plant Physiology*, 53 (5): 83–604 (2006).
- Langston, L.D. ve Symington L.S., “Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101:15392-15397 (2004).
- Lawrence, C.L., Maekawa, H., Worthington, J.L., Reiter, W., Caroline R. Wilkinson, M. ve Jones N., “Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated with Pcr1 Phosphorylation and Heterodimerization”, *J. Biol. Chem.*, 282: 5160-5170 (2007).
- Leatherwood, J., Lopez-Girona, A. ve Russell, P., “ Interaction of Cdc2 and Cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein”, *Nature*, 379: 360-363 (1996).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Leung, W.Y., A. Malkova, ve. Haber J.E., “Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction”, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 6851-6856 (1997).
- Leupold, U., “Die Verebung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*”, **C.R. Lab. Carlsberg** 24: 381-475 (1950).
- Leupold, U., Nielsen, O. ve Egel, R., “Pheromoninduced meiosis in P-specific mutants of fission yeast”, **Curr. Genet.**, 15: 403-405 (1989).
- Li, P. ve McLeod, M., “Molecular mimicry in development: identification of *ste11*⁺ as a substrate and *mei3*⁺ as a pseudosubstrate inhibitor of *ran1*⁺ kinase”, **Cell**, 87: 869–880 (1996).
- Liu, B., Sutton A., ve Sternglanz, R., “A Yeast Polyamine Acetyltransferase”, **J. Biol. Chem.**, 280: 16659-16664 (2005).
- Lloyd, A.C., “The Regulation of Cell Size”, **Cell**, 154: 1194-1205 (2013).
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. ve Russell, P., “Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein”, **Nature**, 397: 172-175 (1999).
- Lygerou, Z. ve Nurse, P., ”The fission yeast origin recognition complex is constitutively associated with chromatin and is differentially modified through the cell cycle”, **J. Cell Sci.**, 112: 3703-3712 (1999).
- Maeda, T., Takekawa, M. ve Saito, H., “Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor “, **Science**, 269: 554–558 (1995).
- Maiorano, D., Moreau, J. ve Mechali, M., “XCDT1 is required for the assembly of pre-replicative complexes in *Xenopus laevis*”, **Nature**, , 404: 622-625 (2000).
- Manthey, G.M. ve Bailis A.M., “Multiple pathways promote short-sequence recombination in *Saccharomyces cerevisiae*”, **Mol. Cell. Biol.**, 22: 5347-5356 (2002).
- Martin-Castellanos, C., Blanco, M.A., de Prada, J.M., ve Moreno, S., “The *puc1* cyclin regulates the G₁ phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. **Mol. Biol. Cell**, 11: 543–554 (2000).
- Masuda, T., Kariya, K., Shinkai, M., Okada, T. ve Kataoka, T., “Protein kinase Byr2 is a target of Rasl in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **J. Biol. Chem.**, 270: 1979-1982 (1995).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Martin, S.G. ve Berthelot-Grosjean, M., “Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle”, **Nature**, 459: 852–856 (2009).

Matsui, I. ve Pegg, A.E., “Effect of inhibitors of protein synthesis on rat liver spermidine N^1 -acetyltransferase”, **Biochim Biophys Acta.**, 675: 373–378 (1981).

Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F. ve Yamamoto, M., “Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast”, **Mol. Cell. Biol.**, 27: 3154–3164 (2007).

McLeod, M., Stein M. ve Beach, D., “The product of the $mei3^+$ gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast”, **EMBO J.**, 1987 6(3):729-36.

Michaillat, L. ve Mayer, A., “Identification of Genes Affecting Vacuole Membrane Fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*”, **PLoS ONE**, 8(2):e54160 (2013).

Millar, J.B., Buck, V. ve Wilkinson, M.G., “Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast”, **Gene Dev.**, 9:2117–2130 (1995).

Minois, N., Carmona-Gutierrez, D. ve Madeo, F., “Polyamines in aging and disease”, **AGING**, 3 (8):1-17 (2011).

Mitchison, J.M. “The growth of single cells in *Schizosaccharomyces pombe*. **Exp Cell Res** 13: 244–262 (1957).

Mitchison, J.M., “Growth during the cell cycle”, **Int. Rev. Cytol.**, 226:165-258 (2003).

Mitchison, J.M., Creanor, J., Williams, D., “Linear synthesis of sucrase and phosphatases during the cell cycle of *Schizosaccharomyces pombe*”, **J. Cell Sci.**, 5:373-391 (1969).

Mitchison, J.M., Nurse, P., “Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **J. Cell Sci.**, 75: 357-376 (1985).

Mitrikeski, P.T., “Gene Knockout: the Technology of Gene Targeting”, **Third Annual Conference for Biotechnology and Transplantation**, Holliday Inn Skopje. Macedonia, (2012).

Mondesert, O., McGowan, C.H., Russell, P., “Cig2, a B-type cyclin, promotes the onset of S in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Cell. Biol.**, 16: 1527-1533 (1996).

Moon, K.Y., Kong, D., Lee, J.K., Raychaudhuri, S. ve Hurwitz, J., “ Identification and reconstitution of the origin recognition complex from *Schizosaccharomyces pombe*”, **Proc Natl Acad Sci USA**, 96: 12367-12372 (1999).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Moreno, S., Hayles, J. ve Nurse, P., “Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis “, **Cell**, 58: 361-372 (1989).
- Moreno, S., Nurse, P. ve Russell, P., “Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast”, **Nature**, 344: 549–552 (1990).
- Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. ve Shiozaki, K., “Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade”, **Mol Cell**, 30: 108–113 (2008).
- Morrell, J.L., Nichols, C. B. ve Gould, K. L., “The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast”, **J. Cell Sci.**, 117: 5293–5302 (2004).
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A. ve Nurse, P., “A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast”, **Nature**, 459: 857–860 (2009).
- Moser, B.A. ve Russell, P., “Cell cycle regulation in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Curr. Opinion in Microbiol.**, 3: 631-636 (2000).
- Munz, P., Wolf, K., Kohli, J. ve Leupold, U., “Genetics over-view, in Molecular Biology of the Fission Yeast” , edited by Nasim, A., Young, P. ve Johnson, B. F., **Academic Press**, San Diego, 1-30 (1989).
- Nadin-Davis, S.A. ve Nasim, A., “A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the ras gene in fission yeast”, **EMBO J.**, 7: 985-993 (1988).
- Navarro, F.J., Weston L. ve Nurse, P., “Global control of cell growth in fission yeast and its coordination with the cell cycle”, **Curr. Opinion in Cell Biol.**, 24: 833–837 (2012).
- Neiman, A.M., Stevenson, B.J., Xu, H.-P., George, F., Sprague, J., Herskowitz, I., Wigler, M. ve Marcus, S., “Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms”, **Mol. Biol. Cell**, 4: 107-120 (1993).
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I. ve Brown AJP., “Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi”, **BMC Evol. Biol**, 9: 1-18 (2009).
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. ve Nurse, P., “The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast”, **Nature**, 404: 625-628 (2000).
- Nurse, P., “Genetic control of cell size at cell division in yeast”, **Nature**, 256:547–551 (1975).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Nurse, P., “Universal control mechanism regulating onset of M-phase”, *Nature*, 344: 503–508 (1990).

Nurse, P., P. Thuriaux, ve K. Nasmyth., “Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, *Mol. Gen. Genet.* 146: 167–178 (1976).

Nurse, P. ve Thuriaux, P., Controls over the timing of DNA replication during the cell cycle of fission yeast”, *Exp. Cell Res.*, 107: 365–375 (1977).

Nguyen, A.N ve Shiozaki, K., “Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine and tyrosine-specific phosphatases” *Genes Dev.*, 1;13(13):1653-63 (1993).

Nguyen, A.N., Lee, A., Place, W. ve Shiozaki, K., “Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase”, *Mol. Biol. Cell*, 11:1169-1181 (2000).

Obara, T., Nakafuku, M., Yamamoto, M. ve Kaziro, Y., “Isolation and characterization of a gene encoding a Gprotein a subunit from *Schizosaccharomyces pombe*: Involvement in mating and sporulation pathways”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5877-5881 (1991).

Ogawa, Y., Takahashi, T. ve Masukata, H., “Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins”, *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7228-7236 (1999).

Oredsson, S.M., “Polyamine dependence of normal cell-cycle progression”, *Biochemical Society Transactions*, 31(2): 366-370 (2003).

Paques, F. ve Haber J.E., “Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63: 349-404 (1999).

Pegg, A.E., ” Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes” *Biochem J.*, 234: 249–262 (1986).

Pegg, A.E., “Spermidine/spermine- N^1 -acetyltransferase: a key metabolic regulator”, *J. Physiol Endocrinol Metab.*, 294: 995-1010 (2008).

Pegg, A. E. ve McCann, P., “Polyamine metabolism and function”, *Am. J. Physiol.*, 12: 212–221 (1982).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Petersen, J ve Nurse, P., “TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases”, *Nature Cell Biology*, 9: 1263 – 1272 (2007).
- Piet W. J. de Groot, Ruiz, C., Vazquez de Aldana, C.R., Duenas, E., Cid, V.J., Del Rey, F., Rodriguez-Pena, J.M., Perez, P., Veel, A., Arroyo, J.C.J., Juan C. Garcí’a, Gil, C., Molina, M., Garcí’a, L.J., Nombela, C. ve Klis, F.M., “A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*”, *Comp. Funct. Genom.*, 2: 124–142 (2001).
- Proft M. ve Serrano R., “Repressors and Upstream Repressing Sequences of the Stress-Regulated *ENA1* Gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP Protein Sko1p Confers HOG-Dependent Osmotic Regulation”, *Mol. Cell. Biol.*, 19 (1): 537-546 (1999).
- Posas, F. ve Saito, H., “Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK”, *Science*, 276: 1702–1705 (1997).
- Raji, H. ve Hartsuiker E., “Double-strand break repair and homologous recombination in *Schizosaccharomyces pombe*”, *Yeast*; 23: 963–976 (2006).
- Ritzi, M. ve Knippers, R., “Initiation of genome replication: assembly and disassembly of replication-competent chromatin”, *Gene*, 245: 13-20 (2000).
- Rodriguez-Gabriel, M. A. ve Russell, P., “Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*”, *Eukaryot. Cell*, 4:1396–1402 (2005).
- Rosenheim, O., “The isolation of spermine phosphate from semen and testis”, *Biochem J.*, 18: 1253–1263 (1924).
- Rothstein, R.J., “One-step gene disruption in yeast”, *Methods Enzymol.*, 101: 202-211 (1983).
- Rupes, I., “Checking cell size in yeast”, *Trends Genet.*, 18:479–485 (2002).
- Rupes, I., Webb, B.A., Mak, A. ve Young, P.G., “G₂/M arrest caused by actin disruption is a manifestation of the cell size checkpoint in fission yeast”, *Mol. Biol. Cell*, 12: 3892–3903 (2001).
- Russell, P. and Nurse, P., “Cdc25⁺ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast”, *Cell* 45: 145–153 (1986).
- Russell, P. ve Nurse, P., “Negative regulation of mitosis by wee1⁺, a gene encoding a protein kinase homolog”, *Cell*, 49: 559–567 (1987).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Russell, P. ve Nurse, P., “The mitotic inducer nim11 functions in a regulatory network of protein kinase homologs controlling the initiation of mitosis”, **Cell**, 49: 569–576 (1987).
- Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., Millar, J.B., et al., “Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Biol. Cell**, 13: 805-816 (2002)..
- Samejima, I., Mackie, S. ve Fantes, P.A., “Multiple modes of activation of the stress responsive MAP kinase pathway in fission yeast”, **EMBO J.**, 16: 6162–6170 (1997).
- San Jose, C., Monge, R.A., Perez-Diaz, R., Pla J. ve Nombela C.,” The mitogen-activated protein kinase homolog HOG1 gene controls glycerol accumulation in the pathogenic fungus *Candida albicans*”, **J. Bacteriol.**, 178: 5850–5852 (1996).
- Sato, M., Dhut, S. ve Toda, T., “New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Yeast**; 22: 583–591 (2005).
- Sato, S., Peet, M.M. ve Thomas, J.F., “Determining critical pre- and post-anthesis periods and physiological processes in *Lycopersicon esculentum* Mill. exposed to moderately elevated temperatures”, **Journal of Experimental Botany**, 53: 1187–1195 (2002).
- Scorcioni, F., Corti, A., Davalli, P., Astancolle, S. ve Bettuzzi, S., “Manipulation of the expression of regulatory genes of polyamine metabolism results in specific alterations of the cell-cycle progression”, **Biochem. J.**, 354: 217–223 (2001).
- Seidenfeld, J., Deen, D.F. ve Marton, L.J., “Depletion of intracellular polyamine content does not alter the survival of 9L rat brain tumour cells after X-irradiation”, **Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.**, 38: 223–229 (1980).
- Seidenfeld, J., Gray, J.W. ve Marton, L.J., “Depletion of 9L rat brain tumor cell polyamine content by treatment with D,L- α -difluoromethylornithine inhibits proliferation and the G₁ to S transition”, **Exp. Cell Res.**, 131: 209–216 (1981).
- Seiler, N. ve Raul, F. J., “Polyamines and apoptosis” , **Cell Mol. Med.** 9(3):623-42 (2005).
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B.A., Makino, K. ve Millar, J.B., “The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1–Wis1–Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle”, **Gene Dev.**, 11: 1008–1022 (1997).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Shiozaki, K. ve Russell, P., “Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast”, **Genes Dev.**, 10(18):2276-88 (1996).

Shiozaki, K., Shiozaki, M. ve Russell, P., “Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism”, **Mol. Biol. Cell**, 9:1339–1349 (1998).

Singh, J. ve Klar, A.J.S., “DNA polymerase- α is essential for mating-type switching in fission yeast”, **Nature**, 361:271–273 (1993).

Singh Gill, S. ve Tuteja N., “Polyamines and abiotic stress tolerance in plants”, **Plant Signaling & Behavior** 5 (1): 26-33 (2010).

Sinha R.P ve Häder DP., “UV-induced DNA damage and repair: a review”, **Photochem. Photobiol. Sci.**, 1: 225–236 (2002).

Sipiczki, M., “Where does fission yeast sit on the tree of life?”, **Genome Biol.**, 1: Reviews1011 (2000).

Snyder, RD. ve Schroeder, KK.,” Radiosensitivity of polyamine-depleted HeLa cells and modulation by the aminothiols WR-1065”, **Radiat Res.**, 137: 67–75 (1994).

Snyder, RD. ve Sunkara, PS., “Effect of polyamine depletion on DNA damage and repair following UV irradiation of HeLa cells”, **Photochem Photobiol.**, 52: 525–532 (1990).

Smith, D.A., Morgan B.A. ve Quinn, J., “Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways”, **FEMS Microbiol. Lett.**, 306: 1-8 (2010).

Soriano-Carot, M., Bañó MC. Ve Igual JC., “The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress”, **Cell Div.**, 7 (1): 1-14 (2012).

Steiner, N. C., Hahnannberger, K. M. ve Clarke, L., Centromeres of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* are highly variable genetic loci, **Mol. Cell. Biol.** 13:4578-4587 (1993).

Subhashini S.S., Kaliappan S. ve Velan M.,” Removal of heavy metal from aqueous solution using *Schizosaccharomyces pombe* in free and alginate immobilized cells”, **2nd International Conference on Environmental Science and Technology IPCBEE**, IACSIT Press, Singapore, 6: 2107-2111 (2011).

Suga, M., Kusanagi, I. ve Hatakeyama, T., “Electroporation of *Schizosaccharomyces pombe* by hyperosmotic post-pulse incubation”, **BioTechniques**, 36: 218-220 (2004).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. ve Yamamoto, M., “*Schizosaccharomyces pombe* ste11⁺ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development”, **Genes Dev.**, 5:1990–1999 (1991).
- Sung, P., Trujillo, K. M. ve Komen, S.V., “Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*”, **Mutat. Res.**, 451: 257–275 (2000).
- Szostak, J.W., T.L. Orr-Weaver, R.J. Rothstein, ve F.W. Stahl., “The double-strand-break repair model for recombination”, **Cell**, 33: 25-35 (1983).
- Takatsume, Y., Izawa, S. ve Inoue, Y., “Methylglyoxal as a signal initiator for activation of the stress-activated protein kinase cascade in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”, **J. Biol. Chem.**, 281: 9086–9092 (2006).
- Takeda, T., Ogino, K., Matsui, E., Cho, MK., Kumagai, H., Miyake, T., Arai, K. ve Masai, H., “A fission yeast gene, him1⁺/dfp1⁺, encoding a regulatory subunit for Hsk1 kinase, plays essential roles in S-phase initiation as well as in S-phase checkpoint control and recovery from DNA damage”, **Mol. Cell. Biol.**, 19: 5535-5547 (1999).
- Tanaka, K., Davey, J., Imai, Y. ve Yamamoto, M., “*Schizosaccharomyces pombe* map3⁺ encodes the putative M-factor receptor”, **Mol. Cell. Biol.**, 13: 80-88 (1993).
- Taylor, B.L. ve Zhulin, I.B., “PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light”, **Microbiol Mol Biol Rev.**, 63: 479-506 (1999).
- Thomas, K.R. ve Capecchi, M.R., “Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells”, **Cell**, 51: 503-512 (1987).
- Thomas, T. ve Thomas, T.J., “Polyamine Metabolism and Cancer”, **J. Cell Mol. Med.**, 7: 113–126 (2003).
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Sakata, K., Kakinuma, Y. ve Igarashi, K., “Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast”, **J. Biol. Chem.**, 274: 3265-3267 (1999).
- Tomitori, H., Kashiwagi, K., Asakawa, T., Kakinuma, Y., Michael, A.J. ve Igarashi, K., “Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast”, **Biochem. J.**, 353: 681-688 (2001).
- Tsutsui, Y., Morishita, T., Iwasaki, H., Toh, H. ve Shinagawa, H., “A recombination repair gene of *Schizosaccharomyces pombe*, rhp57, is a functional homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* RAD57 gene and is phylogenetically related to the human XRCC3 gene”, **Genetics**, 154: 1451–1461 (2000).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Turner, J.J., Ewald, J.C. ve Skotheim J.M., “Cell Size Control in Yeast”, *Current Biol.*, 22: 350–359 (2012).

Unnikrishnan, A., Gafken **PR.** ve Tsukiyama T., “Dynamic changes in histone acetylation regulate origins of DNA replication”, *Nature structural & molecular biology*, 17 (4): 430-439 (2010).

Valbuena, N. ve Moreno, S., “TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast”, *PLoS ONE* 5: 115-140 (2010).

Van Leeuwenhoek., “A Observationes D. Anthonii Leeuwenhoek, de natis e semine genitali animalculis”, *Philos Trans R Soc Lond.*, 12: 1040–1043 (1678).

Veal, E.A., Findlay, V.J., Day, A.M., Bozonet, S.M., Evans, J.M., Quinn, J. ve Morgan, B.A. “A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide- induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase”, *Mol. Cell*, 15: 129–139 (2004)..

Walden, R., Cordeiro, A. ve Tiburcio, AF., “Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development”, *Plant Physiol*, 113: 1009–1013 (1997).

Wallace, HM., Duthie, J., Evans, DM., Lamond, S., Nicoll, KM. ve Heys, SD., “Alterations in polyamine catabolic enzymes in human breast cancer tissue”, *Clin Cancer Res.*, 6: 3657–3661 (2000).

Wallace, HM., Fraser, AV., Hughes, A., “A perspective of polyamine metabolism”, *Biochem J.*, 376: 1–14 (2003).

Wang, Y. ve Casero, RA., “Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both?”, *J. Biochem*, 139: 17–25 (2006).

Wang, Y., Xu, H.-P., Riggs, M., Rodgers, L. ve Wigler, M., “byr2, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the ras1 mutant phenotype”, *Mol. Cell. Biol.*, 11: 3554-3563 (1991).

Wang, W., Li, P., Schettino, A., Peng, Z. ve McLeod, M., “Characterization of functional regions in the *Schizosaccharomyces pombe* mei3 developmental activator”, *Genetics*, 150: 1007–1018 (1998).

Watanabe, Y., Shinozaki-Yabana, S., Chikashige, Y., Hiraoka, Y. ve Yamamoto, M., “Phosphorylation of RNA-binding protein controls cell cycle switch from mitotic to meiotic in fission yeast”, *Nature*, 386: 187–190 (1997).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

- Watanabe, Y. ve Yamamoto, M., “*S. pombe* mei2⁺ encodes an RNA-binding protein essential for premeiotic DNA synthesis and meiosis I, which cooperates with a novel RNA species meiRNA”, **Cell**, 78: 487–498 (1994).
- Werven, Folkert J.V. ve Amon, A., “Regulation of entry into gametogenesis”, **Phil. Trans. R. Soc. B.**, 366: 3521–3531(2011).
- Willer, M., Hoffmann, L., Styrkarsdottir, U., Egel, R., Davey, J. ve Nielsen, O., ”Two-step activation of meiosis by the *matl* locus in *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Cell Biol.**, 15: 4964-4970 (1995).
- Williams, JR., Casero, RA. ve Dillehay, LE., “The effect of polyamine depletion on the cytotoxic response to PUVA, gamma rays and UVC in V79 cells in vitro”, **Biochem Biophys Res.**, Commun 201: 1–7 (1994).
- Wood, V. vd., “The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*”, **Nature**, 415: 871-880 (2002).
- Wu, L. ve Russell, P., “Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase”, **Nature**, 363:738-741 (1993).
- Wu, J.Q., Kuhn, J.R., Kovar, D.R. ve Pollard, T.D., “Spatial and temporal pathway for assembly ve constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis”, **Dev. Cell**, 5: 723–734 (2003).
- Wu, T., Ling, KQ., Sayre, LM. ve McIntire, WS., “Inhibition of murine N¹-acetylated polyamine oxidase by an acetylenic amine and the allenic amine, MDL”, **Biochem Biophys Res Commun**, 326: 483–490 (2005).
- Xu, H.-P., White, M., Marcus, S. ve Wigler, M., “Concerted action of RAS and G proteins in the sexual response pathways of *Schizosaccharomyces pombe*”, **Mol. Cell Biol.**, 14:50-58(1994).
- Yamaguchi, S., Murakami, H. ve Okayama, H., “A WD repeat protein controls the cell cycle and differentiation by negatively regulating Cdc2/B-type cyclin complexes”, **Mol. Biol. Cell**, 8: 2475-2486 (1997).
- Yamanaka, S., Yamashita, A., Harigaya, Y., Iwata, R. ve Yamamoto, M., “Importance of polyadenylation in the selective elimination of meiotic mRNAs in growing *S. pombe* cells”, **EMBO J.**, 29: 2173–2181 (2010).
- Yamashita, A., Watanabe, Y., Nukina, N. ve Yamamoto, M., “RNA-assisted nuclear transport of the meiotic regulator Mei2⁺ in fission yeast”, **Cell**, 95: 115–123 (1998).
- Yamamoto, M., “Regulation of Meiosis in Fission Yeast”, **Japan Society for Cell Biol.**, 21: 431-436 (1996).

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Yanagida, M., “The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*”, **Genome Biol.**, 3(3): 1–4 (2002).

Yatin M., “Polyamines in living organisms”, **J. Cell Mol. Biol.**, 1: 57-67 (2002).

Yoshikawa, K., Tanaka T., Ida Y, Furusawa, C., Hirasawa T. ve Shimizu H.,”Comprehensive phenotypic analysis of single-gene deletion and overexpression strains of *Saccharomyces cerevisiae*”, **Yeast**, 28: 349–361 (2011).

Young, P.G. ve Fantes, P.A, “*Schizosaccharomyces pombe* mutants affected in their division response to starvation”, **J. Cell Sci.**, 88: 295–304 (1987).

6. ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : İsmail GÜNGÖR
Doğum Yeri ve Tarihi : Suşehri/1988

Eğitim Durumu

Lisans Öğrenimi : Cumhuriyet Üniversitesi /Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Bildiği Yabancı Diller : İngilizce
Bilimsel Faaliyetleri

- **Örs Gevrekci A., GÜNGÖR İ.** (2013) Characterization of Polyamine Synthase and Transporters in Fission Yeast, 7. Uluslararası Fission Yeast Toplantısı, Londra, İngiltere
- **GÜNGÖR İ., Örs Gevrekci A.** (2013) *Schizosaccharomyces pombe*'de SPBC409.08 ve SPAC9.02c Genlerinin Karakterizasyonu, 20. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Zonguldak, Türkiye

İş Deneyimi

Stajlar : Deneysel Tıp Araştırmaları Enstitüsü (DETAE), 2009
Adli Tıp Enstitüsü/İSTANBUL, 2010

Projeler : 111T509 Tübitak

Diğer: Malvern House Dil Okulu/Londra, 2010
Ebru Sanatı, 2009-2013

İletişim

Adres: Kirazlı Mah. Nalan Sok. No: 35/6 Bağcılar/İSTANBUL
Tel: 05077737051

E-Posta Adresi: ismaailgungor@hotmail.com,
ismaailgungor11@gmail.com

08/01/2014