



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Schizosaccharomyces pombe*'de *GUA1* GENİNİN
KNOCK-OUT TEKNİĞİ İLE DELESYONA UĞRATILMASI**

Merve YILMAZER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER

Aralık, 2014

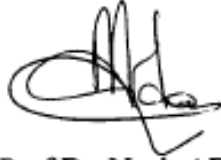
İSTANBUL

Bu çalışma 24/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



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



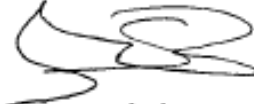
Prof.Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof.Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA
Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç.Dr. Eren ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç.Dr. Bedi GEMİCİ PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięinin 36086 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan her zaman destek ve ilgi gösteren danışman hocam Yard. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER'e ve değerli bilgileriyle eğitim hayatımda büyük katkıları olan Prof. Dr. Nazlı ARDA başta olmak üzere İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca yardım ve desteğini esirgemeyen Deniz YILMAZ ve çalışmalarımdayan yanımda olan tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmamda faz kontrast mikroskobu görüntülerinin elde edilmesinde katkısı olan Biyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dr. Neslihan BALKIS'a teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca yanımda olan, desteklerini benden esirgemeyen ve sevgilerini her daim hissettiğim değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Aralık, 2014

Merve YILMAZER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1.PÜRİN METABOLİZMASI VE İNOZİN MONOFOSFAT DEHİDROGENAZ ..	4
2.1.1. Pürin Metabolizması.....	4
2.1.2. İnozin Monofosfat Dehidrogenaz.....	7
2.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMALAR.....	12
2.2.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
2.2.2. <i>Escherichia coli</i> ve <i>pFA6-KanMX4</i> Plazmidi.....	15
2.3.HOMOLOG REKOMBİNASYON.....	17
2.4.DELESYONLU MUTANTLARIN ÖNEMİ.....	19
2.5.ÇALIŞMADA KULLANILAN TEKNİKLER	20
2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20
2.4.2. “Knock-out” Kaseti İle Gen Delesyonu	20
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1.ORGANİZMA	25
3.2.BESİYERLERİ	27
3.3.ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI	31
3.3.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üretimi ve Saklanması	31
3.3.2. Plazmid Taşıyan <i>E. coli</i> Irklarının Üretimi ve Saklanması.....	31
3.4. <i>ESCHERİCHİA COLİ</i> ’DEN <i>PFA6-KANMX4</i> PLAZMİDİ İZOLASYONU VE KONTROLÜ	32
3.4.1. <i>Escherichia coli</i> ’den <i>pFA6-KanMX4</i> Plazmidi İzolasyonu	32

3.4.2. <i>pFA6-KanMX4</i> Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi	32
3.5. <i>SCHİZOSACCHAROMYCES POMBE</i> 'DEN GENOMİK DNA İZOLASYONU.	33
3.6. DNA MİKTARI VE SAFLIĞININ ÖLÇÜMÜ	34
3.7. AGAR JEL HAZIRLANIŞI VE ELEKTROFOREZ	34
3.8. "KNOCK-OUT" KASETİNİN OLUŞTURULMASI	36
3.8.1. Primer Tasarımı	39
3.8.2. PCR ile <i>gua1</i> Geni Kontrol Dizileri ile <i>gua1</i> Geninin Yanında Yer Alan 653 ve 285 bp'lik Dizilerin Çoğaltılması	39
3.8.3. 653 ve 285 bp'lik PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	40
3.8.4. "Knock-out" Kasetinin Oluşturulması	41
3.8.5. "Knock-out" Kasetinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması	42
3.8.6. "Knock-out" Kasetinin Nükleotid Dizi Analizi.....	43
3.9. "KNOCK-OUT" KASETİNİN <i>SCHİZOSACCHAROMYCES POMBE</i> 'YE TRANSFORMASYONU	43
3.9.1. Transformant Kolonilerin Seçilmesi	44
3.9.2. Diploid <i>Schizosaccharomyces pombe</i> Irklarının Haploidizasyonu ve Seçilmesi.....	45
3.10. REKOMBİNANT TRANSFORMANT KOLONİLERİN KONTROL EDİLMESİ	45
3.10.1. Koloni PCR.....	45
4. BULGULAR.....	47
4.1. <i>ESCHERİCHIA COLI</i> 'DEN PLAZMİD İZOLASYONU VE KONTROLÜ	47
4.2. <i>SCHİZOSACCHAROMYCES POMBE</i> 'DEN GENOMİK DNA İZOLASYONU.	49
4.3. "KNOCK-OUT" KASETİ ELDE EDİLMESİ	50
4.3.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 'de Homoloji Gösteren 653 bp'lik ve 285 bp'lik Dizilerin PCR ile Çoğaltılması	50
4.3.2. Homoloji Gösteren Diziler Kullanılarak PCR ile "Knock-out" Kasetinin Oluşturulması ve Jelden Geri Kazanılması	51
4.3.3. "Knock-out" Kasetinin Nükleotid Dizi Analizi.....	52
4.4. TRANSFORMASYON.....	54
4.5. TRANSFORMASYON SONRASI KONTROL	55
4.5.1. Kaset Almış 972h- ve <i>ura4h-</i> <i>S.pombe</i> Transformantlarının Seçilmesi	55
4.5.2. Transformant Diploid <i>S.pombe</i> Hücrelerinin Haploidizasyonu	56
4.5.3. Haploidizasyon Sonrası Transformant Haploid <i>S.pombe</i> Kolonilerinin Seçimi	57
4.5.4. "Knock-out" Kasetlerinin Koloni PCR ile Kontrolü.....	59

4.5.5. Olası <i>gua1</i> Mutantı 972h ⁻ Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi.....	60
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	62
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 : Riboz-5-fosfat'tan IMP'nin <i>de novo</i> sentezi (Jancso ve diğ., 2001).	5
Şekil 2.2 : IMP'den AMP ve GMP biyosentezi (Shu ve Nair, 2008).	6
Şekil 2.3 : Guanin nükleotidinin <i>de novo</i> ve kurtarma yolağı (Hedstrom, 2009).	7
Şekil 2.4 : IMPDH'nin yapısı (Hedstrom, 2009).	9
Şekil 2.5 : Homolog rekombinasyonun RecBCD yolağı (Weaver, 2011).	18
Şekil 2.6 : Holiday bağlantısının ayrılması (Weaver, 2011).	19
Şekil 2.7 : Homolog rekombinasyon aracılı gen hedefleme (Mitrikeski, 2012).	22
Şekil 3.1 : <i>pFA6-KanMX4</i> plazmid haritası (https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pFA6-kanMX4/).	26
Şekil 3.2 : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan "DNA Ladder".	35
Şekil 3.3 : <i>S.pombe</i> 2. kromozomunda <i>gua1</i> geninin yerleşimi (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2540315).	37
Şekil 3.4 : "Knock-out" kasetinin oluşturulması.	38
Şekil 4.1 : İzole edilen <i>pFA6-KanMX4</i> plazmidinin agaroz jel görüntüsü. M : 1 kb DNA Ladder.	48
Şekil 4.2: <i>pFA6-KanMX4</i> plazmidini EcoRI ve SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli, EcoRI ve SalI restriksiyon endonükleazı ile ikili kesiminin agaroz jel görüntüsü.	49
Şekil 4.3 : <i>S.pombe</i> 972h- genomik DNA'sı	50
Şekil 4.4 : Homoloji gösteren 285(A) ve 653(B) bç'lik PCR ürünleri. M: DNA Ladder.	51
Şekil 4.5 : "Knock-out" kasetinin agaroz jel görüntüsü. KS: "knock-out" kaseti; M: 1 kb DNA Ladder.	52
Şekil 4.6 : "Knock-out" kaset dizisinin <i>S.pombe</i> genomuyla "BLAST" analizi.	53
Şekil 4.7 : "Knock-out" kaset dizisinin <i>pFA6-KanMX4</i> plazmidıyla "BLAST" analizi.	54
Şekil 4.8 : "Geneticin" içeren YEA besiyerinde "knock-out" kaseti transforme edilmiş 972h- kolonileri (a) ve kontrolü (b).	55

Şekil 4.9: “Geneticin” içeren YEA besiyerinde “knock-out” kaseti transforme edilmiş <i>ura4h</i> -mutant kolonileri(a) ve kontrol grubu(b).	56
Şekil 4.10 : “Geneticin” içeren YEA besiyerinde “knock-out” kaseti transforme edilmiş diploid koloniler (a) ve kontrolü (b).....	57
Şekil 4.11 : Haploid ve diploid <i>S.pombe</i> hücrelerin phloxin B içeren YEA besiyerindeki görüntüleri.	58
Şekil 4.12 : Seçici besiyerinde üreyen haploid koloniler. a. MMA besiyeri b.guanin içeren MMA besiyeri.....	59
Şekil 4.13 : Olası <i>gua1</i> delesyonlu 972h ⁻ ırkı koloni PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.....	60
Şekil 4.14 : 972h ⁻ transformant (A) ve yabani ırk 972h ⁻ (B) <i>S.pombe</i> hücrelerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.	61

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S.pombe</i> ve <i>E. coli</i> ırklarının özellikleri	27
Tablo 3.2 : “Luria-Bertani” (LB) besiyeri içeriği (<i>E.coli</i> üretimi).....	27
Tablo 3.3 : “Yeast Extract Agar” (YEA) besiyeri içeriği.....	28
Tablo 3.4 : “Yeast Nitrogen Base” Besiyeri (YNB) besiyeri içeriği.....	28
Tablo 3.5 : “Minimal Medium Agar” (MMA) besiyeri içeriği.....	29
Tablo 3.6 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon A1	29
Tablo 3.7 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon A2	30
Tablo 3.8 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon B1.....	30
Tablo 3.9 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon B2.....	30
Tablo 3.10 : EcoRI ve Sall restriksiyon endonükleazlarıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.....	33
Tablo 3.11 : Agaroz Jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	35
Tablo 3.12 : Kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.....	39
Tablo 3.13 : Birinci aşama PCR bileşenleri ve miktarları	40
Tablo 3.14 : Birinci aşama PCR döngüleri.....	40
Tablo 3.15 : İkinci aşama PCR bileşenleri	41
Tablo 3.16 : İkinci aşama PCR döngüleri.....	42
Tablo 3.17 : “Knock-out” kaseti nükleotid dizi analizinde kullanılan primerler	43
Tablo 3.18 : Transformasyonda kullanılan çözeltiler.....	43
Tablo 3.19 : Koloni PCR’da kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.....	46
Tablo 3.20 : Koloni PCR bileşenleri	46
Tablo 3.21 : Koloni PCR koşulları.....	46

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
°C	: Santigrad
CO ₂	: Karbondioksit
G418	: Geneticin antibiyotiği
H ₃ PO ₄	: Fosforik asit
K ⁺	: Potasyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
N	: normal
NH ₃	: Amonyak

Kısaltmalar	Açıklama
6AU	: 6-azaurasil
ml	: mikrolitre
µm	: mikrometre
AMP	: Adenozin monofosfat
APRT	: Adenin fosforibozil transferaz
atm	: atmosfer
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CBS	: Cystathionine beta synthase
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
G	: gram
GMP	: Guanozin monofosfat
GMPS	: GMP sentetaz
GTP	: Guanozin trifosfat
HGPRT	: Hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz
IMP	: İnozin 5'- monofosfat
IMPDH	: İnozin 5'-monofosfat dehidrogenaz
kan ^r	: Kanamisin direnç geni
Kb	: Kilobaz
L	: litre
LB	: Luria-Bertani besiyeri

Mb	: Megabaz
MDR	: Multidrug resistance
mg	: miligram
ml	: mililitre
mM	: milimolar
MMA	: Minimal katı besiyeri
MPA	: Mikofenolik asit
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NCBI	: The National Center for Biotechnology Information
ORF	: Açık okuma çerçevesi
Ori	: Replikasyon başlama bölgesi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	: pikomol
PRPP	: 5-fosforibozil 1-pirofosfat
RNA	: Ribonükleik asit
RNAi	: RNA interferens
rpm	: Dakikada devir sayısı “Revolutions per minute”
SSB	: Tek ipliğe bağlanan proteinler
TAE	: Tris-asetat EDTA tamponu
TEF	: Thyrotroph embryonic factor
U	: Ünite
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
XMP	: Ksantosin monofosfat
YEA	: Maya ekstreli katı besiyeri
YES	: İlaveli maya ekstreli sıvı besiyeri “Yeast Extract with Supplements”
YNB	: Yeast Nitrogen Base Besiyeri

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

Schizosaccharomyces pombe'de GUA1 GENİNİN KNOCK-OUT TEKNİĞİ İLE DELESYONA UĞRATILMASI

Merve YILMAZER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Semian KARAER UZUNER

Bu çalışmada tek hücreli ve ökaryotik bir model organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'de guanozin monofosfatın (GMP) *de novo* biyosentezinin ilk aşamasını katalizleyen inozin monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enzimini şifreleyen *gua1* geninin “knock-out” tekniği ile delesyona uğratılması amaçlandı.

Schizosaccharomyces pombe'de PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) temelli gen hedefleme yöntemi esas alınarak PCR tekniğiyle “knock-out” kaseti oluşturuldu ve bu kaset *Schizosaccharomyces pombe*'ye transforme edildi. Çalışmada yabani ırk (972h⁻), *ura4h⁻* mutant ırkı ve diploid *Schizosaccharomyces pombe* ırkları kullanıldı. *pFA6-kanMX4* plazmidi taşıyan *E.coli DH5α* ırkından *pFA6-kanMX4* plazmidi izole edildi ve “knock-out” kaseti için kalıp olarak kullanıldı. *Schizosaccharomyces pombe*'nin 972h⁻ (yabani ırk) genom DNA'sı kalıp olarak kullanılarak *gua1* geninin iki yanında bulunan 653 ve 285 bp'lik diziler elde edildi ve *pFA6* plazmidi kullanımı ile kanamisin direnç genini de içeren kaset meydana getirildi. 653 ve 285 bp'lik diziler ilk PCR sonrası oluşturulurken kaset ikinci PCR sonrasında elde edildi. Lityum asetat yöntemiyle transformasyon sonrası bu kasetin *Schizosaccharomyces pombe* genomunda *gua1* geni içindeki bölgeye homolog rekombinasyonla girişi amaçlandı.

Transformasyona uğratılmış hücreler, “geneticin” içeren YEA besiyerine ekildi. Böylece kaseti genomuna almış olan 972h⁻, *ura4h⁻* mutantı ve diploid koloniler seçildi. Seçilim sonrası diploid kolonilerin haploidizasyonu gerçekleştirildi. Yabani ırk (972h⁻), *ura4h⁻* mutant ırkı ve haploid koloniler “geneticin” içeren YEA, YEA, guanin içeren MMA, urasil ve guanin içeren MMA ve MMA seçici besiyerlerine ekildi. Bu aşamada

guanin mutanrı olabilecek koloniler belirlendi. Son olarak delesyonun doğru bölgede gerçekleşip gerçekleşmediği ise koloni PCR ile kontrol edildi. Koloni PCR sonrası bir kolonide beklenen sonuç elde edildi.

Aralık 2014, 91 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*, *gua1* geni, knock-out tekniği, delesyon, IMPDH

SUMMARY

M.Sc. THESIS

DELETION OF *GUA1* GENE WITH KNOCK-OUT TECHNIQUE IN *Schizosaccharomyces pombe*

Merve YILMAZER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Semian KARAER UZUNER

In this study, we aimed to deletion of *gua1* gene that encodes inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) in eukaryotic model organism *Schizosaccharomyces pombe*. IMPDH catalyzes the first step in *de novo* biosynthesis of guanosine monophosphate (GMP).

Knock-out cassette was constructed with PCR (Polymerase Chain Reaction)-based gene targeting technique in *Schizosaccharomyces pombe* and this knock-out cassette was transformed to *Schizosaccharomyces pombe*. In this study, we used wild type (972h⁻), *ura4h⁻* mutant strain and diploid strain of *Schizosaccharomyces pombe*. The *pFA6-kanMX4* plasmid was isolated from *DH5α* strain of *E.coli* that contains *pFA6-kanMX4* plasmid and this plasmid was used as template for knock-out cassette. Cassette contains 653 and 285 bp sequences which are upstream and downstream of *gua1* gene in *S.pombe* genome and kanamycin resistance gene obtained from *pFA6* plasmid. 653 and 285 bp products were obtained after the first PCR. Template in the first PCR was *S.pombe* genome. On the other hand, the knock-out cassette was produced after the second PCR. After transformation with lithium acetate method we aimed that this cassette replace with the sequences of *gua1* gene via homologous recombination.

The cells cultured in YEA medium with geneticin after transformation. Thus, we could select 972h⁻, *ura4h⁻* mutant and diploid colonies which integrated knock-out cassette to genome via homologous recombination. Haploidizations of diploid colonies were performed and then wild type (972h⁻), *ura4h⁻* and haploid colonies were selected in YEA (yeast extract agar) with geneticin, YEA, MMA (minimal medium agar), MMA

with guanine and MMA with guanine and uracil. In this step we determined possible mutant colonies in *gua1* gene. Finally colony PCR techniques were performed to control whether the deletion is made in the right place or not. After colony PCR expected result was obtained in one single transformant colony.

December 2014, 91 pages.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, *gua1* gene, knock-out technique, deletion, IMPDH

1. GİRİŞ

Pürin nükleotidi *de novo* sentez ve kurtarma yolları tüm canlı organizmalarda önemli bir role sahiptir (Marr, 1991). Pürin nükleotidleri, hücre sinyalinde önemli metabolik düzenleyici olmasıyla birlikte adenosin trifosfat (ATP), guanosin trifosfat (GTP) ve koenzim aracılı biyosentez ile deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) gibi pek çok biyokimyasal süreç için gereklidir (Stryer, 1995). Hücresel önemleri ve kemoterapik hedef olarak potansiyel olmaları nedeniyle pürin *de novo* ve kurtarma yolları çeşitli organizmalarda geniş ölçüde çalışılmaktadır (Jancso ve diğ., 2001).

Inozin 5'-monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enzimi pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentezinde anahtar enzim olarak görev almaktadır. *IMPDH* (E.C. 1.1.1.205) enzimi, inozin monofosfat (IMP)'ın ksantosin monofosfat (XMP)'a nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺) bağımlı oksidasyonunu katalizlemektedir (Weber, 1983; Fleming ve diğ., 1996; Nimmesgern ve diğ., 1999; Goldstein ve diğ., 1999; Sintchak ve diğ., 2000; Nair, 2003,2005; Hedstrom, 2009). *IMPDH* bakteri ve protozoada belirlenmiş, insan *IMPDH*'ı ile %30-40 dizi benzerliği içerdiği bulunmuştur (Collart ve Huberman, 1988; Natsumeda ve diğ., 1990; Beck ve diğ., 1994). *S.pombe* de *IMPDH* enzimi *gua1* geninin ürünüdür, *gua1* geni 2. kromozomun sentromere yakın bir bölgesinde yer almaktadır. (Oraler ve diğ., 1990; Karaer ve diğ., 2006).

IMPDH enziminin pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentez yolağındaki metabolik dallanma noktasındaki rolü, immünosupresyon (Ratcliffe, 2006), kanser (Chen ve Pankiewicz, 2007; Olah ve diğ., 2006), antiviral (Nair ve Shu, 2007) ve antimikrobiyal kemoterapi (Shu ve Nair, 2008) için ilaçların keşfinde *IMPDH*'ı hedef haline getirmektedir.

Ökaryotik organizmaların genom boyutunda gen delesyon koleksiyonları, temel biyolojide moleküler mekanizmaların araştırılması ve medikal uygulamada veya biyomühendislikte hedef alınan yolların tanımlanması için önemli imkanlar sağlamaktadır. Gen delesyon koleksiyonlarının oluşturulması zordur ve “RNA interference (RNAi)” çoğu organizmada gen aktivitesini baskılamak için popüler bir

alternatif yaklaşım sağlamaktadır. Ancak RNAi yaklaşımları gen anlatımının kısmi olarak engellenmesi gibi engellerle karşılaşmaktadır. (Kim ve diğ., 2010)

Günümüzde “knock-out” teknolojisi tek hücreli ökaryotlardan insan hücresinin de dahil olduğu memelilere kadar çeşitli organizmalarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Bu teknoloji canlı organizmaların genomunu homolog rekombinasyon ile gen hedeflemeye dayalı olarak değiştiren kullanışlı bir tekniktir. Homolog rekombinasyon ile gen hedefleme teknolojisinde *in vitro* oluşturulmuş olan dış kaynaklı DNA dizileri (plazmid, değiştirilmiş gen, kaset), istenen genetik değişime yol açan hedef diziyle homolog rekombinasyonunun gerçekleşmesi için hücreye aktarılmaktadır. (Mitrikeski, 2012).

“Knock-out” teknolojisi maya delesyonlu suşların tüm setini oluşturmayı amaçlayan Saccharomyces Genom Delesyon Projesi “Saccharomyces Genome Deletion Project (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)” gibi araştırma girişimlerine olanak sağlamaktadır. Bu projenin başarısı fare gibi daha kompleks organizmalarda benzer araştırmaların önünü açmıştır (<https://www.mousephenotype.org/>) (*Rxfp2*, *Dsc2*, *Sag*, *Gnpda1*). Büyük ve uluslararası araştırma birliklerinin amacı, “knock-out” tekniği kullanılarak elde edilen delesyonlu mutantların fenotipik analiziyle bir organizmadaki tüm açık okuma çerçevelerinin (ORF) spesifik fonksiyonlarını belirlemektir (Mitrikeski, 2012).

S. pombe genlerinin “knock-out” edilmesi için Kore BIONEER Ortaklığı girişimde bulunmuştur (<http://pombe.bioneer.co.kr>). Genlerin “knock-out” edilmesi ve değiştirilmesi yaygın bir şekilde *S. pombe*’de kullanılmaktadır (Gegan ve diğ., 2006).

Tek hücreli ökaryotik organizmalar olan mayalar, Sümerler döneminden günümüze kadar yaklaşık 6000 yıldır bira, ekmek ve şarap yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde ise ilerleyen teknolojiyle birlikte mayalar gıda teknolojisi, fermentasyon endüstrisi, biyomedikal ve biyolojik araştırmalar, sağlık endüstrisi ve çevresel teknolojiler gibi alanlarda kullanılmaktadır (Feldmann, 2009).

S. pombe karmaşık yapıdaki ökaryotik hücrelerle ortak özellikler gösteren (zarla çevrili organeller, ortadan ikiye bölünme, hücre bölünmesi, transkripsiyon ve translasyon süreçleri ve düzenleme vb.), bağımsız yaşayabilen, tek hücreli, kitin içeren hücre duvarına sahip, mitoz ve eşeyli üreme gibi Ascomycetes özellikleriyle karakterize bir

mantar türüdür (Wood ve diğ., 2002). *S. pombe* genomu dizilenmiş altıncı ökaryotik model organizmadır (Decottignies ve diğ., 2003). Tek hücreli *S. pombe* sadece üç kromozomdan oluşan genoma sahiptir ve genelde haploid halde bulunmaktadır (Kohli ve diğ., 1977). *S. pombe* genom projesi 2002 yılında tamamlanmış (Wood ve diğ., 2002) ve genom boyutu 13,8 Mb (rDNA hariç 12,57 Mb) olarak belirlenmiştir. Total gen sayısı günümüzde *S. pombe* veritabanı olan PomBase’de 5123 gen olarak tanımlanmaktadır ve bu gen sayısı serbest yaşayan ökaryotik organizmalar arasında *S. pombe*’nin az sayıda gen taşıyan organizmalardan biri olduğunu göstermektedir (Sasaki ve diğ., 2013; <http://www.pombase.org/status/statistics>). Diğer ökaryotik organizmalara göre maya genom boyutu küçük olmasına karşın, yüksek ökaryotların sahip olduğu özelliklerin çoğunu içermektedir. Çoğu hücresel sürecin (nükleozom organizasyonu, ökaryotik mRNA modifikasyonu vb.) farklı ökaryotik türler arasında korunmuş olması, mayaları moleküler biyolojide önemli model organizmalar haline getirmektedir (Lundblad ve Struhl, 2008).

Bu çalışmada %99’u tamamlanmış olan *S. pombe* Genom Delesyon Projesi’nden (Spirek ve diğ., 2010) yola çıkarak daha önce delesyona uğratılmamış olan *gua1* geninin “knock-out” teknolojisi kullanılarak homolog rekombinasyon ile delesyonu amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. PÜRİN METABOLİZMASI VE İNOZİN MONOFOSFAT DEHİDROGENAZ

Nükleik asitler, nükleotid olarak adlandırılan monomerlerin uzun zincirler oluşturarak meydana getirdiği makromoleküllerdir. Nükleik asitler genetik bilginin depolanması ve aktarılmasında görev almanın yanında yapısal ve katalitik rollere de sahiptir. Kimyasal enerji taşıyıcıları ATP ve GTP ile nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), S-adenozilmetionin, koenzim A gibi koenzimlerin bileşenleridir. Ayrıca siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) gibi bazı nükleotidler hücrede ikincil haberci olarak görev almaktadır (Lehninger ve diğ., 2005).

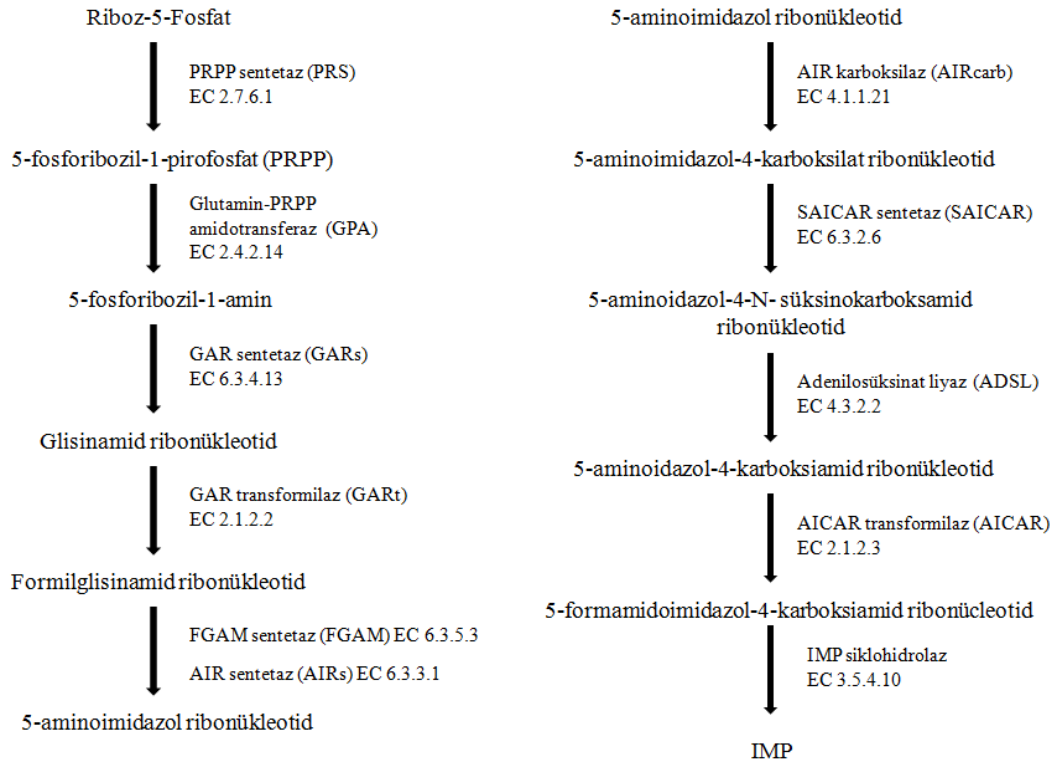
Nükleotid sentezinin tüm hücrelerde önemi büyüktür. Nükleotidlerin biyosentezi iki temel şekilde meydana gelir. Birinci yol nükleotidlerin amino asitler, riboz 5-fosfat, karbondioksit (CO_2) ve amonyak (NH_3) gibi metabolik öncüller kullanılarak yeniden (*de novo*) sentezidir. İkinci yol ise nükleik asitlerin yıkımı sırasında açığa çıkan azotlu bazlar veya nükleozidlerin yeniden nükleotid yapımında kullanıldığı kurtarma (salvaj) yolağıdır. Her iki yolak da hücre metabolizmasında önemlidir. (Lehninger ve diğ., 2005)

Pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentezi çalışılmış olan tüm organizmalarda temelde aynıdır ve inozin 5'-monofosfat dehidrogenaz (IMPDH; E.C.1.1.1.205) enzimi bu yolağın düzenlenmesinde anahtar rol oynamaktadır.

2.1.1. Pürin Metabolizması

Pürin nükleotidinin *de novo* sentezi sitoplazmada bulunan enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar dizisiyle gerçekleşmektedir. *De novo* pürin sentez yolağı inozinik asit oluşumuna yol açan 11 enzimatik reaksiyondan meydana gelmektedir. Pürin nükleotidinin sentezi, pentoz-fosfat yolundan sağlanan riboz 5'-fosfat ve ATP'den "5'-

fosforibozil 1-pirofosfat (PRPP) sentetaz (PRS; EC: 2.7.6.1)” enzimi aracılığıyla meydana gelen PRPP ile başlamaktadır (Jancso ve diğ., 2001; Lehninger ve diğ., 2005). PRPP pürin biyosentezinde anahtar bileşendir, karbon ve nitrojen metabolizmasını bağlayan önemli bir hücresel metabolittir. Ayrıca PRPP histidin ve triptofan ile piridin (NAD^+ , NADP^+), pürin ve pirimidin nükleotidlerinin *de novo* ve kurtarma yollarında yer alan öncül moleküldür (Jiménez ve diğ., 2008). PRPP ve glutaminden “*PRPP amido transferaz*” enziminin kataliziyle 5'-fosforibozilamin sentezlenir. 10 reaksiyon sonucunda ilk pürin nükleotidi IMP elde edilmektedir (Şekil 2.1).



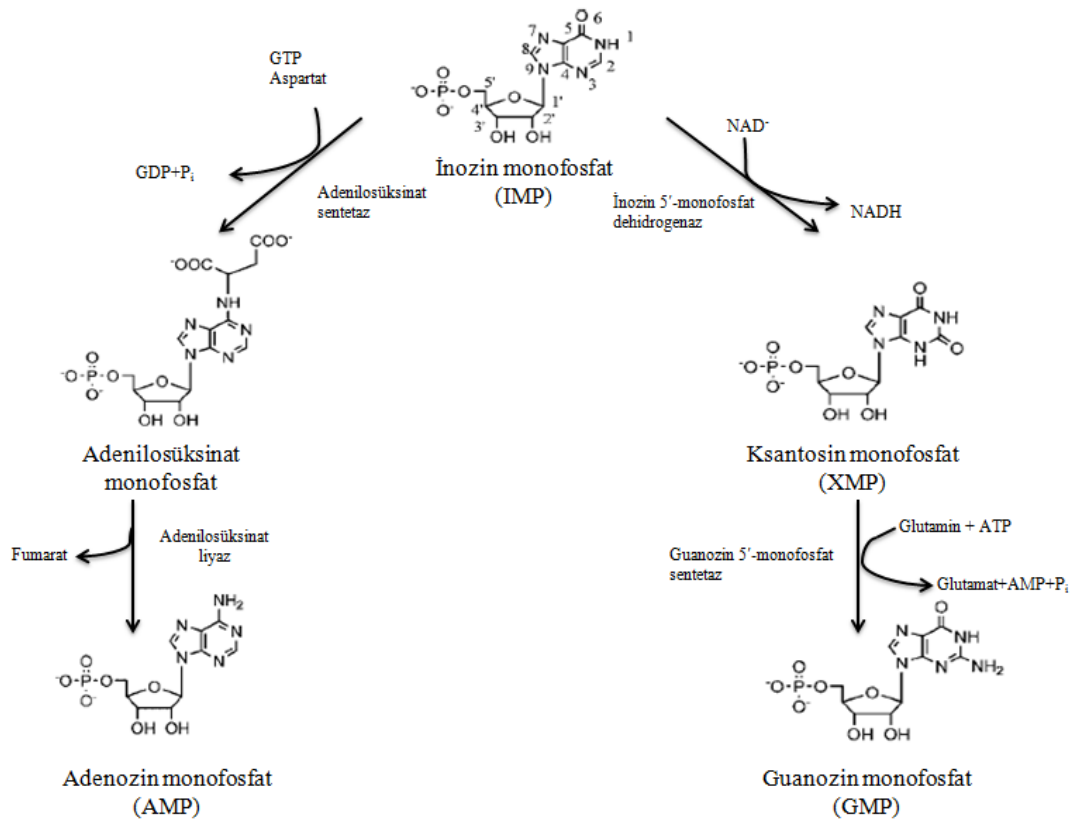
Şekil 2.1 : Riboz-5-fosfat'tan IMP'nin *de novo* sentezi (Jancso ve diğ., 2001).

IMP oluşumundan sonra iki farklı yolakla adenzin monofosfat (AMP) ve guanozin monofosfat (GMP) sentezi gerçekleşmektedir.

IMP'den AMP oluşumu sırasında aspartatın IMP'ye ilavesiyle adenilosüksinat meydana gelmektedir. Adenilosüksinatın sentezinde yüksek enerjili fosfat kaynağı olarak GTP kullanılmaktadır. Sonraki basamakta “*adenilosüksinat liyaz*” enzimi tarafından

katalizlenen reaksiyonda fumarat ayrılmakta ve inozin halkasının 6. karbonuna bir amin grubu eklenmektedir. Böylece inozin monofosfat, adenozin monofosfata dönüşür.

IMP'den GMP oluşumu sırasında “*IMP dehidrojenaz (IMPDH)*” tarafından 2. karbonun oksidasyonu ile ksantozin monofosfat (XMP) meydana gelmektedir. XMP'nin oksitlenmiş olan 2. karbonuna “*GMP sentetaz*” aracılığıyla glutaminin amid grubunun aktarılmasıyla GMP oluşmaktadır. Bu reaksiyonda enerji kaynağı olarak ATP kullanılmaktadır (Şekil 2.2).

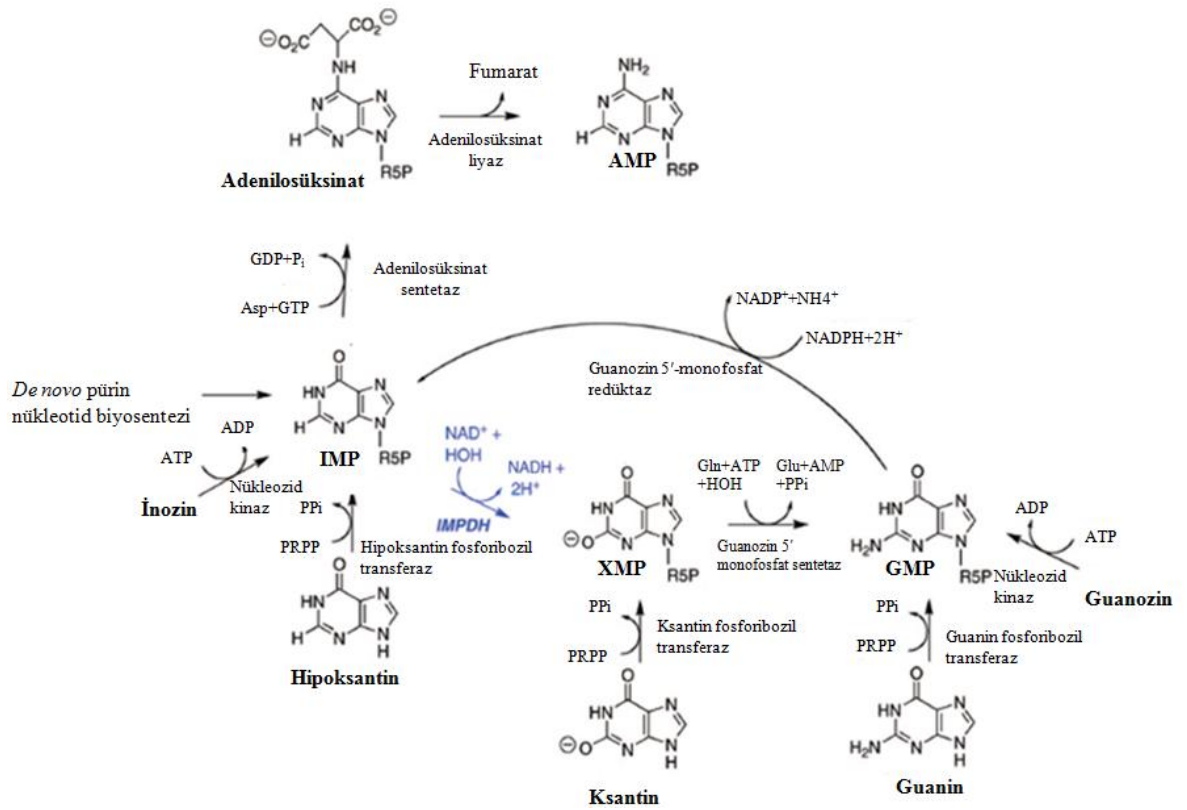


Şekil 2.2 : IMP'den AMP ve GMP biyosentezi (Shu ve Nair, 2008).

De novo pürin nükleotid sentezinin kontrolünde “feedback” mekanizması önemli bir yer tutmaktadır. Meydana gelen pürin monofosfatlar (IMP, AMP VE GMP) “PRPP sentetaz” ve “PRPP-amidotransferaz” enzimlerini inhibe etmektedir. AMP sentezinde GTP, GMP sentezinde ise ATP kullanılması nedeniyle ATP konsantrasyonundaki artış GMP sentezini, GTP konsantrasyonundaki artış ise AMP sentezini arttırmaktadır.

Bu karşılıklı substrat ilişkisi adenozin ve guanozin nükleotidlerinin sentezinde bir denge durumunun oluşmasına yardım etmektedir (Lehninger ve diğ., 2005).

Pürin nükleotidlerinin kurtarma tepkimeleriyle sentezinde (Şekil 2.3) adenin, guanin ve hipoksantinden tek bir tepkime ile nükleozid monofosfat elde edilmektedir. AMP sentezini “adenin fosforibozil transferaz (APRT)”, IMP ve GMP sentezini ise “hipoksantin-guanin fosforibozil transferaz (HGPRT)” katalizlemektedir. Her iki tepkimede de riboz-fosfat kaynağı olarak PRPP kullanılmaktadır (Hedstrom, 2009).



Şekil 2.3 : Guanin nükleotidinin *de novo* ve kurtarma yolağı (Hedstrom, 2009).

2.1.2. İnozin Monofosfat Dehidrogenaz

İnozin 5'-monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enzimi pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentezinde anahtar enzim olarak görev almaktadır. IMPDH (E.C.1.1.1.205) enzimi, IMP'nin XMP'ye NAD⁺ bağımlı oksidasyonunu katalizlemektedir (Nimmesgern ve

diğ., 1999; Sintchak ve diğ., 2000; Goldstein ve diğ., 1999; Fleming ve diğ., 1996; Nair, 2003, 2005; Weber, 1983; Hedstrom, 2009).

IMP pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentezinin ürünüdür ve hem adenin hem de guanin nükleotidlerinin öncül molekülüdür. *IMPDH* enziminin katalizlediği reaksiyon (IMP'nin, XMP'ye dönüşüm reaksiyonu) guanin nükleotidi biyosentezinde ilk ve hız sınırlayıcı basamaktır (Crabtree ve Henderson, 1971; Snyder ve diğ., 1972; Jackson ve diğ., 1975; Weber, 1983). Bu reaksiyon sonrası meydana gelen XMP, “*GMP sentetaz* (GMPS)” enzimi aracılığıyla GMP'ye dönüşmektedir (Hedstrom, 2009).

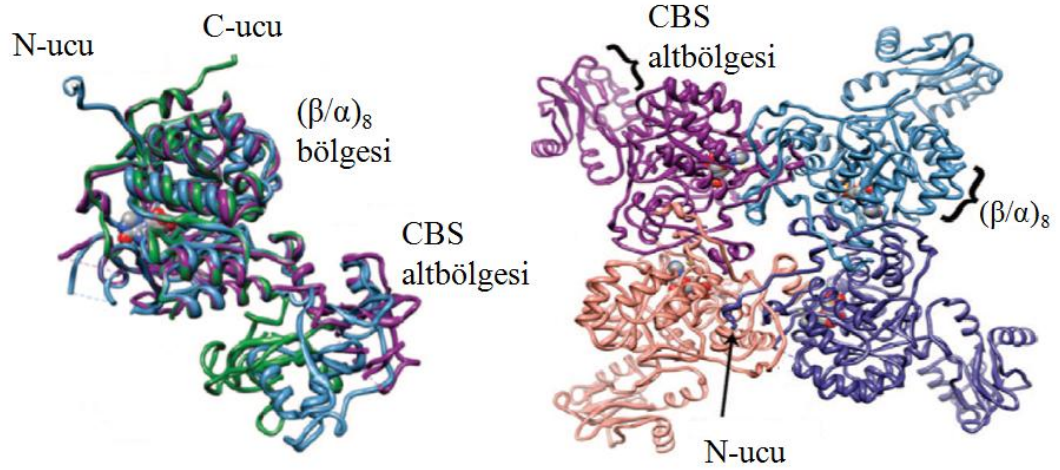
IMPDH reaksiyonu ilk olarak 1957'de *Aerobacter aerogenes*'in özütünde bildirilmiştir (Magasanik ve diğ., 1957). *IMPDH* memeli (Anderson ve diğ., 1968; Pugh ve Skibo, 1993), bakteriyal (Wu ve Scrimgeour, 1973; Gilbert ve diğ., 1979; Rao ve diğ., 2013), parazitik (Hupe ve diğ., 1986; Verham ve diğ., 1987) ve bitkisel (Turner ve King, 1961; Atkins ve diğ., 1985) kaynaklardan izole edilmiştir. *Tritrichomonas foetus* (Huete-Perez ve diğ., 1995; Digits ve Hedstrom, 1999) ve *Cryptosporidium parvum* (Umejiego ve diğ., 2004)'un *IMPDH*'ı ve insan *hIMPDH2*'si (Sintchak ve diğ., 1996; Hager ve diğ., 1995) *E.coli*'de rekombinant protein olarak üretilmiş ve iyi bir şekilde karakterizasyonu yapılmıştır (Hedstrom, 2009).

IMPDH homologları bakteri, protozoa ve memelilerde belirlenmiş ve %30-40 dizi benzerliği içerdiği bulunmuştur (Collart ve Huberman, 1988; Natsumeda ve diğ., 1990; Beck ve diğ., 1994). Bazı memeli türlerinde iki izoform tanımlanmaktadır. İnsan *IMPDH*'ı 7 ve 3. kromozomlarda yer alan (Gu ve diğ., 1994; Kost-Alimova ve diğ., 1998; Haglund ve diğ., 2007) tip I “*IMPDH1*” ve tip II “*IMPDH2*” olmak üzere iki tip izoforma sahiptir (Shu ve Nair, 2008) ve birbirleriyle %84 oranında dizi benzerliği gösterdiği saptanmıştır (Natsumeda ve diğ., 1990; Fleming ve diğ., 1996).

İnsan ve diğer memeliler *IMPDH1* ve *IMPDH2*'nin kodladığı iki *IMPDH* geni içermektedir (Natsumeda ve diğ., 1990). *IMPDH1* retina, dalak ve periferik mononükleer kan hücrelerinde baskın olmasına rağmen çoğu dokuda iki izozim çeşitli ölçüde anlatım yapmaktadır (Jain ve diğ., 2004; Bowne ve diğ., 2006). *IMPDH1* “knock-out” fareler yalnızca hafif bir retinopati sergilerken (Aherne ve diğ., 2004)

IMPDH2 anlatımı yapılmayan fareler embriyogenez esnasında ölmektedir (Gu ve diğ., 2003).

İnsan IMPDH enzimi yaklaşık 56 kDa'luk monomerlerden oluşan tetramerik bir enzimdir (Shu ve Nair, 2008). IMPDH monomerleri genellikle enzimatik aktivite için gerekli olmayan alt bölgenin ("subdomain") varlığına bağlı olarak 400-500 bakiye içermektedir. IMPDH enzimi pH 8'de optimal aktivite göstermektedir. Tüm IMPDH'lar K^+ tarafından aktive edilmektedir ve optimal aktivite için katalitik sisteinin oksidasyonunu önlemede tiol bileşenleri gerekmektedir (Magasanik ve diğ., 1957). Çoğu IMPDH monomerleri iki bölge ("domain") içermektedir (Şekil 2.4). Bu bölgeler katalitik bölge ve alt bölgedir. Katalitik bölge $(\alpha/\beta)_8$ silindirik yapılarından oluşurken, alt bölge iki tane sistationin beta sentaz ("Cystathionine beta synthase" (CBS), Bateman domainleri) bölgesinden oluşmaktadır. Alt bölge aktivite için gerekli değildir ve birkaç türde IMPDH, CBS alt bölgesini içermemektedir. Diğer $(\alpha/\beta)_8$ silindirik yapıli proteinler gibi aktif bölgenin, β -levhalarının C-uçlarındaki ilmeklerde yer aldığı bulunmuştur. İlmekler katalitik sistein bakiyeleri (Cys319) içermektedir.



Şekil 2.4 : IMPDH'nin yapısı (Hedstrom, 2009).

IMPDH enzimi nükleik asitlere bağlanmaktadır (Cornuel ve diğ., 2002). Ancak bu işlev CBS alt bölgesinde meydana gelen delesyon veya mutasyon durumunda engellenmektedir (McLean ve diğ., 2004; Mortimer ve diğ., 2005; Bowne ve diğ., 2006). Doku kültürü hücrelerinde IMPDH enzimi poliribozomlar ile birleşmekte ve alt

bölge bu etkileşime aracılık etmektedir. Bu da IMPDH'nin translasyon aşamasında düzenlenmede fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir (McLean ve diğ., 2004; Mortimer ve diğ., 2008). Bu fonksiyonunun altında yatan nedenin pürin nükleotid havuzunun kontrolü olduğu ileri sürülmektedir. Kısacası CBS alt bölgesi adenin ve guanin nükleotid havuzlarını düzenlemekte ve poliribozomlarla iş birliği yapmaktadır. CBS domainlerindeki mutasyonlar çeşitli kalıtsal hastalıklara yol açmaktadır (Kemp, 2004; Hedstrom, 2009). IMPDH'nin mayalarda , protein kinaz B (Ingley ve Hemmings, 2000) içeren proteinler, translasyon faktörleri, transkripsiyon faktörleri, glutamat dehidrogenaz (Uetz ve diğ., 2000) ve transkripsiyon düzenlenmesi, alternatif kırılma ve rRNA işlenmesinde yer alan proteinlerle ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lindstrom ve diğ., 2003; Stevens ve diğ., 2002).

Tritrichomonas foetus, *Escherichia coli* ve insan IMPDH'larının tek iplikli nükleik asitlere alt bölge aracılığıyla nanomolar afiniteyle bağlandığı görülmüştür. Her IMPDH tetramerine yaklaşık olarak 100 nükleotid bağlanmaktadır. Alt bölgede meydana gelen bir delesyon afiniteyi 10 kat azaltırken, bağlanma bölgesini ise 60 nükleotide düşürmektedir. IMPDH insan hücrelerinde nükleusta bulunmaktadır ve hem RNA hem de DNA'ya *in vivo* bağlanmaktadır. Bir başka çalışmada *Saccharomyces cerevisiae* IMPDH'nin telomerik dizilere bağlandığı bulunmuştur. Bu incelemeler IMPDH'nin RNA ve DNA metabolizmasında rolü olduğunu göstermektedir (Bowne ve diğ., 2006).

Çeşitli araştırmalar tümör baskılayıcısı olan p53'ün işlevinin IMPDH ile bağlantılı olduğunu düşündürmektedir (Liu ve diğ., 1998; Sherley, 1991). Hızlı şekilde büyüyen hücreler guanin nükleotidlerine yüksek miktarda ihtiyaç duymaktadır ve IMPDH'nin p53 aracılığıyla proliferasyonun düzenlenmesinde hız belirleyici bir faktör olduğu görülmüştür (Liu ve diğ., 1998). Hücrede IMPDH'nin inhibiyonunun etkisi, p53'ün overekspresyonunu taklit ederken, konstitütif IMPDH anlatımı büyüme baskılanmasını önlemektedir (Hedstrom, 2009). IMPDH enziminin, proliferatif hücrelerde yüksek miktarda anlatımı yapıldığı görülmektedir (Morrow ve diğ., 2012).

Weber (1983), inozin 5'-monofosfat dehidrogenaz (IMPDH) enziminin tümörlerde ve hızlı büyüyen dokularda bol miktarda anlatımı yapıldığını keşfetmiş ve bu enzimi hedef olarak ilaç tasarlanmasının temelini oluşturmuştur (Jackson ve diğ., 1975; Hedstrom, 2009).

IMPDH enziminin pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentez yolağının metabolik dallanma noktasındaki rolü, immünoşupresyon (Ratcliffe, 2006), kanser (Chen ve Pankiewicz, 2007; Olah ve diğ., 2006), antiviral (Nair ve Shu, 2007) ve antimikrobiyal kemoterapik (Shu ve Nair, 2008) ilaçların keşfinde IMPDH'ı hedef haline getirmektedir.

IMPDH spesifik inhibitörlerinin kullanımı sonrasında, hassas hücre tiplerinde bloke edilen IMPDH enziminin biyokimyasal etkisinin, hücresel guanin nükleotidi seviyesinde azalma olduğu görülmüştür. RNA ve DNA sentezinin yanı sıra membran proteinlerinin glikozilasyonu da engellenmiştir. Kısacası IMPDH enziminin inhibisyonu geri dönüşümlü antiproliferatif, antiviral, antiparazitik ve immünoşupressif etkilere sahiptir (Wu, 1994; Nimmesgern, 1999; Allison ve Eugui, 2000; Chong ve diğ., 2006; Long ve diğ., 2006).

IMPDH inhibitörlerinin bir kısmı nükleozid analoglarından oluşmaktadır. Mizoribin (Kusumi ve diğ., 1988) ve ribavirin (Streeter ve diğ., 1973) gibi nükleozid analogları IMPDH'ı yarışmalı olarak inhibe etmektedir. Yarışmasız inhibitörlere ise ilk olarak 100 yıldan daha önce tanımlanan mikofenolik asit (MPA) (Franklin ve Cook, 1969) ve tiazofurin (Cooney ve diğ., 1982) örnek verilebilir (Sintchak ve Nimmesgern, 2000).

IMPDH enzimi MPA, 6-azaurasil (6AU), tiazofurin ve ribavirin gibi antimetabolit, antimikrobiyal, antikanser ve immünoşupressif ilaçlar için önemli bir hedeftir (Shu ve Nair, 2008; Jiang ve diğ., 2010).

Günümüzde IMPDH inhibitörleri immünoşupressif kemoterapide (MPA, mizoribin) ve antiviral kemoterapide (ribavirin) kullanılmaktadır. Ayrıca tiazofurin (Tiazol) nörotoksisitesi yaygın kullanılmasını sınırlandırmasına rağmen kronik miyeloid lösemi tedavisi için kabul edilmiştir (Hedstrom, 2009). Japonya'da organ nakil redlerini önleme ve romatoid artrit, primer nefroz, lupus nefriti, dermatomyositis ve otoimmün dermatoz gibi hastalıkların tedavisinde mizoribinin kullanımı onaylanmıştır (Ishikawa, 1999; Shu ve Nair, 2008).

MPA ilk saflaştırılan antibiyotiktir, orijinal olarak bozulmuş mısırdan izole edilmiştir ve 1893'te *Bacillus anthracis*'in büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. MPA memeli IMPDH'larının etkili bir inhibitörüdür ve bu nedenle bir antibiyotik olarak

kullanılmamıştır. MPA hücre kültür modellerinde antiviral ve antikanser aktivite göstermektedir (Franklin ve diğ., 1996; Papageorgiou, 2001; Hedstrom, 2009). MPA , keşfinden yaklaşık 100 yıl sonra sodyum mikofenolat (Myfortic, Novartis) ve mikofenolat mofetil (CellCept, Roche) şeklinde ABD’de böbrek (Shaw ve diğ., 1995; Pichlmayr ve diğ., 1995) ve kalp (Kobashigawa ve diğ., 1998) nakillerinde akut organ reddinin önlenmesi için immünsupressan olarak kullanılmaktadır (Shu ve Nair, 2008).

2.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ORGANİZMALAR

2.2.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Tek hücreli ökaryotik organizmalar olan mayalar, Sümerler döneminden günümüze kadar bira, ekmek ve şarap yapımında kullanılmaktadır. Günümüzde ise ilerleyen teknolojiyle birlikte mayalar gıda teknolojisi, fermentasyon endüstrisi, biyomedikal ve biyolojik araştırmalar, sağlık endüstrisi ve çevresel teknolojiler gibi alanlarda kullanılmaktadır (Feldmann, 2009).

Saccharomyces cerevisiae (“budding yeast”) ve *Schizosaccharomyces pombe* (“fission yeast”) geniş ölçüde karakterizasyonu yapılmış ve genomları tamamen dizilenmiş ökaryotik model organizmalardır. Diğer ökaryotik organizmalara göre maya genom boyutu küçük olmasına karşın, maya genomu yüksek ökaryotların sahip olduğu özelliklerin çoğunu içermektedir. Çoğu hücresel sürecin farklı ökaryotik türler arasında korunmuş olması, mayaları moleküler biyolojide önemli model organizmalar haline getirmektedir (Lundblad ve Struhl, 2008).

Saccharomyces cerevisiae ve *Schizosaccharomyces pombe* genetik olarak çalışmaya uygundur ve genetik manipölasyonlar kolaylıkla gerçekleştirilebilir. *S. pombe* ile yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Özellikle memeli hücre biyolojisi çalışmalarında kullanılması nedeniyle mikro memeli (“micromammal”) olarak adlandırılmaktadır (Lundblad ve Struhl, 2008).

S. pombe, *S. cerevisiae* (Goffeau ve diğ., 1996), *C. elegans* (The C. elegans Sequencing Consortium, 1998), *Drosophila melanogaster* (Adams ve diğ., 2000), *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000) ve *Homo sapiens* (International

Human Genome Sequencing Consortium, 2001; Venter ve diğ., 2001)'ten sonra genom dizisi tamamlanmış altıncı ökaryotik organizmadır (Decottignies ve diğ., 2003).

S. pombe daha karmaşık yapıdaki ökaryotik hücrelerle ortak özellik gösteren, Ascomycetes özellikleriyle karakterize edilen mantarlar grubundandır (Wood ve diğ., 2002).

İlk olarak 1940'ların sonunda Urs Leupold tarafından genetik olarak karakterizasyonu yapıldı. 1950'lerde Murdoch Mitchison *S. pombe*'nin hücre bölünmesi ve hücre büyümesi çalışmaları için eşsiz bir potansiyel olduğunu ileri sürdü. 1970'lerde Mitchison ve arkadaşlarının hücre döngüsü çalışmaları ile Leupold'ün genetik yaklaşımları Paul Nurse tarafından birleştirdi ve bu başarılı birleşim Paul Nurse'e 2001 Fizyoloji veya Tıp Nobel Ödülü'nü kazandırdı. (Wood ve diğ., 2002; Egel, 2004)

S. pombe hem genetik hem de hücre biyolojisi tekniklerine uygun olması nedeniyle hücre döngüsü düzenlenmesi, eşey farklılaşması, kromozom dinamikleri ve polarize hücre büyümesi çalışmalarında kullanılan önemli bir organizmadır (Lundblad ve Struhl, 2008). Ayrıca *S.pombe* kromozomları yüksek ökaryotlara benzer şekilde büyük kompleks sentromer yapısına sahiptir (Pidoux ve diğ., 2005; Rumpf ve diğ., 2010). *S.pombe*'nin yüksek ökaryotlara ait heterolog proteinlerin (yeşil floresan proteini, insan büyüme hormonu, insan transferrini) üretimi için cazip bir konak olduğu düşünülmektedir (Giga-Hama ve Kumagai, 1999; Takegawa ve diğ., 2009; Sasaki ve diğ., 2013).

Tek hücreli *S. pombe* sadece üç kromozomdan oluşan genoma sahiptir ve genelde haploid halde bulunmaktadır (Kohli ve diğ., 1977). Silindirik şeklindeki hücre yaklaşık 3µm genişliğinde ve 10 µm uzunluğundadır. *S. pombe* ortadan ikiye bölünerek eşit büyüklükte iki yavru hücreyi meydana getirmektedir. İkiye bölünerek çoğalması nedeniyle fizyon maya ("fission yeast") olarak da adlandırılmaktadır (Klar ve Bonaduce, 2013).

S. pombe $975h^+$ (heterotallik) , $972h^-$ (heterotallik) ve $968h^{90}$ (homotallik) olmak üzere farklı eşey tiplerine sahiptir (Kohli ve diğ., 1977). $975h^+$ ve $972h^-$ yalnızca birbirleriyle eşleşip diploid hücre meydana getirebilirken $968h^{90}$ kendi kendine eşleşebilmektedir. Vejetatif büyüme gösteren hücreler normal şartlarda haploid halde bulunmaktadır.

Besin açlığında özellikle de nitrojen kaynağı eksikliğinde eğer ortamda karşı eşey tipinde birey varsa zigot meydana gelmektedir (Egel, 2004).

Schizosaccharomyces pombe genom projesi 2002 yılında tamamlandı (Wood ve diğ., 2002) ve *S. pombe* genom boyutu 13,8 Mb olarak belirlendi. Genomun rDNA dışındaki 12,57 Mb büyüklüğündeki kısmının dizisi ortaya çıkarıldı. *S. pombe*'de genom boyutunda gen delesyon koleksiyonu (Kim ve diğ., 2010) ve 100 genin delesyonuyla (Decottignies ve diğ., 2003) ilgili pilot çalışmalar bildirildi. *S. pombe* esansiyel genleri, total genlerin %26,1'ini (1260/4836) oluşturmaktadır. Bu yüzde oranı daha önceki yayınlarda tanımlanmış diğer model organizmalardan daha yüksektir. Total gen sayısı (*S. pombe* veritabanı olan PomBase'de günümüzde yaklaşık 5100 gen olarak tanımlanmaktadır) ökaryotlar arasında en az olanlardan biridir (Sasaki ve diğ., 2013).

S.pombe'nin 13,8 Mb'lık genomu kromozom I (5,7 Mb), kromozom II (4,6 Mb) ve kromozom III (3,5Mb) arasında dağılmaktadır (Smith ve diğ., 1987). 13.8 Mb'lık genomun yanısıra 20 kb'lık mitokondriyal genoma sahiptir (Lang ve diğ., 1987). *S.pombe* genlerinin %45'i intron içerir (Yoshioka ve diğ., 1997) ve yaklaşık 145 gen metazoalarla homoloji göstermektedir (Wood ve diğ., 2002). Esansiyel genler genellikle genomda tek kopyalı, geniş ölçüde korunmuş durumdadır ve intron içermektedir (Kim ve diğ., 2010).

S.pombe'nin RNAi yolağı, tekrarlı sentromer yapısı, G2/M hücre döngüsü kontrol noktası, sitokinez ve kompleks heterokromatin yapısı ve alternatif kırılma (Sabatinos ve Forsburg, 2010; Rhind ve diğ., 2011) gibi süreçlere sahip olması nedeniyle iyi bir model olduğu bildirilmektedir (Frost ve diğ., 2012).

Hücre siklusu ve kontrol noktasındaki mekanizmaları *S. pombe*'yi kanser hastalığı gelişim yolağı çalışmaları için iyi bir model organizma haline getirmektedir (Wood ve diğ., 2002). Fizyon mayası, *S.cerevisiae*'ye göre insan ile daha fazla hücresel süreç (RNAi) paylaşan önemli bir model sistem olarak kullanılmaktadır (Kawashima ve diğ., 2012).

Mayalar insan genlerinin fonksiyonlarının önemli belirleyicileridir. Maya genleri tarafından kodlanan proteinlerin en az %31'i insan proteinleri ile homoloji ortaya koyarken kalıtsal hastalıklarda rol oynayan insan genlerinin neredeyse %50'si

mayalarda homoloji göstermektedir (Hartwell, 2004). Mayalar, insanda temel hücresel süreçler ve metabolik yolların anlaşılmasında önemli rol oynamakta ve birçok hastalık geninin moleküler düzeyde analizini kolaylaştırmaktadır (Suter ve diğ., 2006).

2.2.2. *Escherichia coli* ve pFA6-KanMX4 Plazmid

E. coli yaygın bir şekilde kullanılan prokaryotik bir model organizmadır. Mikrobiyoloji ve biyoteknoloji alanlarında özellikle rekombinant DNA çalışmalarında konak organizma olarak kullanılması nedeniyle önemli bir türdür (Singleton, 1999).

E. coli genomunun DNA dizisi 1997’de tamamlandı, *E.coli*’nin 4,6 milyon baz çifti uzunluğunda halkasal bir DNA molekülüne sahip olduğu ve 4288 protein kodlayan gen içerdiği belirtildi. Ayrıca *E.coli* genomunun önemli oranda transpozabl genetik element, tekrarlı dizi ve bakteriyofaj kalıntısı içerdiği gözlemlendi (Blattner ve diğ., 1997).

E.coli rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan bir konaktır ve iyi bir şekilde karakterizasyonu yapılmıştır (Cornelis, 2000; Lee, 1996; Baneyx, 1999). *E.coli*’de rekombinant proteinlerin üretimine izin veren çeşitli protein anlatım sistemleri bulunmaktadır. Proteinlerin yüksek seviyede anlatımlarına olanak tanıyan plazmidlerin kullanımıyla endüstriyel fermentasyon süreçlerinde proteinlerin bol miktarda üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Rekombinant DNA teknolojisinin ilk yararlı uygulamalarından biri insan insülininin *E. coli*’de üretimidir (Goeddel ve diğ., 1979).

Modifiye edilmiş *E.coli* hücreleri aşı geliştirme, biyoremediasyon, biyoyakıt üretimi (butanol) (Mattam ve Yazdani, 2013) ve immobilize enzim üretimi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Cornelis, 2000). Uzun laboratuvar geçmişi ve kolay manipüle edilebilmesi nedeniyle *E. coli* endüstriyel mikrobiyoloji ve modern biyoloji mühendisliğinde önemli bir rol oynamaktadır (Lee, 1996).

Prokaryotik bir organizma olması nedeniyle *E.coli*’de protein eldesi esnasında doğru katlanmada problemler meydana gelmektedir. *E.coli* bazı büyük, kompleks (çoklu disülfid bağı içeren vb.) proteinlerin ve aktivitesi için post-translasyonel modifikasyona gereksinim duyan proteinlerin üretiminde kullanılamamasına rağmen interferonlar, interleokinler, kolonistimulan faktörler, büyüme hormonları, insülin benzeri büyüme

faktörleri ve insan serum albümini gibi proteinler bu organizmada başarılı bir şekilde üretilmektedir (Choi ve Lee, 2004; Lee, 1996).

E.coli DH5a suşu gen klonlama ve protein üretimi gibi çeşitli amaçlar için geniş ölçüde kullanılmaktadır (Jung ve diğ., 2010).

pFA6-kanMX4 plazmidi, homolog rekombinasyon aracılı PCR temelli veya klasik gen hedefleme için tasarlanmış “marker” plazmidlerinden biridir (Wach ve diğ., 1994; Wach, 1996; Wach ve diğ., 1997). 1.44 kb’lık *KanMX4* “marker” geni, *Ashyba gossypii*’nin fazla miktarda anlatımı yapılan “Thyrotroph embryonic factor” (*TEF*) geninin terminatör ve promotör bölgeleriyle (Steiner ve Phillipsen, 1994) Tn903 transpozonundan kökenlenen (Oka ve diğ., 1981) kanamisin direnç geninin (*kan^r*) açık okuma çerçevesinden oluşmaktadır.

Mantarlar ve mayalara *kanMX* transforme edildiğinde bu organizmalar “geneticin (G418)” antibiyotigine direnç kazanmaktadırlar. Bu seçici sistem ilk olarak Jimenez ve Davies (1980) tarafından tarif edildi, Hadfield ve arkadaşları (1990) tarafından geliştirildi. (Wach ve diğ., 1998)

S. cerevisiae’de G418’e direnç gösteren *kanMX* kaseti yaygın bir şekilde (Wach ve diğ., 1994) kullanılmış ve başarıya ulaşılmıştır. *S. pombe*’de de PCR temelli gen delesyonlu mutant oluşturmada *pFA6-KanMX4* plazmidi kullanılmaktadır (Bähler ve diğ., 1998; Krawchuk ve Wahls, 1999).

KanMX kaset sistemi yaygın olarak tercih edilmektedir ve kaset, plazmid kullanılarak tek kopyayla genomu integre olduğunda güçlü “geneticin” direnç fenotipi sergilemektedir. Yönlendirilmiş delesyon mutasyonlarının oluşturulmasında hedeflenen bölgenin PCR çoğaltımı kolaylıkla gerçekleştirilmektedir. *pFA6-KanMX4* plazmidinin maya genomuna homoloji göstermemesi çalışmalarda oldukça önemlidir. (Goldstein, 1999)

pFA6-KanMX4 plazmidi 3941 bp büyüklüğündedir. Kanamisin ve ampisilin direnç genleri taşımaktadır. *E.coli*’de çoğaltımına olanak sağlayan replikasyon başlama bölgesi (*ori*) de içermektedir.

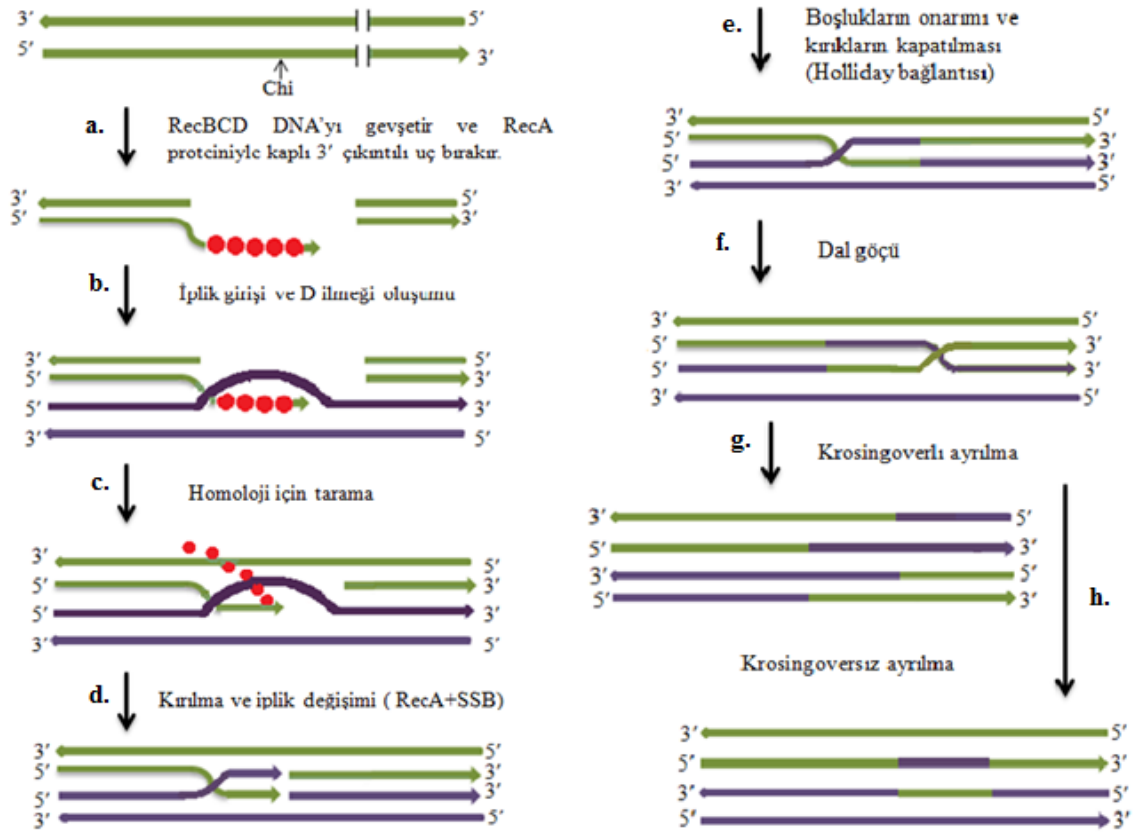
2.3. HOMOLOG REKOMBİNASYON

Mayoz bölünme, eşeyli üreme için gerekli olan kromozom sayısını yarıya indirmenin yanı sıra popülasyonda bir jenerasyondan diğerine genetik çeşitliliği arttırmaktadır. Homolog rekombinasyon süreciyle anne ve babadan gelen kromozomlar yeniden düzenlenmekte ve yavru bireyde “nonparental” kombinasyon meydana gelmektedir. Bu yeniden düzenlenme oldukça önemlidir. Çünkü bu yeni kombinasyon bazı durumlarda yavru bireye ebeveynlerinden daha fazla hayatta kalma şansı tanımaktadır (Karp, 2010).

Ayrıca homolog rekombinasyon, rekombinasyon onarımı olarak adlandırılan DNA hasarı onarımında da önemli bir rol oynamaktadır. Rekombinasyon molekül içi gerçekleşebilir ve bu durumda aynı kromozomdaki iki bölge arasında ya yer değişimi ya da DNA parçaları arasında inversiyon meydana gelebilir. Diğer yandan bimoleküler rekombinasyon iki bağımsız DNA molekülü arasındaki krosingoveri içermektedir (Karp, 2010).

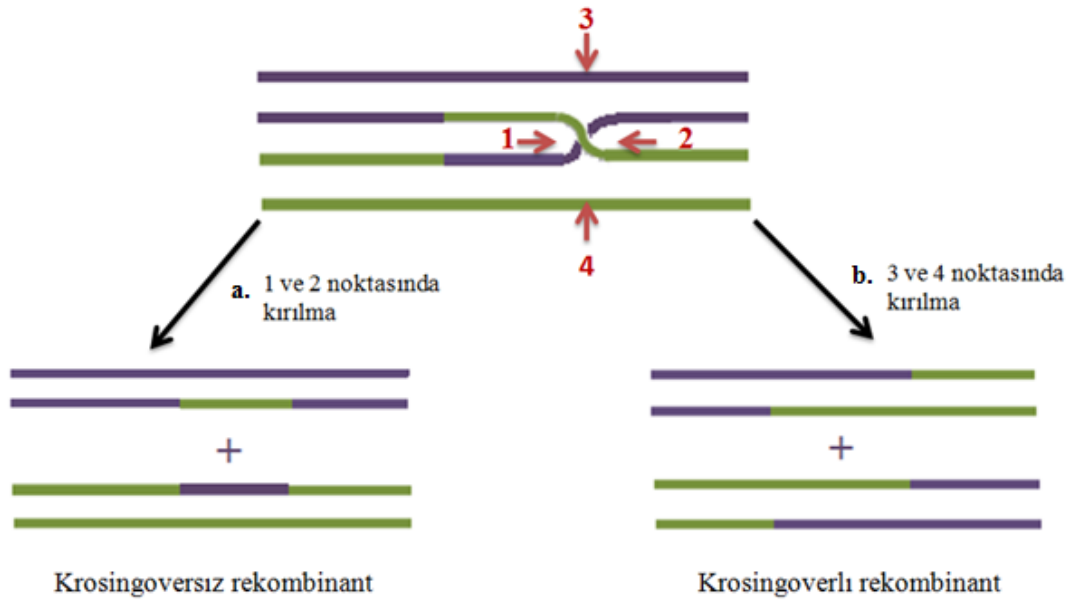
Rekombinasyon süreci homolog DNA ipliklerinden birinde iki iplik kırılmasının indüklenmesiyle başlamaktadır (Şekil 2.5). *recB*, *recC* ve *recD* genlerinin ürünü olan RecBCD proteini DNA çift iplik kırığına bağlanmakta ve DNA'yı 5'-GCTGGTGG-3' dizilerini içeren ve Chi bölgesi veya x (Chi: “Crossover Hotspot Instigator”) olarak adlandırılan diziden DNA helikaz aktivitesiyle çözmektedir. Helikaz aktivitesinin yanında RecBCD proteini, tek iplik ve çift iplik ekzonükleaz ve tek iplik endonükleaz aktivitesine sahiptir. Bu özellik RecBCD'nin, RecA proteini (*recA* geni tarafından üretilir) tarafından sarılan tek iplikli uç oluşturmaya izin vermektedir. Ayrıca RecBCD proteini RecA proteininin 3'-DNA ucuna bağlanmasına yardımcı olmaktadır. RecA proteini uç kısmın çift iplikli DNA çiftine tutunarak bölge homolojisi aramaktadır. Bu sırada D-ilmeği (displacement loop “D-loop”) oluşmaktadır. Öncelikle uç kısım homoloji gösteren bir bölge bulur. Ardında RecBCD proteininin yardımıyla D-ilmeğinde bir çentik meydana gelmektedir. Bu çentik RecA ve tek ipliğe bağlanan proteinlerin (SSB) diğer DNA'daki boşlukla eş olan yeni bir uç yaratmasına izin vermektedir. DNA ligaz Holliday bağlantısını oluşturmak için iki çentiği kapatır. Holliday bağlantısı yarım kiazma ve Chi yapısı olarak da bilinmektedir. Holliday bağlantısı eski baz çifti kırığı yönünde göç etmekte ve dal göçü olarak adlandırılan süreç içerisinde yeni bir tane daha Holliday bağlantısı oluşmaktadır. Bağlantılar daha

sonra kırılmalarla yok edilmektedir. Kırılan ipliğe bağlı olarak iki alternatif ürün oluşabilir (Şekil 2.6); Holliday bağlantısında içteki zincirler kırılırsa krosingoversız rekombinantlar, bağlantı noktasında dıştaki iplikler kırılırsa krosingoverlı rekombinantlar serbest kalmaktadır. (Weaver, 2011)



Şekil 2.5 : Homolog rekombinasyonun RecBCD yolağı (Weaver, 2011).

a. RecBCD proteini çift iplikli DNA kırığına bağlanır ve DNA helikaz aktivitesiyle DNA'yı Chi bölgesine doğru gevşeterek yönlendirir. Sonuçta RecA (kırmızı daireler) proteinlerinin kapladığı tek iplikli 3'-uç meydana getirir. b. RecA D-ilmeği oluşturarak diğer DNA çift sarmalına girişi sağlar. c. RecA proteini ipliğin alıcı çift iplikli DNA'da homoloji gösteren bölgeyi bulmasına yardım eder. İnvazyonu gerçekleştiren iplik homolog bölge ile baz eşleşmesi gerçekleştirdiğinde RecA'dan ayrılır. d. Homolog bölge bulunduğundan sonra ilmekde kırılma meydana gelir. Diğer DNA'daki tek iplikli bölgeye baz eşleşmesi meydana gelir. e. Geriye kalan boşluklar doldurulur ve kırıklar DNA ligaz tarafından birleştirilir, Holliday bağlantısı oluşur. f. Dal göçü meydana gelir. g.-h. Kırılmalarla yapı krosingoverlı rekombinant veya heterodupleks olmak üzere iki moleküle ayrılabilir.



Şekil 2.6 : Holliday bağlantısının ayrılması (Weaver, 2011).

Holliday bağlantısı numaralandırılmış oklarla gösterildiği gibi iki farklı yolla ayrılabilir. a. 1 ve 2 noktalarında kırılmayla oluşan ürün heterodupleks DNA parçası içeren dupleks DNA'dır. b. 3 ve 4 noktalarında kırılma ürünü iki parçalı çakışmayacak şekilde ekli krosingoverlı rekombinant moleküldür.

2.4. DELESYONLU MUTANTLARIN ÖNEMİ

Ökaryotik organizmaların genom boyutunda gen delesyon koleksiyonları temel biyolojide moleküler mekanizmaların araştırılması ve medikal uygulamada veya biyomühendislikte hedef alınan yolların tanımlanması için önemli imkanlar sağlamaktadır. Genom boyutunda gen delesyon koleksiyonlarının oluşturulması zordur ve RNA interference (RNAi) çoğu organizmada gen aktivitesini baskılamak için popüler bir alternatif yaklaşım sağlamaktadır. Ancak RNAi yaklaşımları gen anlatımının kısmi olarak engellenmesi gibi engellerle karşılaşmaktadır. (Kim ve diğ., 2010)

Gen delesyon koleksiyonunun varlığı yüksek ökaryotların genetik etkileşim analizleri, fenotipik analizler (Winzeler ve diğ., 1999), karşılaştırmalı genomik, gen analizleri ve ilaç etkisi belirleme taraması (Lum ve diğ., 2004) gibi daha ileri çalışmaları kolaylaştıracaktır. (Kim ve diğ., 2010)

S. pombe genom dizisi tamamlandıktan sonra ORF (açık okuma çerçevesi)'lerin PCR kaynaklı delesyonu (Bähler ve diğ., 1998) yöntemiyle *S. pombe* esansiyel genlerinin miktarını belirlemek amacıyla pilot bir gen delesyonu projesi gerçekleştirildi. (Decottignies ve diğ., 2003) Neredeyse tüm *S. pombe* genlerinde bireysel delesyon içeren heterozigot diploid suşların koleksiyonu PCR temelli teknikler kullanılarak oluşturuldu. Ancak bazı genlerin delesyonu bu metodun kullanımıyla elde edilemedi. Daha sonraki çalışmalarda hedef genin delesyonu için uzun dizi homolojisi taşıyan plazmidlere dayanan etkili bir “knock-out” tekniği kullanıldı. Bu yöntem ile önceki çalışmalarda delesyonu sağlanamayan 29 genin (*scf7*, *slu7*, *aah2*...) delesyonu gerçekleştirilmiştir. Günümüzde delesyonlu mutant koleksiyonu, *S. pombe* açık okuma çerçevesinin %99'unu kapsamaktadır. Geriye kalan kısımdaki genlerin delesyonu ya elde edilememiş ya da mutant fenotiplerin analizi belirsiz sonuçlar ortaya koymuştur. (Spirek ve diğ., 2010)

2.5. ÇALIŞMADA KULLANILAN TEKNİKLER

2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılan yöntem ile *in vitro*'da genomda DNA'nın seçilmiş bir bölgesinden milyonlarca çoğaltım mümkündür. Reaksiyon öncesi çoğaltılmak istenen nükleotid dizilerine uygun olarak tasarlanmış oligonükleotid çifti kimyasal olarak sentezlenmektedir. Bu teknik oligonükleotid dizilerinin yanında nükleotid çoğaltımını sağlayan, termofilik bir bakteriden izole edilmiş, yüksek sıcaklıklara dayanıklı özel bir DNA polimeraza gereksinim duymaktadır (Alberts ve diğ., 2007).

PCR, 1983'te Kary Mullis tarafından keşfedildi ve keşfi 1993 yılında Kary Mullis'e kimya alanında Nobel ödülünü kazandırdı. PCR'ın keşfinin biyolojik araştırmalar ve biyoteknoloji üzerine etkisi büyüktür (Karp, 2010).

2.4.2. “Knock-out” Kaseti İle Gen Delesyonu

“Knock-out” gen veya “knock-out” terimleri bir genin fonksiyonunu inaktive eden mutasyonu tanımlamaktadır. Bu mutasyonlar fonksiyonel genomu içeren modern teknikler ve klasik genetik çalışmaları için oldukça önemlidir (Sawitzke ve diğ., 2013).

“Knock-out” teknolojisi, ilk olarak *S. cerevisiae*’de geliştirilen, canlı organizmaların genomunu homolog rekombinasyon aracılı gen hedeflemeye dayalı olarak değiştiren kullanışlı bir tekniktir. Bu teknolojinin başlangıcı Hinnen ve arkadaşlarının (1978) maya geni taşıyan halkasal, replike olmayan plasmidi hücreye aktararak genoma integre olabildiğini göstermelerine dayanmaktadır (Mitrikeski, 2012).

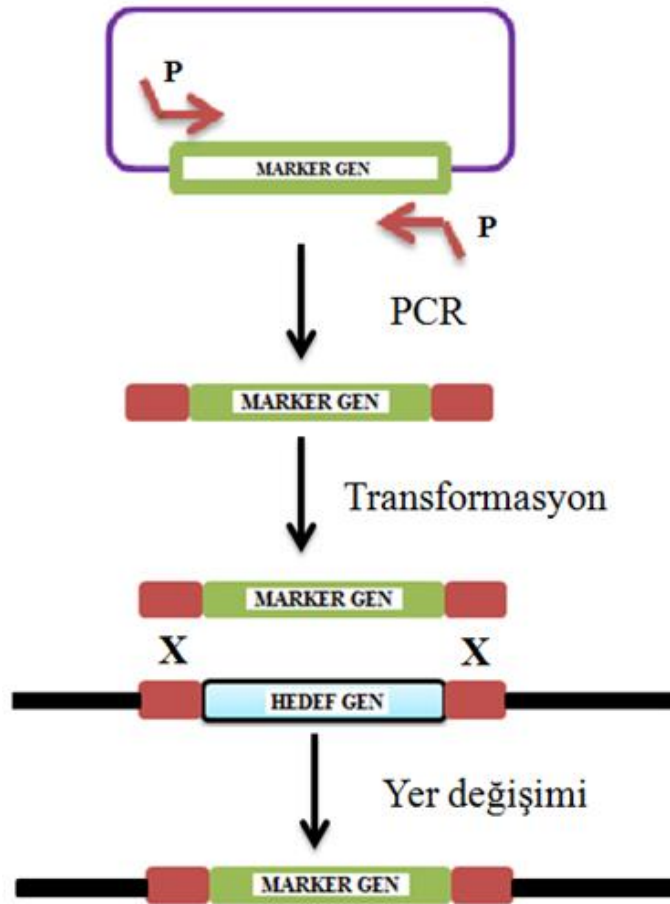
Memeli genomunda hedef bölge ile homoloji gösteren yabancı DNA arasındaki homolog rekombinasyon olasılığı 80’li yılların başında çalışılmaya başlanmıştır (Galli-Taliadoros ve diğ., 1995). Günümüz teknolojik gelişmeleri ile memeli sistemlerinde homolog rekombinasyon ile gen hedefleme sayesinde istenen herhangi bir hedef gende mutantların oluşumu mümkün hale gelmektedir (Mansour, 1990; Robertson, 1991; Zimmer, 1992; Mortensen, 2002).

Homolog rekombinasyon ile gen hedefleme teknolojisinde *in vitro*’da elde edilen dış kaynaklı DNA dizileri (plazmid, değiştirilmiş gen, kaset) istenen genetik değişime yol açan hedef diziyle rekombinasyonunun gerçekleşmesi için hücreye aktarılmaktadır. Eksik veya istenmeyen sonuçlar elde edilmesine rağmen hedef genomik dizi transforme edilen diziler tarafından ya değişikliğe uğratılmakta ya da bu dizilerle tamamen yer değiştirmektedir (Mitrikeski, 2012).

Yer değiştirme yöntemi mayada geliştirildi (Rothstein, 1983) ve daha sonra başarılı bir şekilde memeli hücrelerinde de uygulandı (Thomas ve Capecchi, 1987). Bu metoda göre doğrusal dış kaynaklı DNA hücreye aktarılmakta ve aktarılan bu dizi değiştirilmek istenen genomik diziyi hedef almaktadır. Aktarılan dış kaynaklı DNA parçalarının en önemli özelliği hedef genin yan bölgelerine homolog olan diziler taşımalarıdır. Böylece transformasyon sonrası homolog rekombinasyon aracılığıyla hedef gen seçici “marker” gen ile yer değiştirebilir (Hastings ve diğ., 1993; Mitrikeski, 2012).

Bu yaklaşımdan yola çıkılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yer değiştirme yöntemi geliştirilmiştir (Baudin ve diğ., 1993). Bu yaklaşım “marker” genle yeri değiştirilen hedef genin tamamen delesyonuna olanak vermiştir ve yalnızca ilgilenilen genin genomik dizisinin bilgisine ihtiyaç vardır (Şekil 2.8). Bu yöntemde her biri yaklaşık 60 nükleotid uzunluğunda iki PCR primeri kullanılmaktadır. Bu primerlerden her biri “marker” genin çoğaltımında kullanılmak için “marker” gene uyumluluk

gösteren 20 nükleotidlik diziye 3' ucunda içermektedir. Geriye kalan 40 nükleotidlik diziler 5' ucunda ilgilenilen genin sağ ve solunda yer alan genomik dizilere homoloji göstermektedir. Bu primer setleri kullanılarak hedefleme ve yer değiştirme amacıyla hedef genin yan dizilerine 40 baz çifti homoloji gösteren diziler arasında yerleşim gösteren seçici marker genden oluşan yer değiştirme PCR ürünü oluşturulmaktadır. Transformasyon sonrası transformantlar seçici besiyerlerinde üretilerek seçim yapılmakta ve analiz edilmektedir (Mitrikeski, 2012).



Şekil 2.7: Homolog rekombinasyon aracılı gen hedefleme (Mitrikeski, 2012).

(P: hedef gene komşu bölgelere homoloji gösteren dizi ile marker gene, uyumluluk gösteren dizileri içeren primerler, kırmızı bölgeler: hedef genin iki yanında yer alan homolog diziler)

Homolog rekombinasyonla oluşturulan yaklaşık olarak tüm mutantların seçimi hedef geni bozarak mutasyona uğratan antibiyotik direnç geninin (neomisin vb.) pozitif seçimine dayanmaktadır. Hücrelerin antibiyotik kullanarak seçimi PCR ürününü

yapısına almamış olan hücreleri büyük oranda elemektedir. Ancak üreyen hücrelerin birçoğu PCR ürününü homolog rekombinasyon yerine rastgele genomuna dahil etmektedir (Mortensen, 2002).

Günümüzde PCR ile “knock-out” teknolojisi tek hücreli ökaryotlardan başlanarak insan hücresinin de dahil olduğu memelilerle son bulan çeşitli organizmalarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Ayrıca bu teknoloji maya delesyonlu suşların tüm setini oluşturmayı amaçlayan *Saccharomyces* Genom Delesyon Projesi “*Saccharomyces* Genome Deletion Project (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)” gibi araştırma girişimlerine imkan vermektedir. Bu projenin başarısı fare gibi daha kompleks organizmalarda benzer araştırmaların önünü açmıştır (<http://www.knockoutmouse.org/>). Büyük ve uluslararası araştırma birliklerinin amacı mutantların fenotipik analiziyle bir organizmadaki tüm açık okuma çerçevelerinin “ORF (open reading frame)” spesifik fonksiyonunu belirlemektir (Mitrikeski, 2012).

Fizyon mayasında büyük ölçekli çalışmalar için şimdiye kadar etkili bir “knock-out” tekniği bulunmamaktadır. Buna rağmen uzun oligonükleotidlerin (80 bç.’lik hedef dizilere homolog) (Bähler ve diğ., 1998) kullanıldığı bir teknik pilot gen delesyon projesinde kullanılmış, diploid ırklarda 85 seçilmiş genden 20’si delesyona uğratılamamıştır (Decottignies ve diğ., 2003). Martin-Castellanos ve arkadaşları aynı yaklaşımı kullanarak mayotik olarak anlatımları arttırılmış genlerin 184’ünden 160’ını delesyona uğratmışlardır. Günümüzde Kore BIONEER Ortaklığı uzun oligonükleotid yöntemini kullanarak tüm fizyon mayası genlerinin “knock-out” edilmesi için girişimde bulunmuştur (<http://pombe.bioneer.co.kr>). Bu yöntemin düşük etkinliği, büyük ölçekli çalışmalarda optimal koşulun sağlanamadığını göstermektedir ve bu duruma rağmen uzun oligonükleotid tekniği genlerin “knock-out” edilmesi ve değiştirilmesi için yaygın bir şekilde fizyon mayasında kullanılmaktadır (Gegan ve diğ., 2006).

Bu çalışmada *Schizosaccharomyces pombe* genomunda yer alan IMPDH enziminin anlatımından sorumlu *gua1* genine uygun, iki aşamalı PCR sonucu elde edilen “knock-out” kaseti kullanılarak homolog rekombinasyon ile delesyona uğratılması amaçlandı. Bu çalışma kapsamında öncelikle *gua1* genine komşu iki yan dizi için uygun primerler (“reverse” ve “forward”) kullanılarak PCR yöntemiyle bu diziler çoğaltıldı.

Ardından bu dizilerin de reaksiyonda yer aldığı kanamisin direnç “marker” genini içeren “knock-out” kasetinin oluşturulması için kanamisin geni ve komşu dizilere homoloji gösteren primerler kullanılarak ikinci aşama PCR gerçekleştirildi. “Knockout” kaseti elde edildikten sonra kasetin nükleotid dizi analiziyle kontrolü yapıldı. Doğruluğu onaylanan kaset *S. pombe* 972h⁻ yabani ırk, *ura4h⁻* mutant ırk ve diploid ırka aktarıldı. Transformasyon sonrası üreyen kolonilerin uygun seçici besiyerlerine ekimi yapıldı ve kasetin istenen bölgeye yerleşip yerleşmediğini anlamak için koloni PCR uygulandı.

2.4.3. Biyoinformatik ve Dizi Analizi

Biyoinformatik, bilgisayar ve biyoistatistik ile biyokimya, hücre biyolojisi, gelişim biyolojisi, genetik, genomik ve fizyoloji gibi biyoloji ve biyomedikal bilimleri bir araya getiren disiplinler arası bir alandır. Biyoinformatik 1970’lerde DNA dizileme teknolojisinin gelişiminden kısa bir süre sonra önemli bir disiplin olarak ortaya çıkmıştır. Biyoinformatiğin en önemli hedefi, biyolojik deneyler ve gözlemsel çalışmalardan elde edilen verilerin işlenmesini, analizini ve yorumlanmasını kolaylaştırmaktır. Tüm genom dizileme projeleri gibi araştırma çalışmalarından elde edilen bilgilerin yorumlanması için duyulan gereksinim NCBI (National Center for Biotechnology Information)’ın kurulmasını teşvik etmiştir (Moore, 2007).

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dizi benzerliği arayan bir programdır. Nükleotid veya protein veritabanlarıyla nükleotid veya protein sorgularının tüm kombinasyonlarını karşılaştıran çeşitli BLAST tipleri bulunmaktadır (McGinnis ve Madden, 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA

Çalışmada mantarların Ascomycetes sınıfında yer alan tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe* Linder str. *Liquefaciens*'in haploid yabani (972h-) ırk, urasil geni (*ura4h*⁻) mutant ırk ve diploid ırk kullanıldı. Kullanılan ırkların özellikleri Tablo 3.1'de verildi.

pFA6-KanMX4 plazmidi içeren *E.coli DH5α* suşu kullanıldı. *E.coli DH5α* ırkının özellikleri Tablo 3.1'de, *pFA6-KanMX4* plazmid haritası Şekil 3.1'de verildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *S.pombe* ve *E. coli* ırklarının özellikleri.

İrklar	Özellikleri
<i>S.pombe</i> 972h ⁻	Yabani ırk
<i>S. pombe</i> diploid	<i>mei-B102/972h⁻</i> mayoz bölünme kusurlu
<i>S. pombe</i> <i>ura4-D18h⁻</i>	Orotidin-5'-fosfat (OMP) dekarboksilaz geni delesyonlu
<i>E. coli</i> DH5α	F/endA1hsdR17(r _k m _k ⁺)supE44thi ⁻ 1recA1 gyrA(nal ^r)relA1Δ(lacZYA ⁻ arg FU169deoR[ø80 dLacΔ(LacZ)M15]

3.2. BESİYERLERİ

S.pombe hücrelerinin üretiminde Gutz ve ark.(1974)'nın önerdiği besiyerleri kullanıldı. Besiyerlerinin kullanım amaçları ve formülleri aşağıda yer almaktadır (Tablo 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9).

- Üretim amaçlı kullanılan besiyerleri :

Tablo 3.2 : “Luria-Bertani” (LB) besiyeri içeriği (*E.coli* üretimi).

LB (200 ml)	
Tryptone	2 g
Maya ekstresi (Yeast Extract)	1 g
Sodyum klorür	2 g
Distile su	200 ml

LB besiyeri hazırlamak için Tablo 3.2’de verilen bileşenler distile suda çözdürüldü. LB besiyeri için gereken pH 7.2 olmalıdır. 1N NaOH kullanılarak pH ayarlandı ve besiyeri uygun koşullarda steril edildi. *pFA6-KanMX4* plazmidi içeren *E.coli* hücrelerinin seçimi

için 50 mg/l olacak şekilde ampicilin antibiyotiği sterilizasyon sonrası besiyerine ilave edildi.

Tablo 3.3 : “Yeast Extract Agar” (YEA) besiyeri içeriği.

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

YEA besiyeri hazırlamak için Tablo 3.3’te belirtilen bileşenler uygun miktarlarda bir araya getirildi ve besiyeri sterilizasyon sonrası cam tüplere dökülerek eğri besiyeri hazırlandı.

“Yeast Extract with Supplements” zenginleştirilmiş sıvı besiyeri (YES) (200 ml) hazırlamak için YEA besiyeri bileşenleri distile su içinde çözdürüldü. Sterilizasyon sonrası her biri 50 mg/l olacak şekilde besiyerine adenin, histidin, lösin, lizin, urasil ve guanin ilave edildi. 100 ml besiyeri için 0,65 ml 2N fosforik asit (H_3PO_4) eklendi. Son olarak besiyeri pH’sı 5.9’a ayarlandı. Sıvı besiyeri hazırlanırken bileşenlere agar eklenmedi.

Tablo 3.4 : “Yeast Nitrogen Base” Besiyeri (YNB) besiyeri içeriği.

YNB (200ml)	
Yeast Nitrogen Base (amino asit içermeyen)	0,34 g
Amonyum sülfat ($(NH_4)_2SO_4$)	1 g
Glukoz	1 g
Distile su	200 ml

YNB besiyeri hazırlamak Tablo 3.4’te verilen bileşenler bir araya getirildi ve besiyeri steril edildi. YNBA besiyeri hazırlamak için bileşenlere 4 g agar (200 ml için) ilave edildi. Steril cam tüplere dökülerek eğri besiyeri hazırlandı.

- Seçici besiyerleri :

Tablo 3.5 : “Minimal Medium Agar” (MMA) besiyeri içeriği.

MMA (1L)	
Stok A2	100 ml
Stok B1	1 ml
Stok B2	1 ml
Glukoz	10 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1 g
Agar	20 g
Distile su	900 ml

Tablo 3.6 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon A1.

Stok A1	
H ₃ BO ₄	50 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	4 mg
KI	10 mg
FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	53 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	19,5 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	40 mg
Distile su	100 ml

Tablo 3.7 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon A2.

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

Tablo 3.8 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon B1.

Stok B1	
Kalsiyum pantotenat	100 mg
Nikotinik asit	1g
Mezoinositol	1g
Distile su	100 ml

Tablo 3.9 : MMA besiyeri içeriğindeki stok solüsyon B2.

Stok B2	
Biotin	1 mg
%50 etanol	100 ml

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

“Geneticin” (G418 Disulfate salt-Sigma) içeren YEA besiyeri : YEA besiyeri bileşenleri uygun miktarlarda distile suda çözdürüldü. Hazırlanan besiyeri otoklavlandıktan sonra

steril petrilere dökülmeden önce 50-55°C'ye kadar soğutularak son konsantrasyon 200 mg/l olacak şekilde YEA besiyerine “geneticin” antibiyotiği ilave edildi.

Phloxin B (magdala kırmızısı) ve guanin içeren YEA besiyeri : Yukarıdaki prosedürlere göre hazırlanmış olan maya ekstreli katı besiyerine Phloxin B (magdala kırmızısı) adlı boya son konsantrasyon 20 mg/l olacak şekilde besiyerine ilave edildi. Ardından son konsantrasyon 50 mg/l olacak şekilde guanin eklendi.

- Haploidizasyon besiyeri:

m-fluorofenilalanin ve guanin içeren MMA besiyeri: MMA besiyeri yukarıdaki prosedüre göre hazırlanıp, otoklavla sterilizasyonun ardından son konsantrasyon 500 mg/l olacak şekilde m-fluorofenilalanin ve guanin (50 mg/l) ilave edilerek steril cam tüplere döküldü ve eğri besiyeri hazırlandı.

Hazırlanan tüm besiyeri ve solüsyonlar 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

3.3. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

3.3.1. *S. pombe* Irklarının Üretimi ve Saklanması

Çalışmada kullanılan 972h⁻, ura4h⁻ ve diploid ırklar +4°C'de silika jel (çap:0.2-0.5mm) içerisinde saklanan stoklardan alınarak YEA besiyeri içeren petrilere ekildi. 2 gün sonrasında elde edilen kolonilerden azaltma ekim yapıldı ve 2 gün sonra tek tek koloniler elde edildi. Bir koloni seçilerek eğri YEA besiyerine ekildi ve 30°C'de 2 gün bekletilerek tek koloninin çoğaltımı yapıldı. *Ura4h⁻* mutantlarının genotipleri MMA besiyeri ve urasil içeren MMA besiyerinde kontrol edildi. Tek koloniden çoğaltılan kültürler eğri YEA besiyerlerine ekilerek çalışma boyunca +4°C'de bekletildi. Hücrelerin genotip kontrolleri belirli aralıklarla yapıldı.

3.3.2. Plazmid Taşıyan *E. coli* Irklarının Üretimi ve Saklanması

E.coli pFA6-KanMX4 plazmidi içeren *DH5α* suşu gliserol stoklardan alınarak 50 mg/l olacak şekilde ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekildi, 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde bir gece üremeye bırakıldı.

3.4. *Escherichia coli*'den *pFA6-KanMX4* PLAZMİDİ İZOLASYONU VE KONTROLÜ

pFA6-KanMX4 plazmidi taşıyan *E.coli DH5α* suşu, 50 mg/l ampisilin içeren 5ml LB besiyerinde bir gece boyunca 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde üretildi. *E.coli* hücreleri üretildikten sonra *pFA6-KanMX4* plazmidinin izolasyonu "DSBIO Eco Friendly Plasmid Miniprep Kit" ile firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi.

3.4.1. *Escherichia coli*'den *pFA6-KanMX4* Plazmidi İzolasyonu

5 ml ampisilinli LB besiyerinde bir gece boyu üretilen *pFA6-KanMX4* plazmidi taşıyan *E.coli DH5α* suşundan ($1-2 \times 10^9$ h/ml) 2 ml alınan kültürler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası pellet RNaz A içeren 100 µl "Solüsyon I" ile süspanse edildi ve 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra hücrelere 250 µl "Solüsyon II" eklendi ve tüp 5 defa tersyüz edilerek 1-2 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Üzerine 250 µl "Solüsyon III" ilave edildi ve homojen dağılım gerçekleştirilene kadar tüp altüst edilerek karıştırıldı. 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjleme yapıldı. Süpernatant 2 ml'lik filtreli yıkama kolonuna alındı ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt tüpe geçen sıvı atıldı ve kolona etanol içeren 500 µl "Wash Buffer Q" ilave edildi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekleme sonrası 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendi. Alt sıvı atılarak kolona etanol içeren 500 µl "Wash Buffer W" ilave edildi ve 12.000'de 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Alt sıvı atıldıktan sonra kalıntı solüsyonun uzaklaştırılması için tekrar 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüjleme yapıldı. Santrifüj sonrası kolon steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı ve üzerine 50 µl "Eluent Buffer" eklenerek 2 dakika oda ısısında bekletmenin ardından 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Alta geçen sıvıda bulunan saf plazmid DNA'sı çalışma boyunca -20°C'de saklandı.

3.4.2. *pFA6-KanMX4* Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kesimi

İzole edilen plazmidin *pFA6-KanMX4* plazmidi olduğunu doğrulamak amacıyla EcoRI (Fermentas) ve SalI (Fermentas) restriksiyon endonükleazlarıyla tekli ve ikili kesim gerçekleştirildi. İki enziminde aktivite gösterdiği önerilen tampon kullanıldı. Kesim reaksiyonu Tablo 3.10'da belirtildiği gibi gerçekleştirildi. Bileşenler karıştırıldıktan

sonra örnekler 37°C’de su banyosunda 1 saat boyunca bekletildi. Tekli kesim yapılırken hazırlanan tüpe enzimlerden biri 1 µl konuldu. Her iki enzim içinde farklı tüpler hazırlandı. İkili kesimin gerçekleştirildiği tüplere ise enzimlerin her biri 1 µl olacak şekilde birlikte ilave edilerek son hacim 20 µl olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

Tablo 3.10 : EcoRI ve SalI restriksiyon endonükleazlarıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
Plazmid DNA’sı	1 µl
Enzim(EcoRI/SalI) (EcoRI+SalI)	1 µl (1+1 µl)
Tampon (10x Buffer O)	2 µl
Distile su	16 µl (15 µl)
Total hacim	20 µl

3.5. *Schizosaccharomyces pombe*’den GENOMİK DNA İZOLASYONU

Petride azaltma ekim yapılarak elde edilen 972h⁻ kolonilerinden biri seçilerek eğri YEA besiyerine ekildi ve 30°C’de 2 gün boyunca bekletildi. Daha sonra üreyen *S. pombe* hücreleri 10 ml YEL besiyerine ekildi. Bir gece boyunca 30°C’de 180 rpm’de çalkalamalı etüvde üretilen hücre kültüründen ertesi gün 50 ml YEL besiyerine 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ekilerek üreyen *S. pombe* hücrelerinden genomik DNA izolasyonu yapıldı. *S. pombe* genomik DNA izolasyonu “DSBIO Quick Yeast Genomic DNA Extraction Kit” ile gerçekleştirildi. Genomik DNA izolasyonu esnasında hücre parçalama aşamasında firmanın önerdiği koşullara ilave olarak bazı değişiklikler yapıldı.

50 ml YEL besiyerinde üretilen hücreler (~10⁷ hücre/ml) 10 dakika boyunca 7000 rpm’de çöktürüldü. Çöktürülen hücrelere 200 µl kitte yer alan “Solution DS” eklenerek steril 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpünün 0,5 çizgisine kadar cam bocuk (çap: 0,45-0,50 mm) ve 2 adet metal bilye konuldu. Cam boncukların üzerine 200 µl “Solution DS” ile süspanse edilmiş hücreler ilave edildikten sonra “Sartorius Mikro-Dismembrator S” marka hücre parçalayıcısında 3000 rpm’de 1 dakika boyunca parçalama gerçekleştirildi. Hücreleri parçalama işlemi belirli aralıklarla buzda bekletilerek 5 tekrarlı yapıldı.

Daha sonra mikrosantrifüj tüpünün altı kızıl aleve kadar ısıtılmış iğne ile delindi ve mikrosantrifüj tüpü, sıvı fazın geçirileceği yeni mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek “spin” yapıldı. Böylece sıvı fazın alt mikrosantrifüj tüpüne geçmesi sağlandı. Alt sıvı 8.000 rpm’de 3 dakika boyunca santrifüj edilerek hücre kalıntıları çöktürüldü ve süpernatant steril bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre içeriğine 4 µl RNazA (100 mg/ml) eklenip oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Ardından 20 µl Proteinaz K (10 mg/ml) ve 220 µl “Solution MS” ilave edildi ve tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Enzim (Proteinaz K) aktivitesi için 65°C’de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonrası örneğe 220 µl %99’luk etanol eklendi. Örnek filtreli kolona alınıp 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alta geçen sıvı atıldı. Kolona 500 µl “Wash Buffer PS” eklenerek 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve alt sıvı uzaklaştırıldı. 500 µl “Wash Buffer PE” ilave edilerek 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Kolona 500 µl “Wash Buffer PS” eklenerek 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlendi ve alta geçen sıvı atıldı. Kolon membranını kurutmak için örnek 12.000 rpm’de 3 dakika santrifüjlendi. Kolon yeni bir steril mikrosantrifüj tüpüne alınarak 30 µl “Eluent Buffer AE” membrana ilave edildi. 2 dakika oda sıcaklığında bekletilerek 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüjlendi. Kolondan alta geçen sıvıdan elde edilen genomik DNA -20°C’de saklandı.

3.6. DNA MİKTARI VE SAFLIĞININ ÖLÇÜMÜ

İzole edilen *S.pombe* genom DNA’sı ve *pFA6-KanMX4* plazmidinin miktar ve saflık kontrolleri “Nanodrop 2000c” adlı cihazda ölçülerek yapıldı. Öncelikle genom DNA’sı ve plazmidin içinde çözündürüldüğü solüsyon 1,5 µl olacak şekilde “blank” olarak cihaza okutulduktan sonra örneklerden 1,5 µl alınarak saflık ve miktar ölçümleri yapıldı.

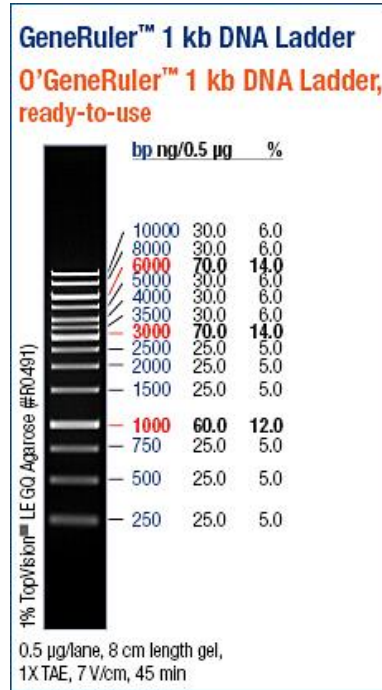
3.7. AGARÖZ JEL HAZIRLANIŞI VE ELEKTROFOREZ

İzole edilen *S. pombe* genom DNA’sının ve *pFA6-KanMX4* plazmidinin miktar ve saflığının nanodrop ile kontrolünün ardından %1’lik (w/v) agaroz jelde de kontrolleri gerçekleştirildi.

%1’lik (w/v) agaroz jel hazırlamak için Tablo 3.11’de belirtildiği şekilde hazırlanan 10X TAE tamponunun sulandırılmasıyla hazırlanan 40 ml 1X TAE tamponuna 0,40 g agaroz (Sigma-Aldrich Agarose, Type II) eklenerek mikrodalga fırında ~2 dakika

eritildi. Bir süre oda sıcaklığında bekletilerek ~50-55°C'ye gelen agaroz jele 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel daha önceden hazırlanmış ve tarak yerleştirilmiş yatay elektroforez kasetine yavaşça dökülerek oda sıcaklığında 25-30 dakika katılaşmaya bırakıldı.

Katılaştıran jel 1XTAE ile dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir DNA örneğinden (*S. pombe* genomu, *pFA6* plazmidi) 5 µl alınarak 1 µl 6X yükleme tamponu (Fermentas) ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi. Elektroforezde marker olarak “GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)” kullanıldı (Şekil 3.2.). Jel 70 voltta (10 V/cm) 45 dakika yürütüldü. 302 nm dalga boyunda jel görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.



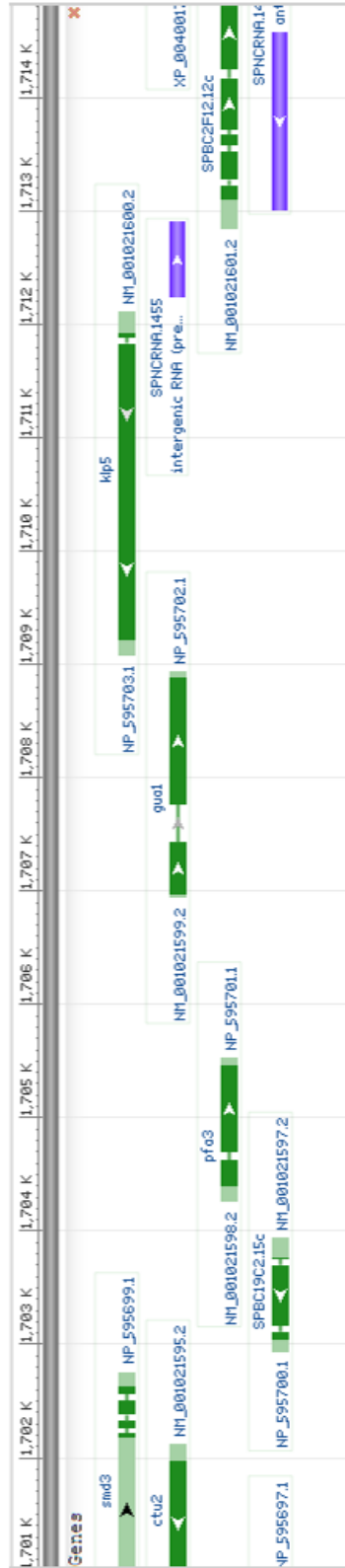
Şekil 3.2 : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan “DNA Ladder”.

Tablo 3.11 : Agaroz Jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

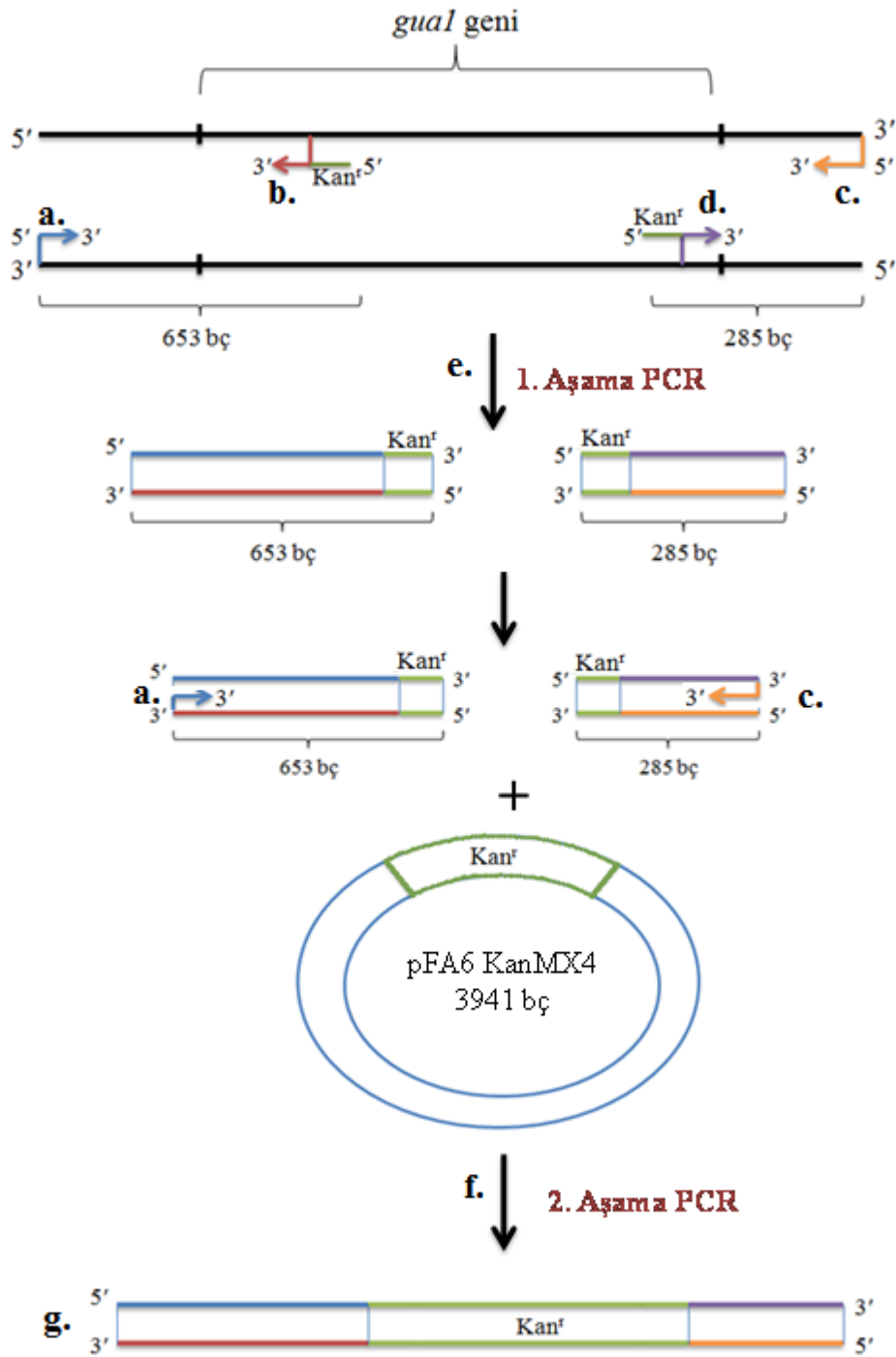
Çözelti	İçerik
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) Tamponu	400 mM Tris , %1.2 glasiyel asetik asit, 10 mM EDTA (pH:8.0)
6X Yükleme Tamponu	10 mM Tris-HCl (pH:7.6) , %0,03 bromofenol mavisi, %0,03 ksilen siyanol FF,% 60 gliserol, 60 mM EDTA

3.8. “KNOCK-OUT” KASETİNİN OLUŞTURULMASI

“Knock-out” kaseti oluşturulurken öncelikle hedef gen olan *gua1* geninin (Şekil 3.3) promotör ve terminatör dizilerini içerecek şekilde *gua1* genine komşu diziler uygun primerler yardımıyla çoğaltıldı. Bu primerlerden ikisi “marker gen” olan kanamisin direnç genine (*S. pombe*’de “geneticin” direnç geni) homoloji gösteren tamamlayıcı diziler içermektedir. Bu özellikten yola çıkılarak kanamisin direnç genini taşıyan *pFA6-KanMX4* plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı ve *gua1* geninin promotör ve terminatör bölgelerini kapsayacak şekilde genin komşu bölgelerine tamamlayıcı dizileri de içeren ikinci bir PCR gerçekleştirildi. Sonuç olarak *gua1* genine komşu dizilere uçlarda tamamlayıcı olan, kanamisin direnç genini taşıyan “knock-out” kaseti oluşturuldu (Şekil 3.4).



Şekil 3.3 : *S.pombe* 2. kromozomunda *gua1* geninin yerleşimi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2540315>).



Şekil 3.4 : "Knock-out" kasetinin oluşturulması.

(a.: upstream-outside primeri, b.: "upstream-inside" primeri, c.: "downstream-outside" primeri, d.: "downstream-inside" primeri, e.: *S.pombe* genomu ve primerlerle ilk aşama PCR sonucu 653 ve 285 bç'lik dizilerin oluşumu, f.: 653 ve 285 bç'lik diziler, a ve c primerleriyle *pFA6-KanMX4* plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı ikinci aşama PCR g.: "Knock-out" için kullanılan PCR ürünü kaset)

3.8.1. Primer Tasarımı

S.pombe'de 2. kromozom üzerindeki *gua1* geninin aşağı ve yukarı bölgesinde yer alan dizilerin çoğaltılmasını sağlayan primer dizileri oluşturuldu. Bu diziler http://mendel.imp.ac.at/Pombe_deletion/ veritabanındaki bilgilerden yola çıkılarak *gua1* genine ait dizilerin yanı sıra kaset yapısında yer alan kanamisin genine ait dizileri de içerecek şekilde tasarlandı (Tablo 3.12).

Tablo 3.12 : Kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.

	“Outside” Primer	“Inside” Primer	Ürün Boyutu (bç)
“Upstream” Primerleri	tgcaagcaaggaaccatcatcactgg (a)	*ttaacccggggatccgtcgacttaggccg cttgggggtgtg (b)	653
“Downstream” Primerleri	ccgaagactcgacaaagcctcag (c)	*atgaatcggccaacgcgcggtgcattacg aacgaattgtgcaag (d)	285

* Kanamisin genine homoloji gösteren diziler

3.8.2. PCR ile *gua1* Geni Kontrol Dizileri ile *gua1* Geninin Yanında Yer Alan 653 ve 285 bç’lik Dizilerin Çoğaltılması

Gua1 geninin yukarı kısmındaki 653 baz çiftlik bölgenin çoğaltılması için “a primeri” ile “b primeri” kullanıldı. *Gua1* geninin aşağı kısmındaki 285 bç’lik bölgenin çoğaltımında ise “c primeri” ve “d primeri” kullanıldı. İki farklı PCR reaksiyonuyla 653 ve 285 bç’lik *gua1* genine komşu dizilere ait ürünler çoğaltıldı. Reaksiyonda “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” enzimi ve kalıp olarak *S.pombe* 972h⁻ ırkı genom DNA’sı kullanıldı. Tablo 3.13’de verilen bileşenler 0,2 ml’lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve Tablo 3.14’de verilen koşullarda gradient PCR “Bio-RAD T100 Thermal Cycler”adlı cihaz ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.13 : Birinci aşama PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon
Reaksiyon tamponu (5X) (+MgCl ₂)	4	1 X
2 mM dNTP	2	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1	1,25 mM
DMSO (%100)	0,6	%3
Forward primer (10 pmol/µl)	0,5	0,25 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0,5	0,25 pmol/µl
Kalıp (100 ng/µl)	1	5 ng/µl
Enzim (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
Distile Su	10,2	-
Toplam	20	-

Tablo 3.14 : Birinci aşama PCR döngüleri.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	30 sn.	1
Denatürasyon	98	10 sn.	
Bağlanma	*	30 sn.	35
Uzama	72	30 sn.	
Son Uzama	72	5 dk.	1

*Bağlanma Sıcaklığı, 653 bç'lik dizi için 62°C iken 285 bç'lik dizi için 53°C'dir.

3.8.3. 653 ve 285 bç'lik PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

PCR ürününü saflaştırmada “Roche High Pure PCR Product Purification Kit” kullanıldı. Saflaştırma işlemi firmanın önerdiği koşullar takip edilerek gerçekleştirildi. Saflaştırılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde kontrol edildi. Örnekten 5 µl, yükleme tamponundan 1 µl karıştırılarak kuyucuklara yükleme yapıldı. “Marker” olarak GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas) kullanıldı ve 55 voltta 30 dakika yürütüldü ve “Ultraviyole (UV)” ışıktaki 302 nm'de bantlar gözlemlendi. Jelde kontrol sonrasında ürünlerin miktarları

“Nanodrop 2000c” adlı cihaz ile ölçüldü. Örnekler ikinci PCR aşamasına kadar -20°C’de saklandı.

3.8.4. “Knock-out” Kasetinin Oluşturulması

“Knock-out” kaseti ikinci aşama PCR’da gerçekleştirildi. “a primeri” ve “c primeri”nin yanı sıra ikinci aşama PCR bileşenlerine 653 bp ve 285 bp’lik diziler de ilave edildi. Ayrıca *pFA6-KanMX4* plazmidi kalıp olarak kullanıldı. Tablo 3.15’te verilen bileşenler 0,2 ml’lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve Tablo 3.16’da reaksiyon koşulları verildi. Reaksiyon sonucu oluşan ürünlerin kontrolü için 5µl PCR ürünü, 1 µl yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara yüklenen örnekler %1’lik agaroz jelde 70 voltta 45 dakika yürütüldü.

Tablo 3.15 : İkinci aşama PCR bileşenleri.

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon
Reaksiyon tamponu (5X)	4	1 X
2 mM dNTP	2	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1	1,25 mM
DMSO (%100)	0,6	% 3
Forward primer (10 pmol/µl)	0,4	0,2 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0,4	0,2 pmol/µl
653 bp	0,2	
285 bp	0,3	
Kalıp (<i>pFA6-KanMX4</i>)	0,3	
Enzim	0,2	0,05 U/µl
Distile su	10,6	-
Toplam	20	-

Tablo 3.16 : İkinci aşama PCR döngüleri.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	30 sn.	1
Denatürasyon	98	10 sn.	35
Bağlanma	63	30 sn.	
Uzama	72	2 dk.	
Son Uzama	72	10 dk.	1

3.8.5. “Knock-out” Kasetinin Agaroz Jelden Geri Kazanımı ve Saflaştırılması

PCR ürünlerinin jelden geri kazanılması amacıyla daha büyük kuyucuklara sahip fakat daha ince bir jel hazırlandı. 70 ml 1XTAE tamponuna 0,56 g agaroz eklenerek ~2 dakika mikrodalga fırında eritildi. ~50-55°C’ye kadar soğutulduktan sonra agaroz jele 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve geniş bir elektroforez kasedine yavaşça döküldü, oda sıcaklığında 25-30 dakika jelin katılaşması beklendi.

Jel, 1XTAE içeren tanka alındı. “Knock-out” kasetini içeren 20 µ’lik 10XPCR örneği, her biri 4 µl 6X yükleme tamponuyla karıştırılarak büyük kuyucuklara ~40 µl olacak şekilde yükleme yapıldı, 1 kb’lik “marker” kullanıldı. 70 voltta 45 dakika elektroforez tankında yürütüldü. UV altında “knock-out” kasetinin boyutundaki geri kazanılmak istenen bant jelden bisturi yardımıyla kesilerek 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Jelden geri kazanım “Roche High Pure PCR Product Purification Kit” ile bazı değişiklikler yapılarak firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi.

Her PCR ürününü içeren jelin bulunduğu mikrosantrifüj tüpüne 500 µl “Binding Buffer” eklendi. Bu aşamada ortamın pH’sının 7’nin üzerinde olması gereklidir. “Binding Buffer” ilavesinden sonra örnekler jelin erimesi için 10 dakika 55°C’de su banyosunda bekletildi. Belirli aralıklarla tüpler ters yüz edilerek karıştırıldı. Jel tamamen eridikten sonra örnekler filtreli tüpe alındı ve 1 dakika 12,000 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alt kısma geçen sıvı atıldı. Filtreli tüpe 500 µl “Wash Buffer” eklendi ve 1 dakika 12,000 rpm’de santrifüjlendi. Alt sıvı atılarak 200 µl “Wash Buffer” eklendi ve 1 dakika 12,000 rpm’de santrifüj edildi. Alt sıvı atıldıktan sonra filtreli tüp yeni steril bir 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne alındı, üzerine 30 µl “Elution Buffer” eklendi, 1 dakika oda ısısında bekledikten sonra 12,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Jelde kontrol edilen PCR ürünü -20°C’de saklandı.

3.8.6. “Knock-out” Kasetinin Nükleotid Dizi Analizi

Dizi analizi Medsantek firmasından hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi. Bu amaçla firmanın önerdiği koşullarda, Bölüm 3.8.5’te elde edilen kaset 45 ng/μl konsantrasyonda 10 μl, “knock-out” kaseti “upstream-outside” primeri (a primeri) ve kasetin ortasında yer alan kanamisin genine uygun olarak tasarlanmış geri okuma primeri (K1) (Tablo 3.17) konsantrasyonları 10 pmol/μl olacak şekilde iki yönlü dizilemeye gönderildi. Sonuçların beklenen sonuçla benzerliğini karşılaştırmak için “The National Center for Biotechnology Information” (NCBI)’da “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) analizi yapıldı.

Tablo 3.17 : “Knock-out” kaseti nükleotid dizi analizinde kullanılan primerler.

Primer Adı	Primer Dizisi
“Upstream-outside” primeri	tgacagcaaggaaaccatctactgg
K1 primeri	ttgcccgacattatcgcgag

3.9. “KNOCK-OUT” KASETİNİN *Schizosaccharomyces pombe*’ye TRANSFORMASYONU

Schizosaccharomyces pombe 972h⁻, *ura4h⁻* ve diploid ırklara “knock-out” kasetinin transformasyonu kimyasal bir yöntem olan lityum asetat yöntemiyle gerçekleştirildi (Gegan ve diğ., 2006). Transformasyon aşamasında kullanılan çözeltiler Tablo 3.18’de gösterildiği oranlarda hazırlandı ve 121°C’de 1,2 atm basınçta 20 dakika boyunca otoklavlanarak steril edildi.

Tablo 3.18 : Transformasyonda kullanılan çözeltiler.

Çözelti	İçerik
LiAc solüsyonu	0,1 M LiAc, 1X TE (pH 7,5)
LiAc-PEG solüsyonu	0,1 M LiAc , %40 PEG 3350, 1X TE (pH 7)

Eğri YEA besiyerinde tek koloniden çoğaltılan *972h⁻*, *ura4h⁻* ve diploid *S.pombe* hücreleri 10 ml YES sıvı besiyerine ekimi yapılarak 180 rpm'de 32°C'de çalkalamalı etüvde bir gün boyunca üretildi. Ertesi gün 50 ml YES sıvı besiyeri içeren erlene, üç ayrı kültürden 10⁶ hücre/ml olacak şekilde ekim yapıldı. 180 rpm'de 32°C'de gece boyunca çalkalamalı etüvde üretildi. Bu kültürlerden 3 ml alınarak 100 ml'lik YES besiyerine ekildi ve 4-4,5 saat boyunca 180 rpm'de 32°C'de çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı. Bu süre sonunda hücreler 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve çöken hücrelerin üzerine 20 ml lityum asetat (LiAc) eklendi. 2500 rpm'de 3 dakika santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve bu işlem iki kez tekrarlandı. Çökelti üzerine 2 ml LiAc eklenerek hücre süspansiyonları 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 30 dakika boyunca 32°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücre süspansiyonlarından 150 µl alınarak yeni steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 150 µl'lik hücre süspansiyonu üzerine "knock-out" kaseti ilave edilerek karıştırıldı. Kontrol grubuna bu aşamada dışarıdan DNA eklenmedi. *Ura4h⁻* mutantlarına ise kasetin yanında kontrol amaçlı urasil geni taşıyan *pREP42* plazmid, 375 µl lityum asetat-polietilen glikol (LiAc-PEG) ve 2 µl Salmon Sperm DNA (10mg/ml) eklenerek karıştırıldı. 45 dakika boyunca 32°C'de bekletildikten sonra ısı şoku için 5 dakika 46°C'de bırakıldı. Daha sonra 10 dakika oda ısısında bekletilen hücrelere 5000 rpm'de 1 dakika santrifüjleme yapıldı, süpernatant atıldı. Hücreler 100 µl YES besiyeri ile resüspanse edildi ve YES besiyeri ile 1 ml'ye tamamlandı. 1 ml'lik YES besiyeri içerisindeki hücreler gece boyu 180 rpm'de 32°C çalkalamalı etüvde bekletildi.

3.9.1. Transformant Kolonilerin Seçilmesi

"Knock-out" kasedinin *S.pombe 972h⁻*, *ura4h⁻* ve diploid ırklara transformasyonu sonrasında, homolog rekombinasyon sonucu "knock-out" kasetinin aktarıldığı hücrelerin belirlenmesi amacıyla kaset aktarılan *972h⁻*, *ura4h⁻* ve diploid hücreler, 200 mg/l olacak şekilde "geneticin" antibiyotiğinin bulunduğu YEA petrilere 200'er µl yayma yöntemi ile ekildi. 5 gün boyunca 32°C'lik etüvde inkübe edildi. *972h⁻* hücrelerinin bulunduğu "geneticin" antibiyotiğine dirençli koloniler eş zamanlı olarak kürdan yardımıyla ayrı ayrı YEA, "geneticin" içeren YEA, MMA ve guanin içeren MMA besiyerlerine ekildi, 5 gün boyunca 32°C'lik etüvde bekletildi. Kasetin aktarıldığı

ura4h⁻ kolonileri “geneticin” içeren YEA besiyerinde seçildikten sonra YEA, “geneticin” içeren YEA, MMA, urasil içeren MMA, urasil ve guanin içeren MMA ve yalnızca guanin içeren MMA besiyerine kürdan yardımıyla ekildi. 5 gün boyunca 32°C’lik etüvde üremeye bırakıldı. Kontrol grubu olarak *pREP42* plazmidi aktarılmış *ura4h⁻* hücreleri MMA besiyerine ekildi ve 32°C’lik etüvde bekletildi. Diploid ırklar haploidizasyon yöntemiyle elde edildi.

3.9.2. Diploid *Schizosaccharomyces pombe* Irklarının Haploidizasyonu ve Seçilmesi

“Geneticin” içeren YEA petrilerinde üreyen diploid *S.pombe* kolonilerinin tek tek m-flourofenil alanin ve guanin içeren MMA eğri besiyerlerine ekimleri gerçekleştirildi. 5 gün boyunca 30°C’lik etüvde inkübasyon sonrası hücreler “Phloxin B” (Kohli ve diğ., 1977) ve guaninli YEA besiyeri petrilerine 10⁻³ sulandırım oranında 100 µl yayma ekimi yapıldı. 3 gün boyunca 30°C’lik etüvde üremeye bırakıldı. Üreyen koloniler içinden haploid (açık pembe) koloniler seçilerek kürdan yardımıyla YEA + “geneticin”, YEA, MMA + guanin ve MMA besiyeri içeren petrilere ekildi. 5 gün boyunca 32°C’lik etüvde üremeye bırakıldı.

3.10. REKOMBİNANT TRANSFORMANT KOLONİLERİN KONTROL EDİLMESİ

Seçici besiyerinde üreyen kolonilerin, “knock-out” kasetini homolog rekombinasyonla doğru bölgeye almış olan koloniler olup olmadığı koloni PCR ile kontrol edildi.

3.10.1. Koloni PCR

“Geneticin” antibiyotiğine direnç gösteren koloniler seçildi. “Knock-out” kasetinin doğru yere girip girmediğini anlamak için bu koloniler kalıp olarak kullanılarak koloni PCR yapıldı. 10 µl distile su içerisine kürdan yardımıyla kolonilerden hücre alındı ve süspanse edildi. Bu hücre süspansiyonları kalıp olarak kullanıldı. Primer olarak *gual1* genini çoğaltmaya uygun primer seti ile kaset içerisinde bulunan “marker” gen olan kanamisin direnç genini çoğaltmaya uygun primer seti (Tablo 3.19) kullanıldı.

Tablo 3.19 : Koloni PCR’da kullanılan primer dizileri ve oluşan ürün boyutları.

	Forward Primer	Reverse Primer	Ürün boyutu
<i>gua1</i>	gggctgcagatgtctgccttaagcc	gaagatctagtaaagacgcttttc	~ 1,5 kb
<i>kan</i>	atgggtaaggaaaagactcacg	ttagaaaaactcatcgagca	~1 kb

Seçici besiyerinde üreyen koloni için hem kanamisin direnç geni primerleri hem de *gua1* genine ait primerlerle ayrı ayrı reaksiyon gerçekleştirildi. Reaksiyon “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” enzimiyle gerçekleştirildi. Tablo 3.20’de verilen bileşenler 0,2 ml’lik PCR tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyon koşulları Tablo 3.21’de verildi.

Tablo 3.20 : Koloni PCR bileşenleri.

Bileşenin Adı	Miktarı (µl)	Son Konsantrasyon
Reaksiyon tamponu (5X) (+MgCl ₂)	4	1 X
2 mM dNTP	2	0,2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1	1,25 mM
DMSO (%100)	0,6	%3
Forward primer (10 pmol/µl)	0,5	0,25 pmol/µl
Reverse primer (10 pmol/µl)	0,5	0,25 pmol/µl
Kalıp	1	-
Enzim (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
Distile Su	10,2	-
Toplam	20	-

Tablo 3.21 : Koloni PCR koşulları.

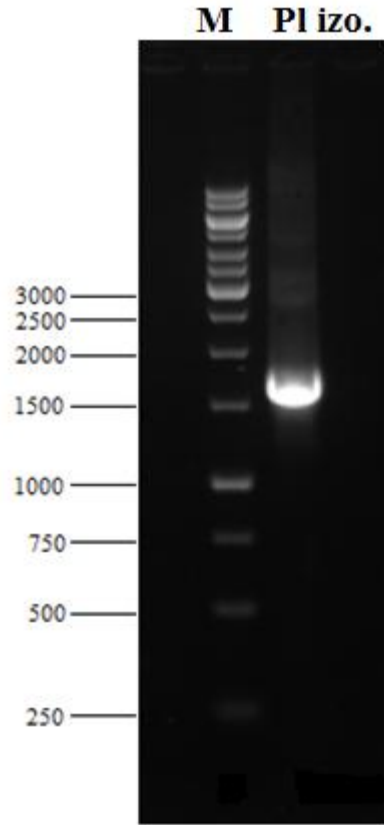
Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	98	1 dk.	1
Denatürasyon	98	10 sn.	
Bağlanma	53	30 sn.	35
Uzama	72	1 dk.	
Son Uzama	72	5 dk.	1

4. BULGULAR

Çalışmada *Schizosaccharomyces pombe* Linder str. *Liquefaciens*'in haploid yabani (972h-) ırkı, *ura4h⁻* mutantı ve diploid ırkları “knock-out” tekniği kullanılarak *gua1* geni delesyona uğratılmaya çalışıldı. Bu amaçla *gua1* genine ait diziler, *gua1* geninin yakınındaki bölgeleri içine alan ve kanamisin genine ait dizileri taşıyan “knock-out” kaseti oluşturuldu. Nükleotid dizi analizi ile doğruluğu kontrol edilen kaset *S.pombe* hücrelerine transformasyon yoluyla aktarıldı. Transformasyon sonrası seçici besiyerinde seçilen kolonilerle, “knock-out” kasetinin homolog rekombinasyonla doğru bölgeye yerleşip yerleşmediği PCR yöntemiyle kontrol edildi.

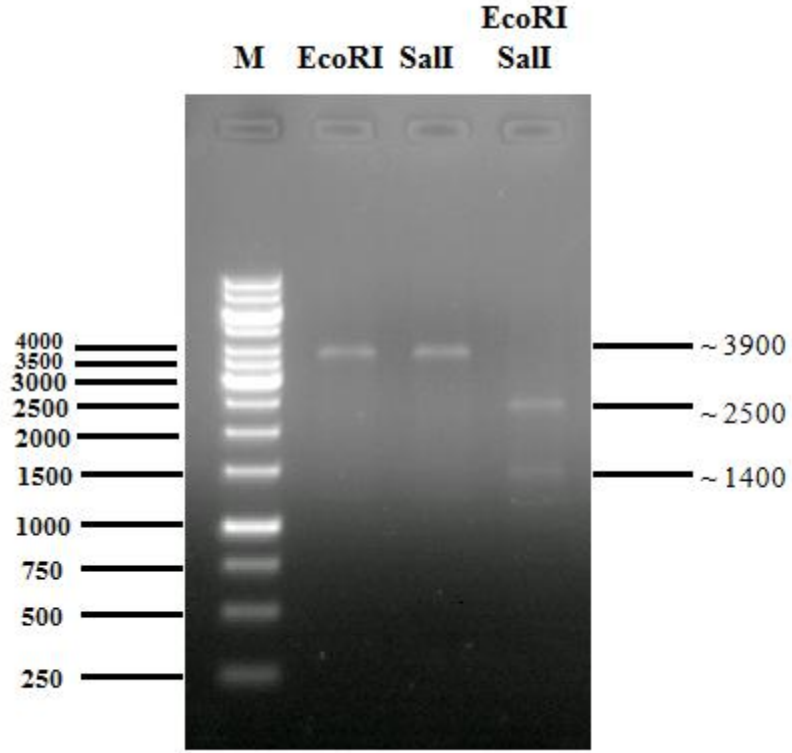
4.1. *Escherichia coli*'den PLAZMİD İZOLASYONU VE KONTROLÜ

pFA6-KanMX4 plazmidi taşıyan *E.coli DH5α* suşundan *pFA6-KanMX4* plazmidi “DSBIO Eco Friendly Plasmid Miniprep Kit” ile izole edildikten sonra plazmid varlığı %1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. *pFA6-KanMX4* plazmidinin boyutu (3941 bp) agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.1). Daha sonra izole edilen plazmid miktarı nanodropta 147,7 ng/μl olarak saptandı.



Şekil 4.1 : İzole edilen *pFA6-KanMX4* plazmidinin agaroz jel görüntüsü. M : 1 kb DNA Ladder.

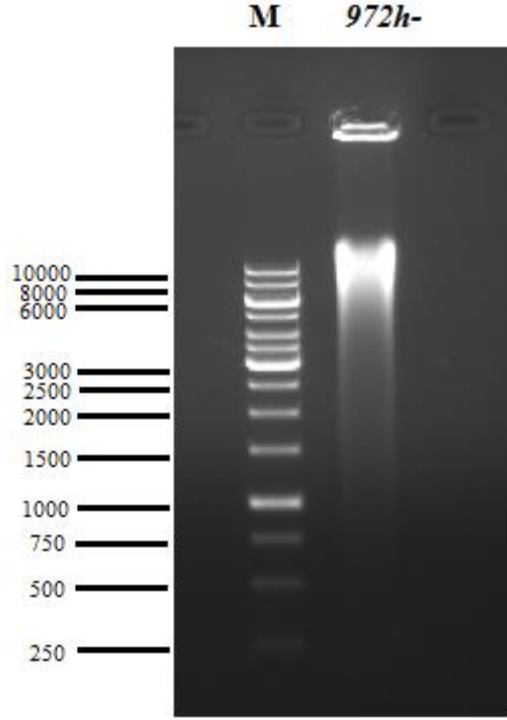
Plazmidin varlığı belirlendikten sonra *pFA6-KanMX4* plazmidini doğrulamak üzere EcoRI ve Sall restriksiyon endonükleazlarıyla ikili ve tekli kesim yapıldı. %1'lik agaroz jelde görüntülendi. Her iki enziminde plazmid üzerinde tek kesim noktası bulunması nedeniyle ikili kesimde 1,5 kb ve 2,5 kb boyutunda iki bant elde edildi. Tekli kesimde ise 3,9 kb tek bant görülerek plazmid boyutu kanıtlanmış oldu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: *pFA6-KanMX4* plazmidini EcoRI ve SalI restriksiyon endonükleazı ile tekli, EcoRI ve SalI restriksiyon endonükleazı ile ikili kesiminin agaroz jel görüntüsü.

4.2. *Schizosaccharomyces pombe*'den GENOMİK DNA İZOLASYONU

YEL besiyerinde üreyen *S. pombe* hücrelerinden “DSBIO Quick Yeast Genomic DNA Extraction Kit” ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası *S.pombe* genomu %1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.3). İzole edilen *S.pombe* genom DNA’sı nanodropta 101,8 ng/μl olarak bulundu.



Şekil 4.3 : *S.pombe* 972h- genomik DNA'sı .

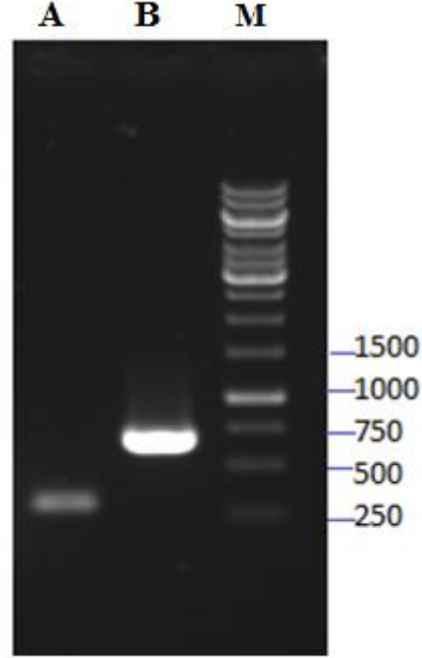
4.3. “KNOCK-OUT” KASETİ ELDE EDİLMESİ

Gua1 genine ait diziler ve kanamisin geninini taşıyan “knock-out” kaseti iki PCR sonucunda elde edildi. İlk PCR’da *gua1* genine ait dizilerin yanı sıra *gua1* genine komşu dizilerden oluşan 653 ve 285 bp’lık nükleotid dizileri uygun primerler kullanılarak elde edildi. 653 ve 285 bp’lık dizilerin ve uygun primerlerin reaksiyonda yer aldığı ikinci PCR’da *pFA6-KanMX4* plamidi kalıp olarak kullanıldı. İkinci PCR sonunda “knock-out” kaseti elde edildi.

4.3.1. *Schizosaccharomyces pombe*’de Homoloji Gösteren 653 bp’lık ve 285 bp’lık Dizilerin PCR ile Çoğaltılması

S.pombe genomunda *gua1* geninin yukarı (“upstream”) kısmında yer alan 653 bp’lık komşu diziler ile aşağı (“downstream”) kısmında yer alan 285 bp’lık komşu diziler iki ayrı PCR ile çoğaltıldı. Kullanılan primer setlerinde her primer çiftinden biri iç kısımda kanamisin direnç genine homoloji gösteren dizi içermektedir. PCR sonucu agaroz jelde

tek bant elde edildiğinden “Roche High Pure PCR Product Purification Kit” ile saflaştırılan PCR ürünü %1’lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.4).



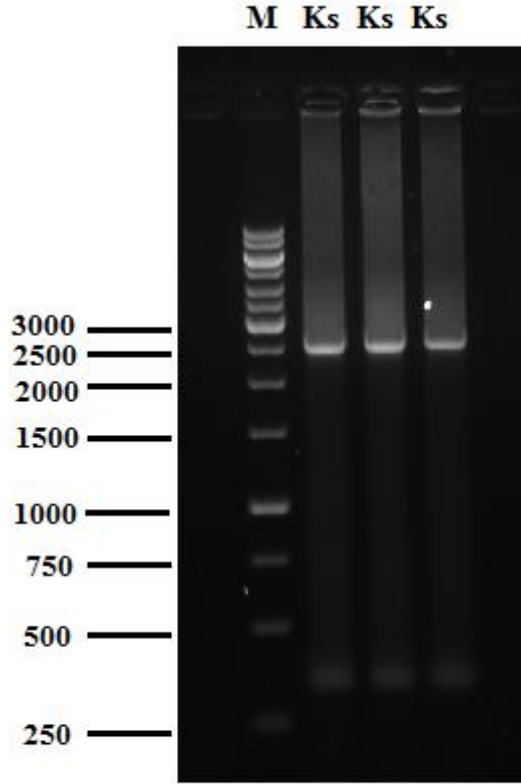
Şekil 4.4 : Homoloji gösteren 285(A) ve 653(B) bp’lik PCR ürünleri. M: DNA Ladder.

Agaroz jelde görüntüleme sonrası 653 ve 285 bp’lik dizilerin miktarı nanodropta ölçüldü. 653 bp’lik dizinin miktarı 85 ng/μl bulunurken 285bp’lik dizinin miktarı 32 ng/μl olarak saptandı.

4.3.2. Homoloji Gösteren Diziler Kullanılarak PCR ile “Knock-out” Kasetinin Oluşturulması ve Jelden Geri Kazanılması

Birinci basamak PCR’ın ürünü olan 653 bp’lik ve 285 bp’lik diziler, “upstream-outside” ve “downstream-outside” primerleri ve *pFA6-KanMX4* plamidinin kalıp olarak kullanıldığı ikinci PCR sonucu 2,5 kb’lık kanamisin direnç genini de içeren “knock-out” kaseti oluşturuldu. Farklı bantların oluşması nedeniyle istenen boyuttaki 2,5 kb’lık bant jelden kesilerek alındı. “Roche High Pure PCR Product Purification Kit”

ile saflaştırılma sonrası 2,5 kb'lık kaset %1'lik agaroz jelde görüntülendi (Şekil 4.5). Jelde görüntüleme sonrası PCR ürün miktar nanodrop ile ölçüldü ve ~ 45 ng/μl olarak bulundu.



Şekil 4.5 : “Knock-out” kasetinin agaroz jel görüntüsü. Ks: “knock-out” kaseti; M: 1 kb DNA Ladder.

4.3.3. “Knock-out” Kasetinin Nükleotid Dizi Analizi

Jelden geri kazanılan 2,5 kb'lık kaset 45 ng/μl konsantrasyonda 10 μl olacak şekilde hizmet alımının yapıldığı firmanın önerdiği koşullarda dizilemeye gönderildi. Dizileme sonrası elde edilen sonuçlarla NCBI’da “BLAST” analizi yapıldı. Elde edilen “knock-out” kaseti dizi sonuçları *S. pombe* 972h⁻ yabani ırkı ve kanamisin geni içeren *pFA6-KanMX4* plazmidinin dizileriyle kontrol edildi. “Upstream-outside” (a primeri) guanin primeri ile yapılan ileri okuma sonuçları *S.pombe* 972h⁻ genomuyla (Şekil 4.6) kanamisin genine uygun primerler ile yapılan geri okuma sonuçları *pFA6-KanMX4*

plazmid dizisi ile karşılaştırıldı (Şekil 4.7). Benzerlik oranları ve beklenen değerler analiz edildi.

Schizosaccharomyces pombe chromosome II, complete sequence

Sequence ID: [emblCU329671.1](#) Length: 4539804 Number of Matches: 1

Range 1: 1706337 to 1706619 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
451 bits(244)	5e-127	271/284(95%)	2/284(0%)	Plus/Plus

Features: [875 bp at 5' side: palmitoyltransferase Pfa3 \(predicted\)](#)
[356 bp at 3' side: IMP dehydrogenase Gua1 \(predicted\)](#)

Query	1	GCTCtttttttGTGCATTATGCATACAGAGCCAATATCTCGCTAGCTACACTtttttttt	60
Sbjct	1706337	GCTCTTTTTT-TGCATTATGCATACAGAGCCAATATCTCGCTAGCTACACTTTTTTTTT	1706395
Query	61	AAGATCGTTaaaaaaaTACCTAGAACTGTATTGCGGTTGTCAGTAATTTAATAAAGTAG	120
Sbjct	1706396	AAGATCGTTAAAAAATACCTAGAACTGTATTGCGGTTGTCAGTAATTTAATAAAGTAG	1706455
Query	121	AATTGATATTCCAATTAATGCTCTTGCCATTGATAATTAGCTAGACGGAGCGCAACAAT	180
Sbjct	1706456	AATTGATATTCCAATTAATGCTCTTGCCATTGATAATTAGCTAGACGGAGCGCAACAAT	1706515
Query	181	GGCTAAAGAAATATTTACTAGACAAATAAATAATATATACAATTACTTACccccccT-AT	239
Sbjct	1706516	GGCTAAAGAAATATTTACTAGACAAATAAATAATATATAAAAATTAAATACCCCCATAAAT	1706575
Query	240	TGGAAATTTGACAAGCTTTTTATCGCAAAACGTACGTGAGGACc	283
Sbjct	1706576	TGGTAGTTTGACAAGCTTTTTATCGCATAAGGTATGTGTGGACC	1706619

Şekil 4.6 : “Knock-out” kaset dizisinin *S.pombe* genomuyla “BLAST” analizi.

“BLAST” analizi sonucu kasetin yukarı kısmında yer alan ve *S. pombe* genomunun kalıp olarak kullanıldığı guanin genine komşu olduğu düşünülen dizilerin beklenen şekilde *S.pombe* genomuna uygunluk gösterdiği görüldü. Guanin geni 2. kromozomda yer almaktadır ve “BLAST” analiziyle karşılaştırılan bölgelerin 2. kromozomla %95 oranında dizi benzerliği gösterdiği bulundu.

Tagging vector pFA6a-KanMX6-P3nmt1-3FLAG, complete sequence
Sequence ID: [gb|EU493331.1|](#) Length: 5411 Number of Matches: 1

Range 1: 3425 to 3871					GenBank	Graphics	▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand				
813 bits(440)	0.0	445/447(99%)	2/447(0%)	Plus/Minus				
Query 106	AGATCTGTTTAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGGGT	CACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAG	165					
Sbjct 3871	AGATCTGTTTAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGGGT	CACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAG	3812					
Query 166	AATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCT	CAGGGGCATGATGTGACTGTCGCCCG	225					
Sbjct 3811	AATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCT	CAGGGGCATGATGTGACTGTCGCCCG	3752					
Query 226	TACATTTAGCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGC	285						
Sbjct 3751	TACATTTAGCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGC	3692						
Query 286	ACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCC	345						
Sbjct 3691	ACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCC	3632						
Query 346	CTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAGGTTAG	405						
Sbjct 3631	CTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAGGTTAG	3572						
Query 406	GATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTTATATACTTCTTTTAAAAATCTTGCTAGGATACAGT	465						
Sbjct 3571	GATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTTATATACTTCTTTTAAAAATCTTGCTAGGATACAGT	3512						
Query 466	TCTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATGGGTAAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGC	525						
Sbjct 3511	TCTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATGGGTAAAGGAAAAGACTCACGTTTCGAGGC	3452						
Query 526	CGCGAT-AAA-TCCAACATGGATGCTG	550						
Sbjct 3451	CGCGATTAAATTC AACATGGATGCTG	3425						

Şekil 4.7 : “Knock-out” kaset dizisinin *pFA6-KanMX4* plazmidıyla “BLAST” analizi.

“BLAST” analizi sonucu “knock-out” kasetinin iç bölgesinde yer alan kanamisin genine beklenen şekilde uygunluk görüldü. Kanamisin genine göre tasarlanmış primerlerle çoğaltılan bölge *pFA6-KanMX4* plazmidıyla karşılaştırıldığında kanamisin genine %99 benzerlik görüldü. Beklenen değer ise 0.0 olarak bulundu.

4.4. TRANSFORMASYON

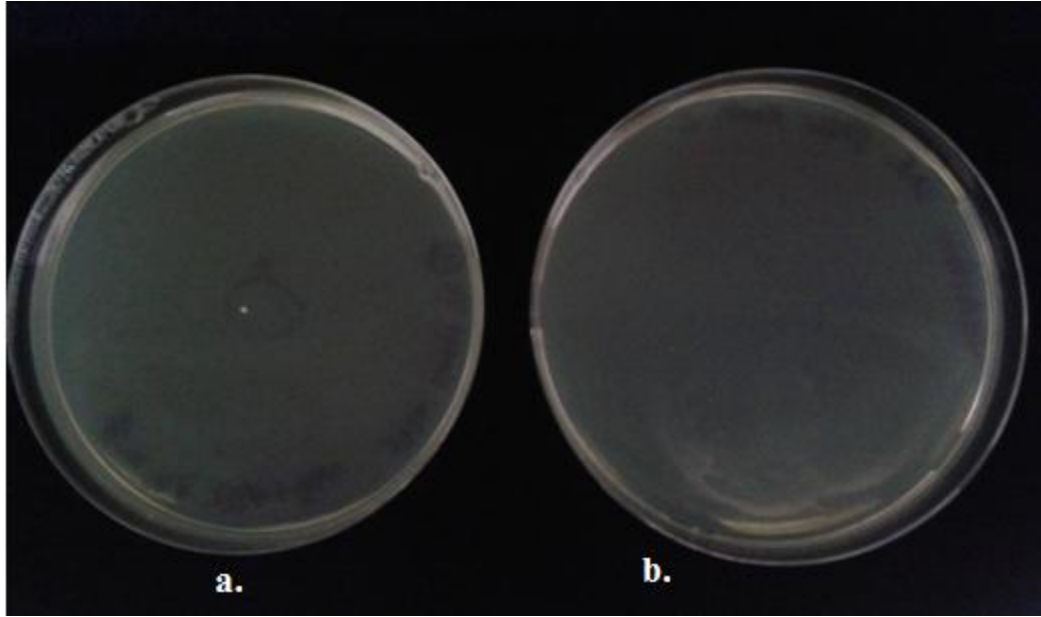
“Knock-out” kasetinin *972h⁻*, *ura4h⁻* ve diploid *S. pombe* hücrelerine LiAc yöntemiyle transformasyonu gerçekleştirildi. *S.pombe* ırklarına ~1,125 µg kaset transforme edilirken kontrol gruplarına kaset aktarılmadı. *ura4h⁻* mutant ırkına kasetin yanı sıra kontrol olarak urasil geni taşıyan 3,5 µg *pREP42* plazmidi transforme edildi.

4.5. TRANSFORMASYON SONRASI KONTROL

Transformasyon sonrası “knock-out” kasetini almış olan koloniler “geneticin” içeren YEA besiyerinde üreme gösterdi. Seçilen bu koloniler, kasetin istenen bölgeye girip girmediğini anlamak için seçici besiyerlerine ekildi. MMA besiyerinde üreme göstermeyip uygun metabolitlerin ilave edildiği MMA besiyerinde üreyen koloniler “koloni PCR” ile kontrol edildi.

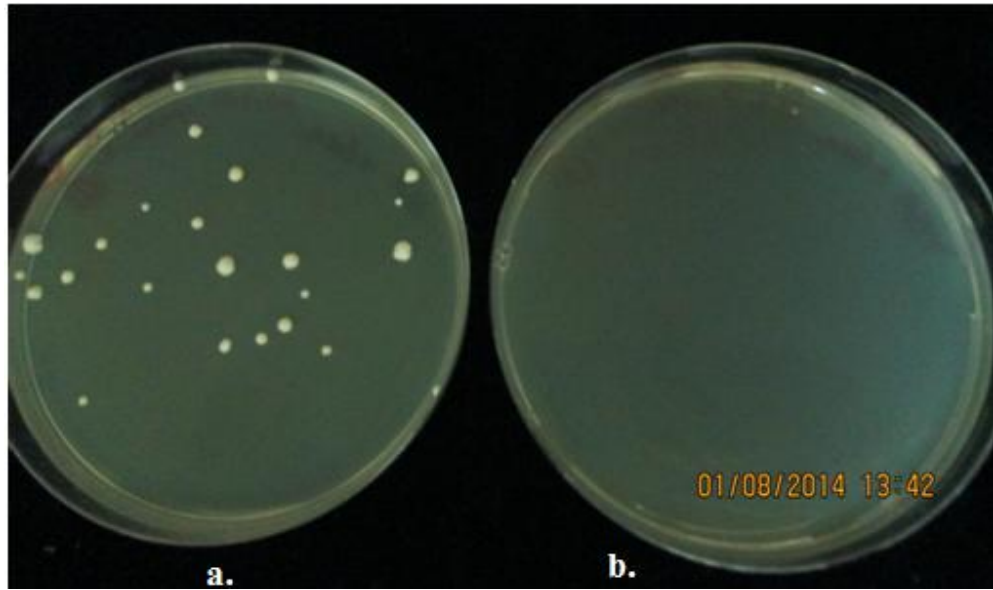
4.5.1. Kaset Almış 972h- ve *ura4h*- *S.pombe* Transformantlarının Seçilmesi

LiAc yöntemiyle transformasyon sonrası “geneticin” içeren YEA besiyerli petrilere 200 µl olarak yayma ekimle ekilen 972h⁻ *S.pombe* hücreleri 32°C’de 5 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilere “geneticin” antibiyotikine karşı direnç özelliği kazandıran “knock-out” kasetini genomuna almış (24 transformasyon sonucu) olan toplam 3604 koloni elde edildi (Şekil 4.8: Örnek petri). Daha sonra kasetin genomda hedeflenen bölgeye girip girmediğini anlamak için koloniler kürdan yardımıyla YEA, MMA, “geneticin” içeren YEA ve guanin içeren MMA seçici besiyerlerine ekildi. 5 gün boyunca 32°C’lik etüvde bekletilme sonrası kaseti genomunda doğru bölgeye almış olabilecek olası koloniler belirlendi.



Şekil 4.8: “Geneticin” içeren YEA besiyerinde “knock-out” kaseti transforme edilmiş 972h⁻ kolonileri (a) ve kontrolü (b).

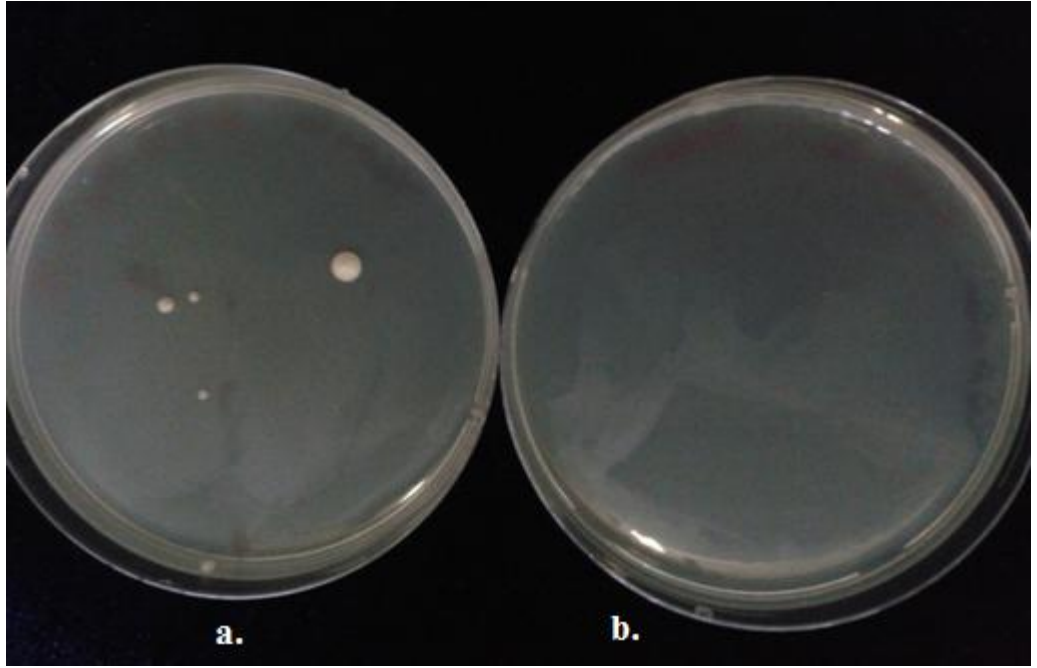
Ura4h⁻ *S.pombe* hücreleri kaset transformasyonu sonrası aynı şekilde “geneticin” içeren besiyerine 200 µl olarak yayma ekimle ekildi (Şekil 4.9: Örnek petri). Bu petrilerde (3 transformasyon sonucu) toplam 95 koloni meydana geldi. Bu koloniler YEA, MMA, guanin içeren MMA, guanin ve urasil içeren MMA ve geneticin içeren YEA seçici besiyerlerine ekilerek 5 gün boyunca 32°C’lik etüvde bekletildi. MMA besiyerinde üremeyip, yalnızca urasil ve guanin içeren MMA besiyerinde üreyen 9 koloni saptandı.



Şekil 4.9: “Geneticin” içeren YEA besiyerinde “knock-out” kaseti transforme edilmiş *ura4h⁻* mutant kolonileri(a) ve kontrol grubu(b).

4.5.2. Transformant Diploid *S.pombe* Hücrelerinin Haploidizasyonu

Transformasyon sonrası “geneticin” içeren YEA petrilerine 200 µl olarak yayma ekimle ekilen diploid *S.pombe* hücreleri 32°C’de 5 gün inkübe edildi. “Geneticin” antibiyotiğine karşı direnç özelliği kazandıran “knock-out” kasetini genomuna dahil etmiş olan (5 transformasyon sonucu) toplam 1067 diploid koloni meydana geldi (Şekil 4.10: Örnek petri). Bu diploid kolonilerden seçilen 43 tanesinin tek tek m-flourofenil alanin ve guanin içeren MMA eğri besiyerlerine ekimleri gerçekleştirildi. 5 gün boyunca 30°C’lik etüvde inkübasyon sonrası hücreler Phloxin B ve guanin içeren YEA besiyeri bulunan petrilere 10^{-3} oranında sulandırılarak 100 µl yayma ekim ile ekildi. 3 gün boyunca 30°C’lik etüvde üremeye bırakıldı.



Şekil 4.10 : “Geneticin” içeren YEA besiyerinde “knock-out” kaseti transforme edilmiş diploid koloniler (a) ve kontrolü (b).

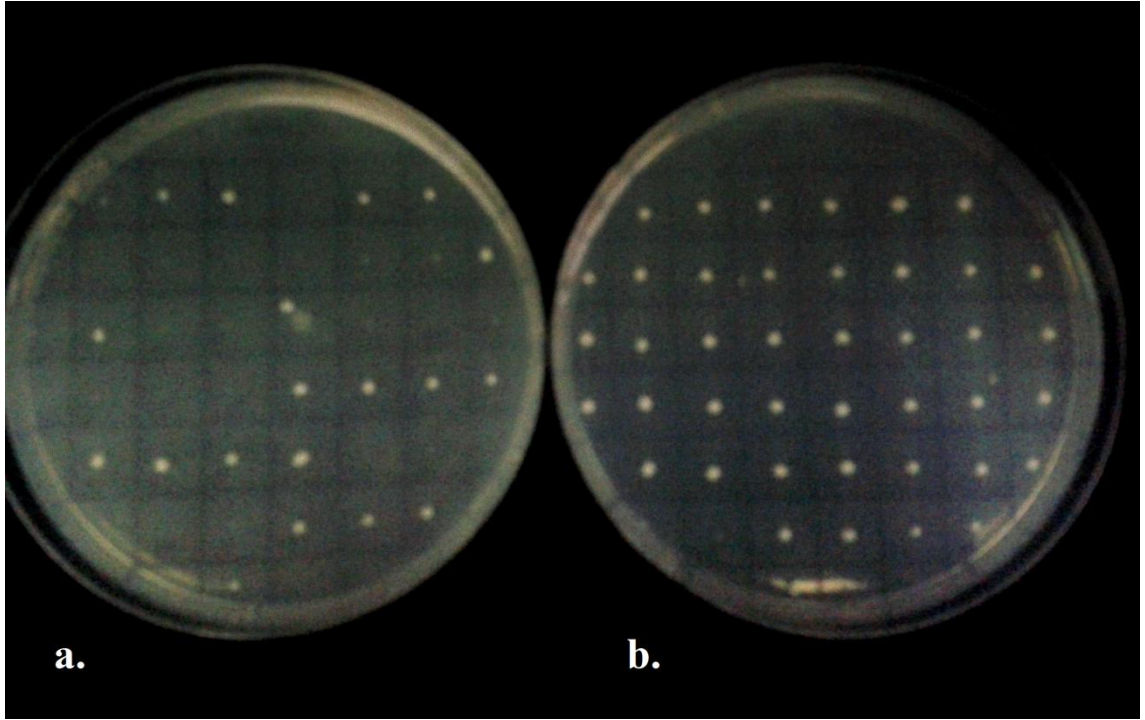
4.5.3. Haploidizasyon Sonrası Transformant Haploid *S.pombe* Kolonilerinin Seçimi

3 gün boyunca 30°C’lik etüvde üreyen hücreler Phloxin B içeren YEA petrisinde ürediğinde pembe renkte görülmektedir. Koyu pembe renkli bir boya olan Phloxin B ile diploid koloniler daha fazla ölü hücre içeriğinden dolayı daha koyu pembeye boyanırken haploid koloniler açık pembe-beyaz renkte görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 : Haploid ve diploid *S.pombe* hücrelerin phloxin B içeren YEA besiyerindeki görüntüleri.

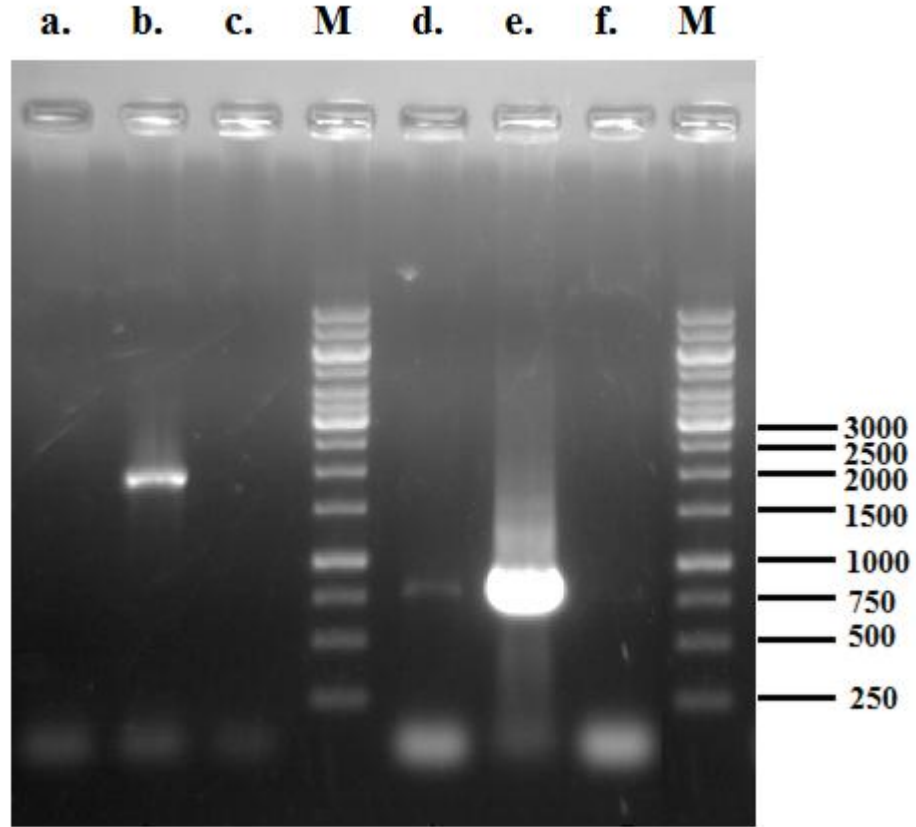
Bu özellikten yola çıkılarak açık pembe görünen 120 haploid koloni seçilerek kürdan yardımıyla YEA, YEA + “geneticin”, MMA ve MMA + guanin besiyeri bulunan seçici petrilere ekildi. 5 gün boyunca 32°C’lik etüvde üremeye bırakıldı. MMA’da üremeyip, diğer besiyerlerinde üreyen kaseti genomunda doğru bölgeye almış olma olasılığı olan 21 koloni elde edildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 : Seçici besiyerinde üreyen haploid koloniler. a. MMA besiyeri b.guanin içeren MMA besiyeri

4.5.4. “Knock-out” Kasetlerinin Koloni PCR ile Kontrolü

Kaseti alan olası *ura4h⁻* 9, *972h⁻* 56 ve haploid 21 transformant koloniye *gua1* geni primerleri ve kanamisin direnç genine uygun primerlerle koloni PCR uygulaması sonrası örnekler %1’lik agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi. “Knock-out” kasetinin genomda istenilen bölgeye girmediği gözlemlendi. Ancak transformant *972h⁻* ırkına ait 56 koloniden 11 numaralı kolonide guanin geni primerleriyle gerçekleşen reaksiyonda bant oluşumu görülmezken, kanamisin genine ait primerlerle bant görüldü (Şekil 4.13).

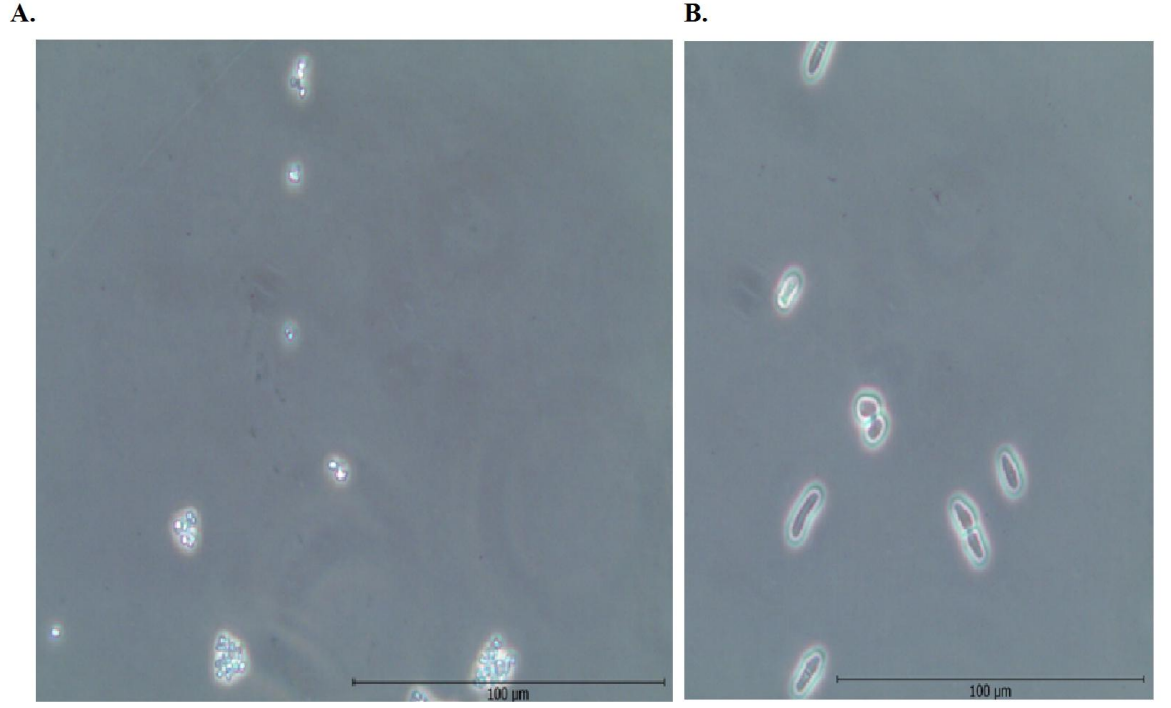


Şekil 4.13: Olası *gua1* delesyonlu 972^h ırkı koloni PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü.

a. Guanin genine ait primerler ve 11 no'lu koloni; b. Guanin geni primerleri ve 972^h- genomu; c. Guanin geni primerleri, negatif kontrol; d. Kanamisin geni primerleri ve 11 no'lu koloni; e. Kanamisin geni primerleri ve *pFA6-KanMX4* plazmid; f. Kanamisin geni primerleri, negatif kontrol; M. 1 kb DNA Ladder.

4.5.5. Olası *gua1* Mutantı 972^h Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi

Olası *gua1* mutantı 972^h- kolonisine ait *S. pombe* hücreleri mikroskopik olarak incelendiğinde şekil 4.14'teki görüntü elde edildi. Hücreler (Şekil 4.14-A) mikroskopik olarak incelendiğinde hücrelerin yabani ırk 972^h (Şekil 4.14-B) hücrelerine göre çok küçük olduğu ve bu hücrelerin kümeleşme gösterdiği gözlemlendi.



Şekil 4.14 : 972h- transformant (A) ve yabani ırk 972h- (B) *S.pombe* hücrelerinin faz kontrast mikroskobu görüntüleri.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pürin nükleotidleri, hücre sinyalinde önemli metabolik düzenleyicilerdir. Kimyasal enerji taşıyıcıları ATP ve GTP ile nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), S-adenozilmetionin, koenzim A gibi koenzimlerin bileşenleridir. Deoksiribonükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) metabolizması gibi pek çok biyokimyasal süreç için gereklidir (Stryer, 1995). Ayrıca siklik adenzin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) gibi bazı nükleotidler hücrede ikincil haberci olarak görev almaktadır (Lehninger ve diğ., 2005). Hücresel önemleri ve kemoterapik hedef olarak potansiyel olmaları nedeniyle pürin *de novo* ve kurtarma yolları çeşitli organizmalarda geniş ölçüde çalışılmaktadır (Jancso ve diğ., 2001).

S. pombe, dizisi tamamlanmış altıncı ökaryotik organizmadır (Decottignies ve diğ., 2003). *S.pombe*'nin RNAi yolağı, tekrarlı sentromer yapısı, G2/M hücre döngüsü kontrol noktası, sitokinez ve kompleks heterokromatin yapısı ve alternatif kırılma (Sabatinos ve Forsburg, 2010; Rhind ve diğ., 2011) gibi süreçlere sahip olması nedeniyle iyi bir model olduğu bildirilmektedir (Frost ve diğ., 2012). Hücre siklusu ve kontrol noktasındaki mekanizmaları *S. pombe*'yi kanser hastalığı gelişim yolağı çalışmaları için iyi bir model organizma haline getirmektedir (Wood ve diğ., 2002). Mayalar, insanda temel hücresel süreçler ve metabolik yolların anlaşılmasında önemli rol oynamakta ve birçok hastalık geninin moleküler düzeyde analizini kolaylaştırmaktadır (Suter ve diğ., 2006).

Genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi ve çeşitli moleküler çalışmalara katkı sağlamak amacıyla *Saccharomyces* Genom Delesyon Projesi “*Saccharomyces* Genome Deletion Project (http://www-sequence.stanford.edu/group/yeast_deletion_project/deletions3.html)” diğer organizmalarda gen delesyon projelerinin gerçekleştirilmesine öncülük etmiştir. Günümüzde Kore BIONEER Ortaklığı uzun oligonükleotid yöntemini kullanarak tüm fizyon mayası genlerinin “knock-out” edilmesi için girişimde bulunmuştur (<http://pombe.bioneer.co.kr>). Bu amaçla *S.pombe* ORF'lerinin %99'u

delesyona uğratılmıştır (Spirek ve diğ., 2010) ve çalışmada delesyonunu amaçladığımız *gua1* geni henüz delesyona uğratılamamış olan %1'lik kısımda yer almaktadır.

Mutant organizma ve hücre hatlarının analizi spesifik proteinlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde önemlidir. Günümüze kadar mutantlar mutasyon sonrası belirli fenotipik değişiklikler için seçim sonrası meydana getirilirken, günümüzde homolog rekombinasyon aracılığıyla gen hedeflemedeki teknolojik ilerlemeler istenen herhangi bir gende mutasyon oluşturmayı mümkün hale getirmiştir (Mortensen, 2002).

Model organizmalarda gen veya ORF delesyona uğratıldığında ya da gen ürünü inaktive edildiğinde bilinen genler veya tahmin edilen ORF'lerin fonksiyonu büyüme kusurları ya da diğer fenotipler değerlendirilerek analiz edilebilmektedir (Suter ve diğ., 2006). Ökaryotik organizmaların genom boyutunda gen delesyon koleksiyonları temel biyolojide moleküler mekanizmaların araştırılması, medikal uygulamalar ve biyomühendislikte hedef olabilecek yolların tanımlanması için önemli olanaklar sağlamaktadır. Sistematik gen delesyon koleksiyonlarının oluşturulması zordur. RNA interferens (RNAi) çoğu organizmada gen aktivitesini baskılamada popüler alternatif bir yaklaşım sağlamasına rağmen RNAi yaklaşımı gen anlatımının kısmi olarak engellenmesi ve hedef dışı etki gibi olumsuzluklara sahiptir (Kim ve diğ., 2010).

S.pombe'de *gua1* geni 2. kromozomda sentromerik bölgede yer almaktadır (Oraler ve diğ., 1990; Karaer ve diğ., 2006) ve *gua1* geninin anlatımı sonucu pürin metabolizmasında anahtar rol oynayan IMPDH enzimi meydana gelmektedir. IMPDH enzimi pürin nükleotidlerinin *de novo* biyosentezinde görev almaktadır ve anahtar enzim olarak IMPDH çoğalan hücrelerde fazla miktarda anlatım yapmaktadır. İmmüno-supressif ve antiviral kemoterapinin başlıca hedefi haline gelmekte ve antifungal, antibakteriyel, antiprotozoal ve antikanser hedef olarak büyük ilgi çekmektedir (Morrow ve diğ., 2012). *Gua1* geninin delesyonu IMPDH enziminin çeşitli hücresel yollar üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve klinik biyoloji gibi alanlarda ilerleme şeklinde bilime katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada Kim ve arkadaşlarının (2010) önerdiği şekilde *gua1* genine ait “knock-out” kaseti oluşturularak genin delesyonu gerçekleştirildi. İki aşamalı PCR sonrası elde edilen ve *gua1* genine komşu diziler ile kanamisin direnç geninden oluşan “knock-out”

kasetinin *S. pombe* yabani ırk (972h-), *ura4h-* mutant ırk ve diploid ırklarına transformasyonu gerçekleştirildi. Oluşturulan kaset transformasyon öncesi nükleotid dizi analiziyle kontrol edildi. Kontrol sonrası kaset *ura4h-*, 972h- ve diploid ırklara Gregan ve arkadaşlarının (2006) önerdiği lityum asetat yöntemiyle transformasyon prosedürüne göre aktarıldı. Aktarım sonrası seçici besiyerlerinde üreyen 3604 transformant 972h- *S. pombe* hücresinden 56 koloni, 95 transformant *ura4h-* kolonisinden 9'u, 1067 diploid koloniden seçilen 53 koloninin haploidizasyonu ile elde edilen haploid kolonilerden 21'i seçici besiyerlerinde beklenen fenotipi gösterdi. Fenotipik olarak seçilen koloniler "koloni PCR" ile kontrol edildi. Bu kolonilerin kalıp olarak kullanıldığı koloni PCR sonucunda, konak olarak 972h- ırkından elde edilen yalnızca 1 tane olası transformant koloni kanamisin genine ait primerlerle yapılan PCR ürününün agaroz jel elektroforezinde bant oluşumu gözlenirken, guanin geni primerleriyle gerçekleştirilen reaksiyonda bant oluşumu gözlenmedi. Transformasyon sonucu elde edilen seçici besiyerinde üreyen kolonilerden 85'inin "knock-out" kasetini genomuna dahil ettiği ancak istenen bölgeye almadığı düşünüldü.

Olası guanin mutanti olduğu düşünülen hücreler mikroskopik olarak incelendiğinde Fernández-Álvarez ve arkadaşlarının (2009) sonuçlarına benzer şekilde hücrelerin küçük olduğu ve kümeleşme gösterdiği gözlemlendi. Besiyerinde fenotipik olarak incelendiğinde bu koloninin yabani tip kolonilere göre daha basık bir koloni yapısına sahip olduğu görüldü. Jiang ve arkadaşları (2010) fungal insan patojeni *Candida albicans*'ta *gua1* genini delesyona uğratmayı amaçlamış ve elde ettikleri *gua1/gua1* mutant diploid kolonilerin +4°C'de 1 haftadan daha fazla sürede canlı kalamadığını belirtmiştir. Bu çalışmada elde edilen olası *gua1* mutanti hücrelerin de benzer şekilde +4°C'de canlılıklarını sürdüremediği görüldü.

Decottignies ve arkadaşları (2003) *S.pombe* gen delesyonu ile ilgili pilot bir çalışma yapmışlardır. Decottignies ve arkadaşlarının çalışmasına göre PCR kullanılarak tüm *S. pombe* ORF'lerinin sistematik delesyonu *S. cerevisiae*'daki benzer çalışmalarla karşılaştırıldığında daha zor meydana gelmektedir. Bunun nedeni homolog rekombinasyon etkinliğinin *S. cerevisiae*'ya göre *S. pombe*'de daha düşük olmasıdır (Kaur ve diğ., 1997). Aynı çalışmada *S. pombe* 2. kromozomunda 18 kb'lık bir bölgede 9 genden 8'ini delesyona uğratamamışlardır. Diploid kolonilerde 85 genden 65'ini

delesyona uğratmayı başarmışlardır. Delesyon prosedürü altıdan fazla sayıda tekrarlanmış olmasına rağmen delesyona uğratamadıkları 20 genden 3'ünde delesyon kasetinin PCR çoğaltımı gerçekleştirilememiş, 17'sinde ise doğru şekilde delesyona uğratılmış “geneticin” dirençli koloniler elde edilememiştir.

Decottignies ve arkadaşlarına göre bu sonuçlara neden olan olasılıklardan biri bu bölgede kromatin yapısının farklı olması ve gen transkripsiyonunun düşük seviyede gerçekleşmesidir. Ayrıca hedeflenen genin delesyonunun düşük etkinliğinin nedeninin genomun bazı bölgelerinin kapalı kromatin yapıyla düşük anlatım yapan genleri içermesi olduğunu düşünmektedirler. Buna alternatif olarak diğer olasılık ise delesyon kasetinin genoma girişinin gerçekleşmesi fakat heterokromatin yapı nedeniyle kanamisin direnç geninin yetersiz anlatım yapmasıdır (Decottignies ve diğ, 2003). Diploid ve haploid kolonilerden elde edilen toplam 4766 transformant koloniden sadece 1 tanesinde olası *gua1* delesyonlu ırka rastlanması Decottignies ve arkadaşlarının bulgularını destekler niteliktedir.

Sonuç olarak bundan sonraki çalışmamızda elde edilen mutant ırkın *gua1* geni bakımından dizi analizi yapılacaktır. Elimizde bulunan insan guanin geninin, bu çalışmada elde ettiğimiz *gua1* geni delesyonlu olan ırka transforme edilmesi ve genin anlatım regülasyonu ile ilgili çalışmaların yapılması planlanmaktadır. Bunun yanında genin ayrıntılı yapısı da (protein-DNA etkileşimi, enzimin aktif bölgesinden sorumlu dizilerin belirlenmesi) ortaya konulacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, M.D., Celniker, S.E., Holt, R.A., Evans, C.A., Gocayne, J.D., Amanatides, P.G., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Gabor, G.L., Abril, J.F., Agbayani, A. et al., 2000, The genome sequence of *Drosophila melanogaster*, *Science*, 287, 2185–2195.
- Aherne, A., Kennan, A., Kenna, P.F., McNally, N., Lloyd, D.G., Alberts, I.L., Kiang, A.S., Humphries, M.M., Ayuso, C., Engel, P.C., GU, J.J., Mitchell, B.S., Farrar, G.J. and Humphries, P., 2004, On the molecular pathology of neurodegeneration in IMPDH1-based retinitis pigmentosa, *Human Molecular Genetics*, 13 (6), 641-650.
- Allison, A.C. and Eugui, E.M., 2000, Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action, *Immunopharmacology*, 47 (2-3), 85-118.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2007, *Molecular biology of the cell*, 5th ed., NewYork, ISBN: 978-0815341055.
- Anderson, J. and Sartorelli, A., 1968, Inosinic acid dehydrogenase of sarcoma 180 cells, *Journal of Biological Chemistry*, 243, 4762-4768.
- Atkins, C., Shelp, B. and Storer, P., 1985, Purification and properties of inosine monophosphate oxidoreductase from nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) , *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 236, 807-814.
- Baneyx, F., 1999, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 411-421.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos O., Deanouel A., LaCroute, F. and Cullin, C., 1993, A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, 21, 3329-3330.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie III, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R., 1998, Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*, *Yeast* 14, 943–951.
- Beck, J.T., Zhao, S. and Wang, C.C., 1994, Cloning, sequencing, and structural analysis of the DNA encoding inosine monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205) from *Tritrichomonas foetus*, *Experimental Parasitology*, 78 (1), 101-112.

- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B. and Shao, Y., 1997, The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, 277 (5331), 1453–1462.
- Bowne, S.J., Liu, Q., Sullivan, L.S., Zhu, J., Spellicy, C.J., Rickman, C.B., Pierce, E.A., Daiger, S.P., 2006, Why do mutations in the ubiquitously expressed housekeeping gene IMPDH1 cause retina-specific photoreceptor degeneration?, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47 (9), 3754-3765.
- Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Mortimer, S.E., Hedstrom, L., Zhu, J., Spellicy, C. J., Gire, A.I., Houghbanks-Wheaton, D., Birch, D.G., Lewis, R.A., Heckenlively, J.R. and Daiger, S.P., 2006, Spectrum and frequency of mutations in IMPDH1 associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis, *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47 (1), 34-42.
- Chen, L. and Pankiewicz, K.W., 2007, Recent development of IMP dehydrogenase inhibitors for the treatment of cancer, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 10 (4), 403-412.
- Choi, J.H. and Lee, S.Y., 2004, Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 625-635.
- Chong, C.R., Qian, D.Z., Pan, F., Wei, Y., Pili, R., Sullivan, D.J.Jr. and Liu, J.O., 2006, Identification of type 1 inosine monophosphate dehydrogenase as an antiangiogenic drug target, *Journal of Medicinal Chemistry*, 49 (9), 2677-2680.
- Collart, F. R. and Huberman, E., 1988, Cloning and sequence analysis of the human and chinese hamster inosine-5'-monophosphate dehydrogenase cDNAs, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 15769-15772.
- Cooney, D.A., Jayaram, H.N., Gebeyehu, G., Betts, C.R., Kelley, J.A., Marquez, V.E. and Johns, D.G., 1982, The conversion of 2- β -D-ribofuranosylthiazole-4-carboxamide to an analogue of NAD with potent IMP dehydrogenase-inhibitory properties, *Biochemical Pharmacology*, 31, 2133–2136.
- Cornelis, P., 2000, Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments, *Current Opinion in Biotechnology*, 11 (5), 450–454.
- Cornuel, J.F., Moraillon, A. and Gueron, M., 2002, Participation of yeast inosine 5'-monophosphate dehydrogenase in an in vitro complex with a fragment of the C-rich telomeric strand, *Biochimie*, 84 (4), 279-289.
- Crabtree, G.W. and Henderson, J.F., 1971, Rate-limiting steps in the interconversion of purine ribonucleotides in ehrlich ascites tumor cells in vitro, *Cancer Research*, 31, 985-991.

- Decottignies, A., Sanchez-Perez, I. and Nurse, P., 2003, *Schizosaccharomyces pombe* essential genes: a pilot study, *Genome Research*, 13, 399-406.
- Digits, J.A. and Hedstrom, L., 1999, Kinetic mechanism of *Tritrichomonas foetus* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Biochemistry*, 38 (8), 2295-2306.
- Egel, R., 2004, *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN 978-3642056314.
- Feldmann, H., 2009, *Yeast: Molecular and Cell Biology*, Wiley, Germany, ISBN-13: 978-3527332526.
- Fleming, M.A., Chambers, S.P., Connely, P.R., Nimmesgern, E., Fox, T., Bruzzese, F.J., Hoe, S.T., Fulghum, J.R., Livingston, D.J., Stuver, C.M., Sintchak, M.D., Wilson, K.P. and Thomson, J.A., 1996, Inhibition of IMPDH by mycophenolic acid: dissection of forward and reverse pathways using capillary electrophoresis, *Biochemistry*, 35, 6990-6997.
- Fernández-Álvarez, A., Elías-Villalobos, A. and Ibeas, J.I., 2009, The O-mannosyltransferase PMT4 is essential for normal appressorium formation and penetration in *Ustilago maydis*, *The Plant Cell*, 21, 3397-3412.
- Franklin, T.J. and Cook, J.M., 1969, The inhibition of nucleic acid synthesis by mycophenolic acid, *Biochemical Journal*, 113, 515-524.
- Franklin, T.J., Jacobs, V., Jones, G., Ple, P. and Bruneau, P., 1996, Glucuronidation associated with intrinsic resistance to mycophenolic acid in human colorectal carcinoma cells, *Cancer Research*, 56 (5), 984-987.
- Frost, A., Elgort, M.G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S.R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M.Y., Poser, I., Mann, M., Hyman, A.A. AND Weissman, J.S., 2012, Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions, *Cell*, 149, 1339-1352.
- Galli-Taliadoros, L.A., Sedgwick, J.D., Wood, S.A. and Korner, H., 1995, Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice, *Journal of Immunological Methods*, 181, 1-15.
- Giga-Hama, Y. and Kumagai, H., 1999, Expression system for foreign genes using the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30, 235-244.
- Gilbert, H., Lowe, C. and Drabble, W., 1979, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Purification by affinity chromatography, subunit structure and inhibition by guanosine 5'-monophosphate, *Biochemical Journal*, 183 (3), 481-494.

- Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F., Heyneker, H.L., Yansura, D.G., Crea, R., Hirose, T., Kraszewski, A., Itakura, K. and Riggs, A.D., 1979, Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized genes for human insulin, *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, 76 (1), 106-110.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Phillippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G., 1996, Life with 6000 genes, *Science*, 274, 546-567.
- Goldstein, B.M. and Colby, T.D., 1999, IMP dehydrogenase : structural aspects of inhibitor binding, *Current Medicinal Chemistry*, 6 (7), 519-536.
- Gregan, J., Rabitsch, P.K., Rumpf, C., Novatchkova, M., Schleiffer, A. and Nasmyth, K., 2006, High-throughput knockout screen in fission yeast, *Nature Protocols*, 1 (5), 2457-2464.
- Gu, J.J., Kaiser-Rogers, K., Rao, K. and Mitchell, B.S., 1994, Assignment of the human type I IMP dehydrogenase gene (IMPDH1) to chromosome 7q31.3-q32, *Genomics*, 24, 179-181.
- Gu, J.J., Tolin, A.K., Jain, J., Huang, H., Santiago, L. and Mitchell, B.S., 2003, Targeted disruption of the inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I gene in mice, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (18), 6702-6712.
- Gutz, H., Heslot, H., Leupold, U. and Loprieno, N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, *Handbook of Genetics*, Vol. 1., New York and London, 395-446.
- Hager, P.W., Collart, F.R., Huberman, E. and Mitchell, B.S., 1995, Recombinant human inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II proteins. Purification and characterization of inhibitor binding, *Biochemical Pharmacology*, 49 (9), 1323-1329.
- Haglund, S., Taipalensuu, J., Peterson, C. and Almer, S., 2007, IMPDH activity in thiopurine-treated patients with inflammatory bowel disease – relation to TPMT activity and metabolite concentrations, *British Journal of Clinical Pharmacology*, 65 (1), 69-77.
- Hartwell, L.H., 2004, Yeast and cancer, *Bioscience Reports*, 24, 523-544.
- Hastings, P.J., McGill, C., Shafer, B. and Strathern, J.N., 1993, Ends-in versus ends-out recombination in yeast, *Genetics*, 135, 973-980.
- Hedstrom, L., Cheung, K.S. and Wang, C.C., 1990, A novel mechanism of mycophenolic acid resistance in the protozoan parasite *Tritrichomonas foetus*, *Biochemical Pharmacology*, 39 (1), 151-160.
- Hedstrom, L., 2009, IMP Dehydrogenase: structure, mechanism, and inhibition, *Chemical Reviews*, 109, 2903-2928.

- Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., 1978, Transformation of yeast, *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, 75, 1929-1933.
- Huete-Perez, J.A., Wu, J.C., Witby, F.G. and wang, C.C., 1995, Identification of the IMP binding site in the IMP dehydrogenase from *Trichomonas foetus*, *Biochemistry*, 34 (42), 13889-13894.
- Hupe, D., Azzolina, B. and Behrens, N., 1986, IMP dehydrogenase from the intracellular parasitic protozoan *Eimeria tenella* and its inhibition by mycophenolic acid, *Journal of Biological Chemistry*, 261, 8363-8369.
- Ingle, E. and Hemmings, B.A., 2000, PKB/Akt interacts with inosine-5' monophosphate dehydrogenase through its pleckstrin homology domain, *FEBS Letters*, 478 (3), 253-259.
- Ishikawa, H., 1999, Mizoribine and mycophenolate mofetil, *Current Medicinal Chemistry*, 6 (7), 575-597.
- Jackson, R.C., Weber, G. and Morris, H.P., 1975, IMP dehydrogenase, an enzyme linked with proliferation and malignancy, *Nature*, 256, 331-333.
- Jain, J., Almquist, S.J., Ford, P.J., Shlyakhter, D., Wang, Y., Nimmesgern, E. and Germann, U.A., 2004, Regulation of inosine monophosphate dehydrogenase type I and type II isoforms in human lymphocytes, *Biochemical Pharmacology*, 67, 767.
- Jancso, M.A., Sculaccio, S.A. and Thiemann, O.H., 2001, Identification of sugarcane genes involved in the purine synthesis pathway, *Genetics and Molecular Biology*, 24 (1-4), 251-255.
- Jiang, L., Zhao, J., Guo, R., Li, J., Yu, L. and Xu, D., 2010, Functional characterization and virulence study of ADE8 and GUA1 genes involved in the de novo purine biosynthesis in *Candida albicans*, *FEMS Yeast Research*, 10 (2), 199-208.
- Jiménez, A. and Davies, J., 1980, Expression of a transposable antibiotic resistance element in *Saccharomyces*, *Nature*, 287, 869-871.
- Jiménez, A., Santos, M.A. and Revuelta, J.L., 2008, Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase activity affects growth and riboflavin production in *Ashbya gossypii*, *BMC Biotechnology*, 8, 67.
- Jung, S., Smith, C.L., Lee, K., Hong, M., Kweon, D., Stephanopoulos, G. and Jin, Y., 2010, Restoration of growth phenotypes of *Escherichia coli* DH5 α in minimal media through reversal of a point mutation in *purB*, *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (18), 6307-6309.
- Karaer, S., Topal-Sarıkaya, A., Arda, N. and Temizkan, G., 2006, The 3' terminal sequence of the inosine monophosphate dehydrogenase gene encodes an active domain in the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics and Molecular Biology*, 29 (3), 551-557.

- Karp, G., 2010, *Cell and molecular biology concepts and experiments*, Sixth Edition, United States of America, ISBN-13: 978-0470483374.
- Kaur, R., Ingavale, S.S., and Bachhawat, A.K., 1997, PCR-mediated direct gene disruption in *Schizosaccharomyces pombe*, *Nucleic Acids Research*, 25, 1080-1081.
- Kawashima, S.A., Takemoto, A., Nurse, P. and Kapoor, T.M., 2012, Analyzing fission yeast multidrug resistance mechanisms to develop a genetically tractable model system for chemical biology, *Chemistry & Biology*, 19, 893-901.
- Kemp, B.E., 2004, Bateman domains and adenosine derivatives form a binding contract, *Journal of Clinical Investigation*, 113 (2), 182-184.
- Kim, D.U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H.O., Won, M., Yoo, H.S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G. et al., 2010, Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature Biotechnology*, 28, 617–623.
- Klar, A.J.S. and Bonaduce, M.J., 2013, Unbiased segregation of fission yeast chromosome 2 strands to daughter cells, *Chromosome Research*, 21, 297-309.
- Kobashigawa, J., Miller, L., Renlund, D., Mentzer, R., Alderman, E., Bourge, R., Costanzo, M., Eisen, H., Dureau, G., Ratkovec, R., Hummel, M., Ipe, D., Johnson, J., Keogh, A., Mamelok, R., Mancini, D., Smart, F. and Valantine, H., 1998, A randomized active-controlled trial of mycophenolate mofetil in heart transplant recipients: mycophenolate mofetil investigators, *Transplantation*, 66 (4), 507–515.
- Kohli, J., Hottinger, H., Munz, P., Strauss, A. and thuriaux, P., 1977, Genetic mapping in *Schizosaccharomyces pombe* by mitotic and meiotic analysis and induced haploidization, *Genetics*, 87 (3), 471-489.
- Kost-Alimova, M.V., Glesne, D.A., Huberman, E. and Zelenin, A.V., 1998, Assignment1 of inosine-5'-monophosphate dehydrogenase type 2 (IMPDH2) to human chromosome band 3p21.2 by in situ hybridization, *Cytogenetics and Cell Genetics*, 82, 145–146.
- Krawchuk, M.D. and Wahls, W.P., 1999, High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, pcr-based approach with long tracts of flanking homology, *Yeast*, 15 (13), 1419-1427.
- Kusumi, T., Tsuda, M., Katsunuma, T. and Yamamura, M., 1989, Dual inhibitory effect of bredinin, *Cell Biochemistry & Function*, 7 (4), 201–204.
- Lang, B.F., Cedergren, R. and Gray, M.W., 1987, The mitochondrial genome of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. Sequence of the large-subunit ribosomal RNA gene, comparison of potential secondary structure in fungal mitochondrial large-subunit rRNAs and evolutionary considerations, *European Journal of Biochemistry*, 169 (3), 527-537.

- Lee, S.Y., 1996, High cell-density culture of *Escherichia coli*, *Trends in Biotechnology*, 14 (3), 98–105.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M., 2005, *Lehninger principles of biochemistry*, Fourth Edition, New York, ISBN-13: 9780716743392.
- Lindstrom, D.L., Squazzo, S.L., Muster, N., Burckin, T.A., Wachter, K.C., Emigh, C.A., McCleery, J.A., Yates, J.R., 3rd and Hartzog, G.A., 2003, Dual roles for Spt5 in pre-mRNA processing and transcription elongation revealed by identification of Spt5-associated proteins, *Molecular and Cellular Biology*, 23 (4), 1368-1378.
- Liu, Y., Bohn, S.A. and Sherley, J.L., 1998, Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase is a rate-determining factor for p53-dependent growth regulation, *Molecular Biology of the Cell*, 9 (1), 15-28.
- Long, H., Cameron, S., Yu, L. and Rao, Y., 2006, De novo GMP synthesis is required for axon guidance in *Drosophila*, *Genetics*, 172 (3), 1633-1642.
- Lum, P.Y., Armour, C.D., Stepanian S, S.B., Cavet, G., Wolf, M.K., Butler, J.S., Hinshaw, J.C., Garnier, P., Prestwich, G.D., Leonardson, A., Garrett-Engele, P., Rush, C.M., Bard, M., Schimmack, G., Philips, J.W., Roberts, C.J. and Shoemaker D.D., 2004, Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes, *Cell*, 116 (1), 121–137.
- Lundblad, V. and Struhl, K., 2008, *Current Protocols in Molecular Biology*, Chapter 13, Yeast, John Wiley & Sons, Inc., ISBN: 9780471142720.
- Magasanik, B., Moyed, H.S. and Gehring, L.B., 1957, Enzymes essential for the biosynthesis of nucleic acid guanine; inosine 5'-phosphate dehydrogenase of *Aerobacter aerogenes*, *Journal of Biological Chemistry*, 226, 339-350.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R., Deng, C.X. and Capecchi, M.R., 1990, Introduction of a lacZ reporter gene into the mouse int-2 locus by homologous recombination, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 7688-7692.
- Marr, J.J., 1991, Purine analogs as chemotherapeutic agents in Leishmaniasis and American Trypanosomiasis, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 118 (2), 111-119.
- Mattam, A.J. and Yazdani, S.S., 2013, Engineering *E. coli* strain for conversion of short chain fatty acids to bioalcohols, *Biotechnology for Biofuels*, 6, 128.
- McGinnis, S. and Madden, T.L., 2004, BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools, *Nucleic Acids Research*, 32, W20-W25.
- Mclean, J.E., Hamaguchi, N., Belenky, P., Mortimer, S.E., Stanton, M. and Hedstrom, L., 2004, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase binds nucleic acids in vitro and in vivo, *Biochemical Journal*, 379 (2), 243-251.

- Mitrikeski, P.T., 2012, Gene knockout: the technology of gene targeting, *Third Annual Conference for Biotechnology and Transplantation*, Skopje, Macedonia.
- Moore, J.H., 2007, Bioinformatics, *Journal of Cellular Physiology*, 213, 365–369.
- Morrow, C.A., Valkov, E., Stamp, A., Chow, E.W.L., Lee, I.R., Wronski, A., Williams, S.J., Hill, J.M., Djordjevic, J.T., Kappler, U., Kobe, B. And Fraser, J.A., 2012, De novo GTP biosynthesis is critical for virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*, *PLOS Pathogens*, 8 (10), e1002957.
- Mortensen, R., 2002, Overview of gene targeting by homologous recombination, *Current Protocols in Neuroscience*, 4.29.1-4.29.10.
- Mortimer, S.E. and Hedstrom, L., 2005, Autosomal dominant retinitis pigmentosa mutations in inosine 5'-monophosphate dehydrogenase type I disrupt nucleic acid binding, *Biochemical Journal*, 390, 41-47.
- Mortimer, S.E., Xu, D., McGrew, D., Hamaguchi, N., Lim, H.C., Bowne, S.J., Daiger, S.P. and Hedstrom, L., 2008, IMP dehydrogenase type 1 associates with polyribosomes translating rhodopsin mRNA, *Journal of Biological Chemistry*, 283 (52), 36354-36360.
- Nair, V., 2005, IMPDH inhibitors: discovery of antiviral agents against emerging diseases, *Antiviral Drug Discovery for Emerging Diseases and Bioterrorism Threats*, Chapter 8, 179–202.
- Nair, V. and Kamboj, R.C., 2003, Inhibition of inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) by 2-[2-(Z)-Fluorovinyl] inosine 5'-monophosphate, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13, 645-647.
- Nair, V. and Shu, Q., 2007, Inosine monophosphate dehydrogenase as a probe in antiviral drug discovery, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 18 (5), 245-258.
- Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G. and Suzuki, K., 1990, Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 5292-5295.
- Nimmegern, E., BLACK, J., FUTER, O., FULGHUM, J.R., CHAMBERS, S.P., BRUMMEL, C.L., RAYBUCK, S.A. and Sintchak, M.D., 1999, Biochemical analysis of the modular enzyme inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Protein Expression and Purification*, 17, 282-289.
- Oka, A., Sugisaki H. and Takanami M., 1981, Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903, *Journal of Molecular Biology*, 147 (2), 217-226.
- Olah, E., Kokeny, S., Papp, J., Bozsik, A. and Keszei, M., 2006, Modulation of cancer pathways by inhibitors of guanylate metabolism, *Advances in Enzyme Regulation*, 46, 176-190.

- Oraler, G., Olgun, A., and Karaer, S., 1990, An addition to the chromosome map of *Schizosaccharomyces pombe*: the localization of gua genes, *Current Genetics*, 17, 543-545.
- Papageorgiou, C., 2001, Enterohepatic recirculation: a powerful incentive for drug discovery in the inosine monophosphate dehydrogenase field, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 1 (1), 71-77.
- Pichlmayr, R. et al., 1995, Placebo-controlled study of mycophenolate mofetil combined with cyclosporin and corticosteroids for prevention of acute rejection, *Lancet*, 345 (8961), 1321-1325.
- Pidoux, A.L and Allshire, R.C., 2005, The role of heterochromatin in centromere function, *Philosophical Transaction of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, 360 (1455), 569-79.
- Pugh, M.E. and Skibo, E.B., 1993, Inosine monophosphate dehydrogenase from porcine (*Sus scrofa domestica*) thymus: purification and properties, *Comparative Biochemistry and Physiology:Part B*, 105 (2), 381-387.
- Rao, V. A., Shepherd, S.M., Owen, R. and Hunter, W.N., 2013, Structure of *Pseudomonas aeruginosa* inosine 5'-monophosphate dehydrogenase, *Acta Crystallographica*, F69, 243-247.
- Ratcliffe, A.J., 2006, Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitors for the treatment of autoimmune diseases, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 9 (5), 595-605.
- Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D.A., Haas, B.J., Habib, N., Wapinski, I., Roy, S., Lin, M.F., Heiman, D.I., Young, S.K., Furuya, K., Guo, Y., Pidoux, A., Chen, H.M., Robbertse, B., Goldberg, J.M., Aoki, K., Bayne, E.H., Berlin, A.M., Desjardins, C.A., Dobbs, E., Dukaj, L., Fan, L., Fitzgerald, M.G., French, C., Gujja, S., Hansen, K., Keifenheim, D., Levin, J.Z., Mosher, R.A., Muller, C.A., Pfiffner, J., Priest, M., Russ, C., Smialowska, A., Swoboda, P., Sykes, S.M., Vaughn, M., Vengrova, S., Yoder, R., Zeng, Q., Allshire, R., Baulcombe, D., Birren, B.W., Brown, W., Ekwall, K., Kellis, M., Leatherwood, J., Levin, H., Margalit, H., Martienssen, R., Nieduszynski, C.A., Spatafora, J.W., Friedman, N., Dalggaard, J.Z., Baumann, P., Niki, H., Regev, A. and Nusbaum, C., 2011, Comparative functional genomics of the fission yeasts, *Science*, 332, 930-936.
- Robertson, E.J., 1991, Using embryonic stem cells to introduce mutations into the mouse germ line, *Biology of Reproduction*, 44 (2), 238-245.
- Rothstein, R.J., 1983, One-step gene disruption in yeast, *Methods in Enzymology*, 101, 202-211.
- Rumpf, C., Cipak, L., Novatchkova, M., Li, Z., Polakova, S., Dudas, A., Kovacikova, I., Maidokova, E., Ammerer, G. and Gregan, J., 2010, High-throughput knockout screen in *Schizosaccharomyces pombe* identifies a novel gene required for efficient homolog disjunction during meiosis I, *Cell Cycle*, 9 (9), 1802-1808.

- Sabatinos, S.A. and Forsburg, S.L., 2010, Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in Enzymology*, 470, 759–795.
- Sasaki, M., Kumagai, H., Takegawa, K. and Tohda, H., 2013, Characterization of genome-reduced fission yeast strains, *Nucleic Acids Research*, 41, 5382-5399.
- Sawitzke, J.A., Thomason, L.C., Bubunencko, M., Li, X., Costantino, N. and Court, D.L., 2013, Recombineering: using drug cassettes to knock out genes in vivo, *Methods in enzymology*, 79-102.
- Shaw, L.M., Sollinger, H.W., Halloran, P., Morris, R.E., Yatscoff, R.W., Ransom, J., Tsina, I., Keown, P., Holt, D.W., Lieberman, R., Jaklitsch, A. and Potter, J., 1995, Mycophenolate mofetil: a report of the consensus panel, *Therapeutic Drug Monitoring*, 17 (6), 690–699.
- Sherley, J.L., 1991, Guanine nucleotide biosynthesis is regulated by the cellular p53 concentration, *Journal of Biological Chemistry*, 266, 24815-24828.
- Shu, Q. and Nair, V., 2008, Inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) as a target in drug discovery, *Medicinal Research Rewievs*, 28, 219-232.
- Singleton, P., 1999, *Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine*, 5th ed., Wiley, 444–454, England, ISBN: 978-0-470-09027-5.
- Sintchak M.D. and Nimmesgern E., 2000, The structure of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase and the design of novel inhibitors, *Immunopharmacology*, 47, 163-184.
- Sintchak, M.D., Fleming, M.A., Futer, O., Raybuck, S.A., Chambers, S.P., Caron, P.R., Murcko, M. and Wilson K.P., 1996, Structure and mechanism of inosine monophosphate dehydrogenase in complex with the immunosuppressant Mycophenolic Acid, *Cell*, 85 (6), 921-930.
- Smith, C.L., Matsumoto, T., Niwa, O., Klco, S., Fan, J.B., Yanagida, M. and Cantor, C.R., 1987, An electrophoretic karyotype for *Schizosaccharomyces pombe* by pulsed field gel electrophoresis, *Nucleic Acids Research*, 15, 4481-4491.
- Snyder, F.F., Henderson, J.F. and Cook, D.A., 1972, Inhibition of purine metabolism - computer-assisted analysis of drug effects, *Biochemical Pharmacology*, 21, 2351-2357.
- Spirek, M., Benko, Z., Carnecka, M., Rumpf, C., Cipak, L., Batova, M., Marova, M.N., Kim, D., Park, H., Hayles, J., Hoe, K.L., Nurse, P. And Gegan, J., 2010, *S. pombe* genome deletion project: an update, *Cell Cycle*, 9 (12), 2399-2402.
- Steiner, S. and Philippsen, P., 1994, Sequence and promoter analysis of the highly expressed TEF gene of the filamentous fungus *Ashbya gossypii*, *Molecular and General Genetics*, 242, 263-271.

- Stevens, S.W., Ryan, D.E., Ge, H.Y., Moore, R.E., Young, M.K., Lee, T.D. and Abelson, J., 2002, Composition and functional characterization of the yeast spliceosomal penta-snRNP, *Molecular Cell*, 9 (1), 31-44.
- Streeter, D.G., Witkowski, J.T., Khare, G.P., Sidwell, R.W., Bauer, R.J., Robins, R.K. and Simon, L.N., 1973, Mechanism of action of 1- β -D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide (virazole), a new broad-spectrum antiviral agent, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70, 1174–1178.
- Stryer, L., 1995, *Biochemistry*, 4th edition, W.H. Freeman & Co., New York, 739-743, ISBN-13: 978-0716720096.
- Suter, B., Auerbach, D. and Stagljar, I., 2006, Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond, *BioTechniques*, 40, 625-644.
- Takegawa, K., Tohda, H., Sasaki, M., Idiris, A., Ohashi, T., Mukaiyama, H., Giga-Hama, Y. and Kumagai, H., 2009, Production of heterologous proteins using the fission-yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) expression system, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 53, 227–235.
- Thomas, K.R. and Capecchi, M.R., 1987, Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, *Cell*, 51, 503-512.
- Turner, J.F. and King, J.E., 1961, Inosine 5'-phosphate dehydrogenase of pea seeds, *Biochemical Journal*, 79, 147.
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T.A., Judson, R.S., Knight, J.R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. And Rothberg, J.M., 2000, A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature*, 403 (6770), 623-627.
- Umejiego, N.N., Li, C., Riera, T., Hedstrom, L. and Striepen, B., 2004, *Cryptosporidium parvum* IMP dehydrogenase: identification of functional, structural, and dynamic properties that can be exploited for drug design, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (39), 40320-40327.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al., 2001, The sequence of the human genome, *Science*, 291, 1304–1351.
- Verham, R., Meek, T.D., Hedstrom, L. and Wang, C.C., 1987, Purification, characterization and kinetic analysis of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase of *Tritrichomonas foetus*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24, 1.
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. and Philippsen, P., 1994, New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 10 (13), 1793-1808.

- Wach, A., 1996, PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*, *Yeast*, 12, 259-265.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C. and Philippsen, P., 1997, Heterologous HIS3 Marker and GFP Reporter Modules for PCR-Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 13, 1065-1075.
- Wach, A., Brachat, A., Rebischung, C., Steiner, S., Pokorni, K., Heesen, S. and Philippsen, P., 1998, PCR-Based Gene Targeting in *Saccharomyces cerevisiae*, *Methods in Microbiology*, 26, 67-81.
- Weaver, R.F., 2011, *Molecular Biology*, 5 ed., McGraw-Hill, New York, ISBN: 978-0-07-352532-7.
- Weber, G., 1983, Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy, *Cancer Research*, 43 (8), 3466-3492.
- Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D. et al., 1999, Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science*, 285, 901-906.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., et al., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871-880.
- Wu, T. and Scrimgeour, K., 1973, Properties of inosinic acid dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. I. Purification and physical properties, *Canadian Journal of Biochemistry*, 51, 1380-1390.
- Wu, J.C., 1994, Myophenolate mofetil: molecular mechanism of action, *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 2, 185-204.
- Yoshioka, S., Kato, K., Nakai, K., Okayama, H. and Nojima, H., 1997, Identification of open reading frames in *Schizosaccharomyces pombe* cDNAs, *DNA Research*, 4, 363-369.
- Zimmer, A., 1992, Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells, *Annual Review of Neuroscience*, 15, 115-137.
- (http://mendel.imp.ac.at/Pombe_deletion/) [Ziyaret tarihi: 26.06.2013]
- (https://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/yeast_plasmids/pFA6-kanMX4/) [Ziyaret tarihi: 06.01.2014]
- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2540315>) [Ziyaret tarihi: 08.02.2014]
- (<https://www.mousephenotype.org>) [Ziyaret tarihi: 26.10.2014]
- (<http://www.pombase.org/status/statistics>) [Ziyaret tarihi: 1.12.2014]

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Merve Yilmazer
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	06.09.1989 / Bakırköy
Telefon	05556280630
E-mail	merve.yilmazer@istanbul.edu.tr

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/ Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı / Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı	2014
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011
	İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (ÇAP)	2012
Lise	Cağaloğlu Anadolu Lisesi	2007

Makaleler / Bildiriler

Arda E.Ş.N., Karaer S., Topal Sarıkaya A. , Yilmazer M., Kiraz Y., Boke Sarıkahya N., Kırmızıgül S., "Inhibitory Effect Of Scoposide C, A Triterpene Glycoside On Impdh Activity In <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ", Pombe 2013-Embo Conference, INGILTERE, 24-29 Haziran 2013. (Poster)
Tarhan Ç., Şatır T.M., Yilmazer M., Karaer S., "Hydrocortisone Effect On <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 's Rad17+ Gene Expression.", Pombe 2013-Embo Conference, INGILTERE, 24-29 Haziran 2013. (Poster)