



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'de FAP1 PROTEİNİNİN
APOPTOZDAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İrem KARAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Ağustos, 2024

İSTANBUL

Bu çalışma, 15.08.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoteknoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Cüneyt UÇARLI
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Gülşen UZ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 39631 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Prof.Dr. Bedia PALABIYIK'a,

Tez çalışmamda sonsuz yardım ve destekte bulunan Araş.Gör.Burcu KARTAL SURAL'a,
Araş.Gör.Merve YILMAZER'e,

Yüksek lisans yolculuğumda beraber ilerlediğim, olumlu olumsuz her koşulda birlikte üstesinden geldiğimiz laboratuvar partnerim Umut KARATEKİN'e,

İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünün bana kazandırdığı canım dostlarım Gökçe ERCAN'a, Volkan SARI'ya ve Barış GÜL'e

Hayatımın her anında en büyük destekçim, hayat arkadaşım Atakan GENÇ'e,

Beni bu zamanlara bin bir emekle getiren, her koşulda arkamda olan en büyük dayanağım aileme,

sonsuz teşekkürlerimi sunarım ..

Ağustos 2024

İrem KARAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 <i>SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE</i>	2
2.1.1. Model organizma olarak <i>S.pombe</i>	2
2.1.2. <i>S.pombe</i> Yaşam Döngüsü	3
2.2. MAYADA ENDOPLAZMİK RETİKULUM YAPISI VE İŞLEVİ	5
2.2.1.Endoplazmik Retikulum Stresi	6
2.3. ER STRESİNE BAĞLI GELİŞEN HÜCRE ÖLÜMÜ	7
2.3.1. Otofaji	7
2.3.2 Apoptoz.....	9
2.4. TUNİKAMİSİN.....	11
2.5. FAP1 GENİ VE L-PIPECOLATE OXİDASE.....	12
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
3.1. ORGANİZMALAR, GEN VE PLAZMİDLER.....	14
3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI.....	15
3.2.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üretimi ve Saklanması	15
3.2.2. <i>E. coli DH5α</i> Suşunun Üretimi ve Saklanması.....	18
3.3 GENETİK ANALİZLER	19
3.3.1 <i>S. pombe</i> 'den Genomik DNA İzolasyonu	19
3.3.2. <i>S.pombe</i> 'de <i>fap1</i> Geninin PZR ile çoğaltılması	20
3.4 REKOMBİNANT VEKTÖR ELDESİ	21
3.4.1. pSGP572 Vektörünün İzolasyonu	21

3.4.2 pSGP572 Vektörünün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi ve Jelden Geri Kazanılması.....	23
3.4.3. pSGP572 Vektörü ile <i>fap1</i> Geninin Ligasyonu	25
3.4.4. Ligasyon Ürünlerinin <i>E. coli DH5α</i> Suşuna Transformasyonu.....	25
3.4.5. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu İçin Yeterli <i>E. coli DH5α</i> Hücrelerinin Hazırlanması.....	25
3.4.6. Ligasyon Ürününün Yeterli <i>E. coli DH5α</i> Hücrelerine Transformasyonu	25
3.4.7. Rekombinant Vektör Taşıyan Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi	26
3.4.8. Rekombinant Vektörün <i>E. coli</i> Hücrelerinden İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimi ile Kesimi.....	27
3.4.9. Rekombinant Vektörün Dizi Analizi ile Kontrolü	28
3.4.10. Vektörün <i>S. pombe</i> Irklarına Transformasyonu	28
3.4.11. Rekombinant Transformant Kolonilerin Kontrol Edilmesi	29
3.5. FİZYOLOJİK ANALİZLER.....	29
3.5.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması	29
3.6. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN UYGULANMASI	30
3.6.1. ER Stresinin Canlılık Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	31
3.7. PROTEİN ANALİZLERİ	31
3.7.1. Hücrelerde Proteozomal Aktivitenin Belirlenmesi	31
3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ	33
3.9. MİKROSKOBİK İNCELEME.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. <i>S. POMBE</i> IRKLARININ GENOTİPİK KONTROLÜ	36
4.1.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Seçici Besiyerinde Üreme Özellikleri.....	36
4.1.2. <i>S. pombe</i> Irklarının PZR ile Genotipik Kontrolü	37
4.2 REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN OLUŞTURULMASI	37
4.2.1. <i>S. pombe</i> 'den genomik DNA İzolasyonu	37
4.2.2 <i>S. pombe</i> <i>Fap1</i> Geninin PZR ile Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi	38
4.2.3. pSGP572 Plazmidinin İzolasyonu, Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi ve Jelden Geri Kazanılması	39
4.2.4. pSGP572 ile <i>fap1</i> Geninin Ligasyonu ve Yeterli <i>E. coli DH5α</i> Hücrelerine Transformasyonu.....	40
4.2.5. İK01 ve İK02 Rekombinant Plazmidlerin Sekans Analizi ile Doğrulanması.....	42
4.3. İK02 PLAZMİDİNİN <i>S. POMBE</i> 'YE TRANSFERİ	44
4.3.1. <i>S. pombe</i> Irklarının Üreme Eğrilerinin Çıkarılması	44

4.3.2. IK02 Rekombinant Plazmidinin <i>S. pombe</i> Irklarına Transferi	46
4.3.3. Transformant <i>S. pombe</i> Hücrelerinin Floresan Mikroskopta Teyidi.....	48
4.3.4. Tüm <i>S. pombe</i> Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması	49
4.4. <i>S. POMBE</i> IRKLARINDA TUNİKAMİSİNİN MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONUNUN (MIC) BELİRLENMESİ.....	50
4.5. TUNİKAMİSİNİN ARACILI ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	51
4.6. TUNİKAMİSİNİN <i>S. POMBE</i> IRKLARINDAKİ PROTEOZOMAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİ.....	52
4.7. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ.....	53
4.8. RODAMİN 123 İLE MİTOKONDRIYAL MEMBRAN POTANSİYELİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ.....	54
4.9. HÜCRELERDE TUNİKAMİSİNİN CANLILIK VE APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ	55
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	67

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1: ER Yapısı	5
Şekil 2.2: UPR'nin ana sinyal yolları.....	7
Şekil 2.3: UPR aracılı otofaji ve kısmi mekanizmalar	8
Şekil 2.4: UPR aracılı apoptoz ve kısmi mekanizmalar	10
Şekil 2.5: Tunikamisin'in Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2.6: L-Pipecolate reaksiyon.....	13
Şekil 3.1: pSGP572 plazmidinin restriksiyon haritası.....	23
Şekil 4.1: Genotipik kontrol için selektif besiyerlerine (A: MMA+Adenin; B: MMA; C: MMA+Adenin; D: MMA+Adenin+Urasil+Lösin) ekilmiş <i>S. pombe</i> EDD666, 972h ⁻ ve <i>fap1Δ</i> ırklarının üreme profilleri.....	36
Şekil 4.2: Çalışmada kullanılan <i>fap1Δ</i> ırkının <i>fap1</i> geni bakımından PZR ile kontrolü. Sol baştan sırasıyla M: NEB 1kb Plus DNA Ladder; 1: ED666 Genomik DNA'sı ;2: <i>fap1Δ</i> genomik DNA'sı;3: Negatif kontrol;4: Negatif kontrol	37
Şekil 4.3: <i>S.pombe</i> yabancı ırkında izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü (Sol baştan sırasıyla M: Thermo Scientific Lambda DNA/HindIII Marker; 1 ve 2: <i>S. pombe</i> genomik DNA'sı	38
Şekil 4.4: <i>fap1</i> geninin <i>Bgl</i> III ve <i>Not</i> I enzimleriyle kesimi sonrasında saflaştırılması (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: Saflaştırılan kesim ürünü.....	38
Şekil 4.5: pSGP572 plazmidinin <i>Bgl</i> III ve <i>Not</i> I enzimleriyle kesimi (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pSGP572 <i>Bgl</i> III + <i>Not</i> I kesim ürünü).....	39
Şekil 4.6: pSGP572 plazmidinin jelden geri kazanımı sonrası kontrol edilmesi (Sol baştan sırasıyla1: pSGP572 jelden geri kazanım ürünü; M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder).....	40
Şekil 4.7: Ligasyon ürünlerinin <i>E. coli</i> DH5α suşuna transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin koloni PZR ile kontrolü. (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: 1 numaralı koloni; 2: 2 numaralı koloni.	41
Şekil 4.8: pSGP572/ <i>fap1Δ</i> plazmidleri EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesildikten sonra kontrolü (Sol baştan sırasıyla 2: pSGP572/ <i>fap1Δ</i> plazmidi (1); 1: pSGP572/ <i>fap1Δ</i> plazmidi; M:GeneRuler 1 kb DNA Ladder)	42

Şekil 4.9: Dizilemede nmt ileri primeri ile elde edilen dizileme sonucu.....	43
Şekil 4.10: Dizilemede GFP geri primeri ile elde edilen dizileme sonucu	43
Şekil 4.11: İK02 Plazmidinin restriksiyon haritası.....	44
Şekil 4.12: <i>fap1Δ</i> ve <i>ED666</i> ırklarına ait üreme eğrisi	45
Şekil 4.13: Elektroporasyon sonrasında selektif besiyerinde üreyen koloniler. (A: pSGP572 plazmidinin <i>ED666</i> hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler; B: pSGP572 plazmidinin <i>fap1Δ</i> hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde ü üreyen koloniler C: pSGP572/ <i>fap1Δ</i> plazmidinin <i>ED666</i> hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler; D: pSGP572/ <i>fap1Δ</i> plazmidinin <i>fap1Δ</i> hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler.....	46
Şekil 4.14: pSGP572 boş plazmidinin <i>S. pombe</i> 'ye transformasyonu. Sol baştan sırasıyla GeneRuler 1 kb DNA Ladder; transformasyon ürünü, Negatif kontrol.	47
Şekil 4.15: Koloni PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. Sol baştan sırasıyla M, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, <i>fap1(1)</i> 1,2,3,4,5; <i>fap1(2)</i> 1,2,3,4,5,6; <i>ED666</i>).....	47
Şekil 4.16: <i>fap1(1)</i> örneğine ait 3.ve <i>fap1(2)</i> örneğindeki 2.grup açılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. (Üstte sırasıyla M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; <i>fap1(1)</i> 1,2,3,4,5,6; <i>ED666(1)</i> 1,2,3, ;Alta sırasıyla M, GeneRuler 1kb DNA	48
Şekil 4.17: Tiaminli ve tiaminsiz EMM2 besiyerinde üretilen transformant <i>S. pombe</i> <i>İK02/ED666</i> ve <i>İK02/fap1Δ</i> hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.....	49
Şekil 4.18: A: <i>İK02/fap1Δ</i> ve <i>İK02/ED666</i> ; B: <i>ED666</i> ve pSGP572/ <i>ED666</i> ; C: <i>fap1Δ</i> ve pSGP572/ <i>fap1Δ</i> ; D: <i>fap1Δ</i> , pSGP572/ <i>fap1Δ</i> , <i>İK0/fap1 Δ</i> ve <i>İK02/ED666</i> ; E: <i>ED666</i> , pSGP572/ <i>ED666</i> , <i>fap1Δ</i> , pSGP572/ <i>fap1Δ</i> , <i>İK02/fap1Δ</i> ve <i>İK02/ ED666</i> ırklarına ait üreme eğrisi.....	49
Şekil 4.19: <i>S. pombe</i> <i>ED666</i> ırkına ait MİK eğrisi.....	51
Şekil 4.20: <i>S.pombe</i> ırklarına ait tunikamisinin farklı konsantrasyonlardaki canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar.....	52
Şekil 4.21: <i>S.pombe</i> ırklarına ait, tunikamisinin proteozomal aktivite üzerine etkisi	53
Şekil 4.22: <i>S.pombe</i> ırklarına ait hücre içi oksidasyon düzeyindeki değişim	54
Şekil 4.23: Rodamin 123 ile muamele edilen <i>S.pombe</i> ırklarına ait kontrol ve deney gruplarının floresan mikroskobu altındaki görüntüsü	55
Şekil 4.24: <i>S. pombe</i> <i>fap1Δ</i> ve <i>ED666</i> ırklarına ait kontrol ve deney gruplarının AO/EtBr ile muamelesi sonrası floresan mikroskop altındaki görüntüsü.....	56

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S.pombe</i> ve <i>E.coli</i> ırklarının özellikleri.....	14
Tablo 3.2: <i>S. pombe</i> 'nin üretiminde ve kontrolünde kullanılan besi ortamları	15
Tablo 3.3: <i>S. pombe</i> ırklarının üretiminde ve kontrolünde kullanılan stok solüsyonları	16
Tablo 3.4: Minimal Medium Agar (MMA)" Besiyer için kullanılan bileşenler	17
Tablo 3.5: LB besiyeri içerikleri	18
Tablo 3.6: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	20
Tablo 3.7: Klonlamada kullanılan genlere özgü primerler	20
Tablo 3.8: Klonlamada kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarı	20
Tablo 3.9: PZR Koşulları.....	21
Tablo 3.10: Plazmit izolasyonunda kullanılan tamponlar	22
Tablo 3.11: Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler	24
Tablo 3.12: Ligasyon reaksiyon bileşenleri.....	25
Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.....	27
Tablo 3.14: Kesim reaksiyonu bileşenleri	28
Tablo 3.15: Elektroporasyonda kullanılan solüsyonlar ve miktarları	29
Tablo 3.16: Hücre parçalama tamponu	32
Tablo 3.17: Lowry çözeltileri (Çözelti A:B:C =100:1: 1).....	32
Tablo 3.18: Proteozomal aktivite deney tamponu	33
Tablo 3.19: Rodamin boyama için kullanılan solüsyonlar	34
Tablo 4.1: Dizilemede kullanılan Primerler	41
Tablo 4.2: 0-34 saatleri aralığında parental ve fap1 ırkları için elde edilen değerler	45
Tablo 4.3: Suşlara ait generasyon sayıları ve süreleri.....	49

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
-	: Eksi, negatif
+	: pozitif
~	: Yaklaşık
°C	: Santigrad derece
μ	: Mikro
α	: Alfa
Δ	: Delta, delesyon

Kısaltmalar	Açıklama
Ade	: Adenin
Alg7p	: UDP-Nasetilglukozamin-1-P transferaz
AMC	: Amino-4- Metilkumarin
AO	: Akridin Orange
ATP	: Adenozin trifosfat
Bç	: Baz çifti
BiP	: Zincir Bağlayıcı Protein
cecER	: Merkezi Sarnıç Endoplazmik Retikulum
dH₂O	: Distile Su
DHCF-DA	: Dikloro-Dihidro Floresan Diasetal
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid
DTT	: Ditiyotritol
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EMM2	: Edinburgh Minimal Media 2
ER	: Endoplazmik Retikulum

ERAD	: Endoplazmik Retikulum ile İlişkili Yıkım
ERS	: Endoplazmik Retikulum Stresi
EtBr	: Etidyum Bromür:
F	: İleri
FAOD	: Fruktozil-amino asit oksidaz
GFP	: Yeşil Floresan Protein
GRP	: Glikozla Düzenlenen Protein
His	: Histidin
IRE1	: İnositol Gereken Enzim 1
kDa	: Kilodalton
LB	: Luria Bertani
Leu	: Lösin
Lis	: Lizin
M	: Molar
mg	: Miligram
MIC	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
MMA	: Minimal Medium Agar
mRNA	: Mesajlı Ribonükleik Asit
OD	: Optik Yoğunluk
OST	: Oligosakkariktransferaz
PBS	: Fosfat Tamponu
PERK	: Protein Kinaz RNA Benzeri ER Kinaz
pmaER	: Plazma Membranyla İlişkili ER
POX	: L-pipekolik asit oksidaz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

R	: Geri
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SOXs	: Sarkozin Oksidazlar
TAE	: Tris-Asetat-EDTA
TM	: Tunikamisin
tubER	: Boru Şeklindeki ER
UPR	: Katlanmamış Protein Yanıtı
Ura	: Urasil
UV	: Ultraviole
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Schizosaccharomyces pombe'de FAP1 PROTEİNİNİN APOPTOZDAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İrem KARAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Endoplazmik retikulum (ER) ökaryot hücrelerde yer alan, proteinin sentezlenmesi, taşınmasının yanı sıra kalsiyum depolanması ve lipidlerin sentezinde de önemli bir rol oynayan organeldir. ER çeşitli etkenlerden kaynaklı strese maruz kaldığı durumlarda homeostazi bozulur ve yanlış katlanmış ya da katlanmamış olan proteinler hücre içerisinde birikmeye başlar. Bu duruma ER stresi adı verilmektedir. Hücreler ER stresi durumunda, homeostazinin tekrardan eski durumuna dönebilmesi amacıyla ilk olarak bu yanlış katlanma ya da katlanamama sonucu olarak UPR (İng., “Unfolded Protein Response”) olarak adlandırılan yolak meydana getirir. Oluşan bu UPR yolağı insanda ve mayada farklılık göstermektedir. Ire1 (inositol gerekli enzim 1), ATF6 (aktive edici transkripsiyon faktörü 6), PERK (protein kinaz RNA benzeri ER kinaz), insanda bulunan bağımsız 3 yolağıdır. Mayalarda ise bunlardan sadece korunmuş bir şekilde Ire1 (inositol gerekli enzim 1) fazla miktarda yer almaktadır. UPR yolağı çeşitli sebeplerle oluşan yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikimini indirgeyebilmek için protein yıkım mekanizmasını çalıştırır. Ayrıca ER stresini azaltabilmek için aktif hale gelen UPR yolağı proteinlerin doğru bir şekilde katlanabilmesini sağlar. Hücre gereğinden fazla şiddette ya da

sürede strese maruz kaldığında homeostazın sağlanabilmesi mümkün olmaz. Bunun sonucuna bağlı olarak otofaji ve apoptoz gibi programlanmış hücre ölümleri UPR yolağı tarafından tetiklenir. ER stresinin tetiklediğı apoptozda moleküler mekanizmaların aydınlatılması için yapılan çalışmalarda *S. pombe* büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, *S. pombe*'de tunikamisin ile tetiklenen ER stresine karşı geliştirilen hücresel yanıtlardan biri olan apoptoz sürecinde Fap1 proteininin rolü ve hücresel stres yanıt yolları araştırılmıştır. *S. pombe fap1* geni kuvvetli bir *nmt1* promotörü ve 3' klonlama bölgesinde GFP marker geni içeren pSGP572 plazmidinde klonlanlandı ve rekombinant plazmid (pSGP: fap1, IK02) *S. pombe* parental ve *fap1* delesyonlu ırklara transfer edilerek rekombinant ırklar oluşturuldu. Transformantların hücre içi yerleşimi konfokal mikroskopta izlenerek ve üreme grafikleri çıkarılarak klonlamanın başarılı olduğu görüldü. Bu ırkların tunikamisinin IC50 dozuna hücre farkı olmadan yanıt verdiği görülse de proteozomal aktivitenin ve ROT'un Fap1 proteininin hücre içinde varlığına bağlı olduğunu düşündürdü. Buna karşın, membran potansiyeli ve apoptoz üzerindeki etkide Fap1 proteininin önemli olmadığı belirlendi.

Ağustos 2024, 84 sayfa.

Anahtar kelimeler: ER Stresi, tunikamisin, *S. pombe*, *fap1*

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF FAP1 PROTEIN ON APOPTOSIS IN *Schizosaccharomyces pombe*

İrem KARAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Endoplasmic reticulum (ER) is an organelle located in eukaryotic cells that plays an important role in protein synthesis and transport, as well as calcium storage and lipid synthesis. When the ER is exposed to stress due to various factors, homeostasis is disrupted and misfolded or unfolded proteins begin to accumulate within the cell. This situation is called ER stress. In case of ER stress, cells first create a pathway called UPR as a result of this misfolding or failure to fold, in order to restore homeostasis. This UPR pathway differs in humans and yeast. Ire1 (inositol required enzyme 1), ATF6 (activating transcription factor 6), PERK (protein kinase RNA-like ER kinase) are 3 independent pathways found in humans. In yeast, only Ire1 (inositol essential enzyme 1) is present in large amounts in a conserved form. The UPR pathway activates the protein degradation mechanism to reduce the accumulation of misfolded or unfolded proteins that occur for various reasons. In addition, the UPR pathway, which is activated to reduce ER stress, ensures that proteins can be folded correctly. When the cell is exposed to stress of greater intensity or duration than necessary, it is not possible to maintain homeostasis.

As a result, programmed cell deaths such as autophagy and apoptosis are triggered by the UPR pathway. *S. pombe* is of great importance in studies carried out to elucidate the molecular mechanisms in apoptosis triggered by ER stress. In this study, the role of Fap1 protein and cellular stress response pathways in the process of apoptosis, which is one of the cellular responses developed against ER stress triggered by tunicamycin in *S. pombe*, were investigated. The *S. pombe fap1* gene was cloned in the pSGP572 plasmid containing a strong nmt1 promoter and the GFP marker gene in the 3' cloning region, and the recombinant plasmid (pSGP: fap1, IK02) was transferred to *S. pombe* parental and *fap1* deletion strains to create recombinant strains. The intracellular localization of the transformants was monitored under a confocal microscope and the reproduction graphs were obtained to show that the cloning was successful. Although it was observed that these strains responded to the IC50 dose of tunicamycin without any cell differences, it was thought that proteasomal activity and ROS depend on the presence of Fap1 protein in the cell. On the other hand, it was determined that Fap1 protein was not important in the effect on membrane potential and apoptosis.

August 2024, 84 pages

Anahtar kelimeler: ER Stress, tunicamycin, *S. pombe*, *fap1*

1. GİRİŞ

Bir hücrenin ölme kararı, oldukça karmaşık biyolojik süreçlerle kontrol edilir. Bu süreçlerdeki herhangi bir bozukluk neoplazma veya nörodejenerasyon dahil birçok kompleks hastalığın patogenezine katkıda bulunur. 1997’de maya apoptozunun keşfinden bu yana (Madoe ve diğ., 1997), çok önemli memeli apoptotik proteinlerinin çoklu maya ortologları tanımlanmış, mitokondriyal ve epigenetik olarak düzenlenmiş hücre ölüm yollarının ana hatları çizilmiştir. UV radyasyonu, reaktif oksijen türleri, hipoksi, protein mutasyonları, lipid homeostazisi, genlerin silinmesi ve besin açlığı gibi birçok eksojen ve endojen faktör, yanlış katlanmış proteinlerin birikmesine neden olarak ER stresine neden olabilir. Endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış proteinlerin artan seviyeleri üzerine meydana gelir ve katlanmamış protein tepkisi (UPR) ve ER ile ilişkili protein bozulması ERAD (ing., “Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation”) gibi hücresel tepkilerin aktivasyonu ile sonuçlanır. Toplu olarak ER stresi olarak adlandırılan çeşitli çevresel ve fizyolojik koşullar, ER’de katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olabilir. ER stresi, katlanmamış protein tepkisi (UPR) sinyal yollarını tetikler (Walter ve Ron, 2011). Bir hücrenin salgıladığı veya yüzeyinde sergilediği proteinlerin büyük çoğunluğu ilk olarak endoplazmik retikuluma (ER) girer ve orada katlanıp birleşir. Yalnızca uygun şekilde bir araya getirilmiş proteinler ER’den hücre yüzeyine ilerler. Protein katlanmasının doğruluğunu belirlemek için hücreler, ihtiyaca göre ER’deki protein katlama kapasitesini düzenler. Son gelişmeler, mekanik karmaşıklıklara ve UPR’nin çok sayıda hastalığındaki rolüne ışık tutuyor. Ek olarak, ER stresinin ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesini inhibe ettiği, hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğu ve hücreyi apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir. Bu bağlamda, ER stresinin tetiklediği apoptozda moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında *S.pombe*’deki çalışmaların önemi büyüktür. *S. pombe SPBC354.15 (fap1)* geni L-pipekolat oksidaz, (“L-pipecolate oxidase”) enzimini şifreler. Pipekolat enziminin memeli hücrelerinde H₂O₂ stresine karşı koruma sağladığı bilinmektedir. Araştırma grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, tunikamisin ile tetiklenen ER stresinde *S. pombe fap1* delesyonlu ırkta apoptozun arttığı tespit edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Genellikle "filyon mayası" olarak bilinen *Schizosaccharomyces pombe*, bir ascomycete mayasıdır. Ascomycetes, Mantarlar aleminin bir üyesidir. *S. pombe*, "Pombe" isimli Doğu Afrika birasından 1893 yılında izole edilerek keşfedilmiştir. *S. pombe* ayrıca, meyvelerden ve bakterilerle karışık fermantasyon yoluyla üretilen bir çay ürünü olan kombucha'dan ve rom ve tekila gibi damıtılmış alkollü içkilerin üretiminde kullanılan pekmezden de elde edilmiştir (Gomes ve diğ., 2002). *Pombe*, Swahili dilinde "bira" (veya en azından bira benzeri fermente içecek) anlamına gelir. Leupold, 1950'li yılların başlarında *S. pombe*'nin genetiği üzerinde ilk kez çalışmalara başlamıştır. (Gutz, 1974).

2.1.1. Model organizma olarak *S. pombe*

Saccharomyces cerevisiae ve *S. pombe*, tek hücreli bir ökaryot olarak, 1950'lerde ve 1960'larda enterik bakteri *Escherichia coli*'yi (onu enfekte eden bakteriyofajlarla birlikte) moleküler biyoloji için önde gelen model organizma haline getiren özelliklerin çoğuna sahiptirler. Ökaryotlar olarak bu mayalar, DNA replikasyonu, hücre iskeleti organizasyonu, organel biyogenezi veya translasyon, transkripsiyon gibi mayadan insanlara kadar korunabilen fakat bakterilerde yer almayan mekanizmaları araştırmak amacıyla kullanılabilir. Bu mayalardaki moleküler genetik çalışmaları üç ek özellikten yararlanmaktadır. Bunlardan ilki, laboratuvar suşlarının haploid (bir takım kromozomla) veya diploid (iki takım kromozomla) olmasıdır. Haploidler özellikle istenen fenotipi üreten mutant alellerin taranmasında yarar sağlar. Bir genin çoğu fonksiyon azalması veya kaybı ya da mutant aleli nedeniyle yabancı tip alele karşı resesif özellik göstereceğinden dolayı, bunların bir diploid suşta tespit edilebilmesi zordur ancak bir haploidde kolaylıkla görülebilir. Daha sonra diploid maya suşlarının oluşturulması, mutant bir alelin yabancı tip bir alele karşı baskın mı yoksa resesif mi olduğunun değerlendirilmesine olanak sağlar. Maya diploidlerinden aynı zamanda bir genetik taramada tanımlanan genlerin sayısını belirlemek ve resesif mutant alelleri tamamlama gruplarına yerleştirmek için de yararlanılabilmektedir. Mayalar oldukça aktif homolog rekombinasyon mekanizmalarına sahiptir.

Genetik mesafedeki 1 cM (mayotik rekombinasyonun bir ölçüsü), insanlarda yaklaşık 1 milyon baz çiftine (bp) karşılık gelir (Kong ve diğ., 2004), *S. pombe*'de bu ~6250 bç 'ye eşdeğerdir

(Fowler ve diğ., 2014). Fisyon mayasında homolog dizilerinin yeniden birleştirme yeteneği, yabancı veya başka şekilde değiştirilmiş DNA parçalarının maya genomunda hedeflenen bir bölgeye doğrudan eklenmesiyle yeni alel kombinasyonları taşıyan suşlar oluşturmalarına olanak sağlar. Bu özellikleriyle *S. pombe*, biyolojisi birçok açıdan diğer ökaryotlarınkine göre iyi korunmuş olan, genetik olarak esnek organizmadır. *S.cerevisiae* ve *S.pombe* mayalarının her ikisi de askomiçe mayaları ve tek hücreli ökaryotlar olmalarına rağmen, *S. pombe* ve *S. cerevisiae* birbirlerinden 350-400 milyon yıl önce evrimsel olarak ayrılmışlardır o (Sipiczki, 2000; Wood ve diğ., 2002). Bu iki maya arasındaki evrimsel mesafe, maya ve memeliler arasındaki evrimsel mesafeyle aynı olduğundan, *S. pombe* ve *S. cerevisiae* birbirlerine, insanlara oldukları kadar yakın değillerdir. İkincisi, protein ve DNA dizisi verilerine göre *S. pombe*, *S. cerevisiae*'den daha "bazal" bir grubu temsil eder ve mantarlar ile metazoanlar arasındaki bölünmeden sonra daha ortak atalara ait özellikleri korur (Hoffman ve diğ., 2015). Bunun tersine, *S. cerevisiae*, *S. pombe*'den daha hızlı evrimleşmiştir ve *S. pombe* ile karmaşık ökaryotlar arasında korunan 300'den fazla genini ve çeşitli biyolojik süreçlerini kaybetmiştir (Aravind ve diğ., 2000; Wood, 2006).

2.1.2. *S.pombe* Yaşam Döngüsü

Fisyon mayası *S. pombe* çubuk şeklinde tek hücreli bir ökaryottur. 25°-36°C'de minimum ve/veya zengin ortamda 2-4 saat arasında değişen süreyle bölünebilir. *S. pombe* yaşam döngüsünde haploid ve diploid evrelere *S. pombe*'yi hücre döngüsü çalışmaları için güçlü bir model haline getiren önemli bir yaşam özelliği, büyüme polaritesi ve simetrik bölünme modelidir. *S. pombe*, uç uzamasıyla büyür ve medial fisyonla bölünürken hücre çapı nispeten değişmeden kalır.

Büyüme polaritesi, hücre boyutu, özellikle hücre uzunluğu ölçülerek hücre döngüsü aşamalarının uygun ve hassas bir şekilde takip edilmesine olanak tanır ve böylece hücre döngüsü ilerlemesindeki kontrolün ayrıntılı analizine izin verir.

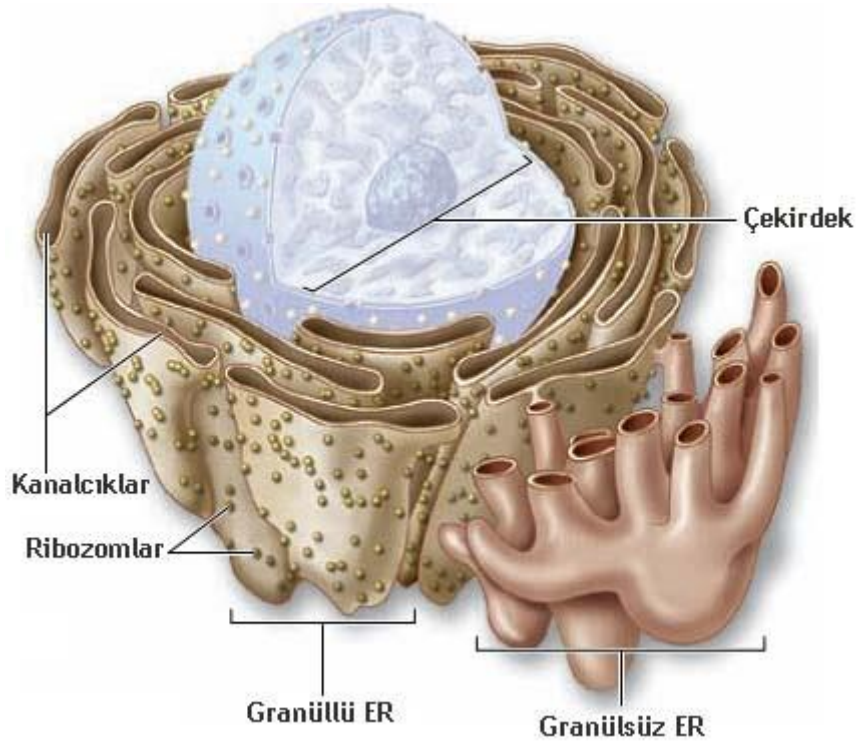
S. pombe'de yapılan benzersiz ve en tanınmış keşifler, evrim boyunca tüm ökaryotlar için temel olan hücre döngüsü düzenlemesinin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla ilgilidir (Hoffman ve diğ., 2015; Fantes ve Hoffman, 2016). Fisyon mayasının genetik manipülasyona uygunluğu, hücre biyolojisinin çeşitli temel ve yeni dogmalarını ortaya çıkarmak için klasik genetik yaklaşımlarda yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmasına olanak sağlamıştır (Forsburg, 2003; Tang ve Edwalds-Gilbert, 2016). Moleküler genetiğe dayalı araştırmalardaki

izlenebilirliği, gen fonksiyonunun araştırılmasında güçlü bir araç olarak etkinliğini daha da artırmaktadır. Gen fonksiyonunu araştırmak için yaygın olarak kullanılan moleküler yaklaşımlardan biri, ilgilenilen genin vektör aracılı ekspresyonudur. Plazmid vektörü pREP1, tiaminle baskılanabilen bir fisyon maya promotörü olan nmt1'i kullanır. Nmt1, tiaminin uzaklaştırılmasının ardından baskının kaldırılması üzerine ekspresyon seviyesinde yaklaşık 80 kat artış gösteren çok güçlü bir promotördür (Maundrell, 1997). Fisyon maya hücrelerine dönüştürüldüğünde, ilgili zayıflatılmış promoterleri taşıyan pREP1, pREP41 ve pREP81 vektörleri, sırasıyla nmt1, nmt41 ve nmt81 promotörünün kontrolü altında ilgili genler için bir dizi indüklenebilir ekspresyon seviyesine izin verir. Promotör gücündeki farklılıklara bağlı olarak gen ekspresyon düzeylerini değiştirebilme yeteneği ve isteğe bağlı olarak baskıyı azaltmak için tiaminin çıkarılması yoluyla gen ekspresyonunu koşullu olarak kontrol etmenin kolaylığı, fisyon maya hücrelerindeki genlerin fonksiyonunu araştırmak için çok faydalıdır. Örnek olarak, ilgilenilen bir genin doğal ekspresyonu düşük olduğunda ve *S. pombe* hücrelerinde tespit edilmesi zor olduğunda, ekspresyonu artırmak için ektopik bir ekspresyon sistemi kullanılır. Bu özellikle ilgilenilen gen tarafından kodlanan proteinin hücresel lokalizasyonunu belirlemek veya protein aktivitesine yönelik potansiyel transkripsiyon sonrası modifikasyonları incelemek için gereklidir. *S. pombe* genomik dizilemesindeki ilerlemelere dayanarak, *S. pombe*'nin homolog rekombinasyonun yüksek hassasiyetine yönelik doğuştan gelen yeteneği ile birleştiğinde, belirli genomik bölgelerde tek gen kopyaları olarak stabil bir şekilde entegre olabilen yeni ektopik vektörler tasarlanmıştır (Vjestica ve diğ., 2020). Bu entegrasyon vektörleri, ilgilenilen bir geni veya bir etiketi barındıran bir kaseti ve bu işaretleyicinin genomik lokusuna homolog dizilerle çevrili spesifik seçilebilir bir işaretleyiciyi (ura4⁺, ade6⁺, his5⁺ veya lys3⁺) içerir. Bu vektörlerle uygun kasetlerin kullanıldığı basit alt klonlama, ek seçim işaretleyicilerinin uygun şekilde yerleştirilmesini ve farklı genler veya floresan etiketlerle değiştirilmesini kolaylaştırdığından bunların çok yönlülüğünü artırır (Vjestica ve diğ., 2020). Fisyon mayası *S. pombe*, hücre döngüsü organizasyonu ve telomerleri, sentromerleri ve replikasyonun kökenini içeren gen ve kromozom yapıları ile intronların yaygınlığı gibi çeşitli hücresel süreçleri koruduğundan dolayı oldukça önemli bir araştırma modelidir (Kim ve diğ., 2010; Hayles ve Nurse, 2016). Hücre döngüsü düzenlemesi ve DNA hasarı kontrol noktası ve onarım mekanizmaları çalışmaları üzerindeki özel etkisine ek olarak, ökaryotik bir model organizma olarak *S. pombe*, epigenetik gen susturma ve ön mRNA işleme yoluyla gen ekspresyon kontrolü ile ilgili kromozom dinamikleri de dahil olmak üzere *S.*

cerevisiae'de evrim yoluyla kaybolan biyolojik süreçlerin araştırılması için avantajlar sunar (Wood ve diğ., 2002; White ve Allshire, 2008; Hayles ve Nurse, 2016).

2.2. MAYADA ENDOPLAZMİK RETİKULUM YAPISI VE İŞLEVİ

Endoplazmik retikulum (ER), karakteristik bir boru şeklinde yapısı bulunan hayati bir membran organelidir (Şekil 2.1). ER işlevleri; protein sentezi, katlanma, translokasyon, kalsiyum homeostazisi ve lipit biyosentezinden oluşmaktadır. ER, protein kalite kontrolünde ve hücrel aktiviterin desteklenmesinde oldukça önemli bir role sahiptir.



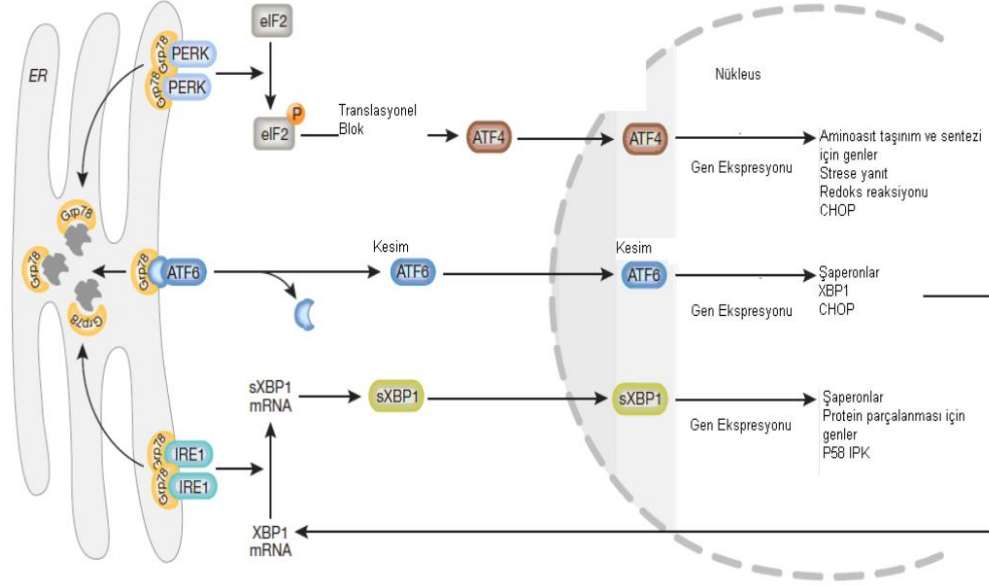
Şekil 2.1: ER Yapısı.

Ökaryotik hücrede yer alan zara bağlı en büyük organel ER'dir (Friedman ve Voeltz, 2011 ; Hu ve diğ., 2011). Periferik ER ve nükleer zarf'tan oluşur; birbirine bağlı tabakalar ve tübüllerden oluşan tek bir ağ olup, mayada kortikal ER olarak adlandırılan plazma zarının yakınında bulunur. Çift eksenli elektron tomografisi ve transmisyon elektron mikroskopundan yararlanılarak yapılan bir çalışmada tomurcuklanarak üreyen mayaya ait ER görüntülenmiş ve bunun boru şeklindeki ER (tubER), plazma membranıyla ilişkili ER (pmaER), ve merkezi sarnıç ER (cecER) olacak şekilde 3 farklı ana alana bölünebileceğini görülmüştür (West ve diğ., 2011).

2.1.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

Fizyolojik veya patolojik uyarılara bağlı olarak ER homeostazisinin bozulması; yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesine yol açar ve bu durum endoplazmik retikulum stresini (ERS) doğurarak katlanmamış protein tepkisini (UPR) tetikler. UPR, hücrenin ER stresıyla başa çıkma mekanizmasıdır. UPR, hücrenin ERS'yi idare etme ve protein işleme yoluyla ER homeostazisini yeniden sağlama kapasitesini artırır ve böylece hücrenin hayatta kalmasını teşvik eden uyarlanabilir bir yanıt olarak görev alır. Bununla birlikte, uzun süreli ERS, UPR'nin adaptif kapasitesini aşar ve çeşitli yollardan hücre ölümünü tetikleyen terminal UPR aktivasyonuna neden olur. Normal hücre homeostazinin korunmasında, ER lümeni içindeki moleküler şaperonlar, yeni sentezlenen proteinlerin uygun işlevsellik için doğru üç boyutlu konformasyonlarına ulaşmalarına yardımcı olur. Dış uyarılar ERS'yi tetikleyerek UPR'yi etkinleştirebilir.

UPR aktivasyonu, stres sinyallerini ER'den çekirdeğe ileterek ilgili genlerin düzenlenmesine yol açar. Sonuçta bu süreç ER homeostazisini yeniden sağlar ve protein sentezini azaltarak, uygun protein katlanmasını kolaylaştırarak ve yanlış katlanmış ve katlanmamış proteinlerin bozunmasını hızlandırarak hücrenin yaşam döngüsünün devam etmesine olanak tanır. ERS sırasında stresli uyarıların sürekli üretilmesi hücre ölümüyle sonuçlanabilir. ER, enzim 1 α (IRE1 α) gerektiren inositol, protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), aktive edici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) olmak üzere 3 transmembran protein reseptörü içerir. Fizyolojik koşullar altında bu proteinler, moleküler şaperon immünoglobulin ağır zincir bağlayıcı proteine (BiP) veya glikozla düzenlenen protein 78'e (GRP78) bağlanmaları yoluyla inhibe edilir (An ve diğ., 2024). UPR aktivasyonu üzerine, moleküler şaperonların bu reseptörlerden ayrışması meydana gelir ve sonuçta ilgili genlerin ekspresyonunu düzenleyen üç protein aracılı sinyal yolunu başlatır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: UPR'nin ana sinyal yolları.

2.2. ER STRESİNE BAĞLI GELİŞEN HÜCRE ÖLÜMÜ

2.2.1. Otofaji

Otofaji, hasarlı organelleri ve protein agregatlarını ortadan kaldırmak için hayati önem taşıyan moleküler bir olgudur ve hücrel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar ve otofagozomların oluşumu ve bunların lizozomlarla müteakip etkileşimi ile karakterize edilir.

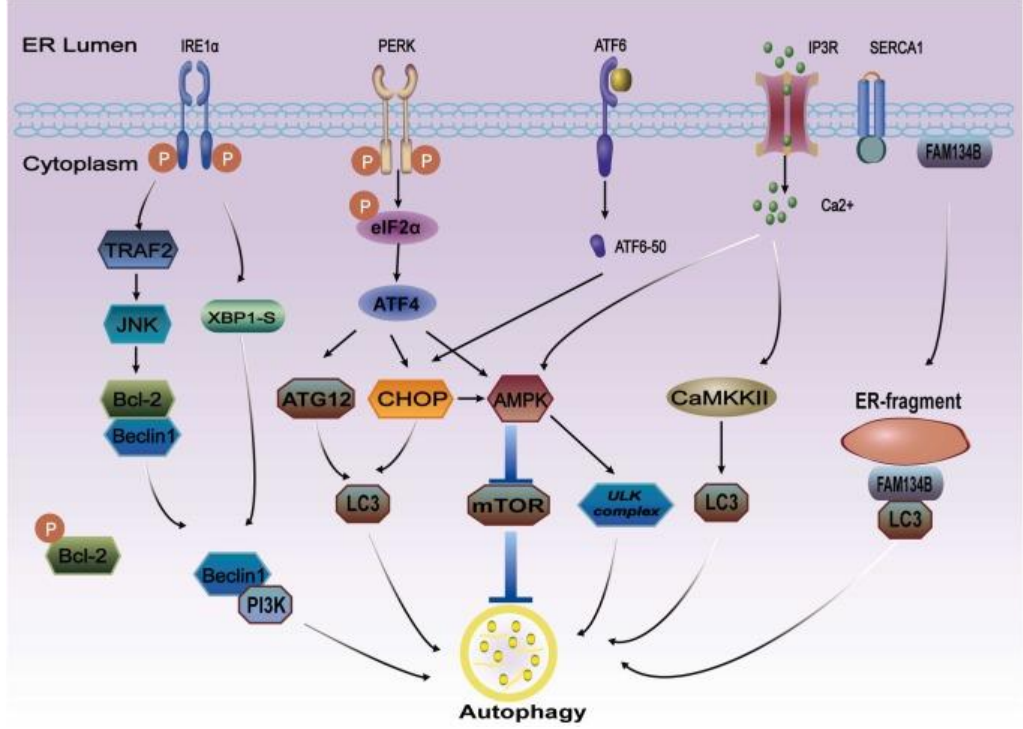
Otofajinin altında yatan mekanizma üç aşamadan meydana gelmektedir:

1. Golgi, mitokondri, plazma zarı ve ER'den türetilen fagozomal zarların oluşumu
2. Otofagozomların üretimi
3. Otolizozomları oluşturmak için otofagozomlar ve lizozomlar arasındaki füzyon.

Çalışmalar, seçici olmayan makrotofajiye özellikle vurgu yaparak ERS ile otofaji arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. ERS tespit edildiğinde UPR aracılığıyla hücrel otofaji başlatılır ve ER içindeki aşırı protein birikiminin ortadan kaldırılması amaçlanır. Bu nedenle otofaji, ER ile ilişkili bozunmayla birlikte fazla proteinin ER'den uzaklaştırılması için alternatif bir yol görevi görür. Özellikle, bazı ERS indükleyicileri eşzamanlı olarak otofajiyi uyarır (An ve diğ., 2024).

Spesifik moleküler mekanizmalar büyük ölçüde keşfedilmemiş kalmasına rağmen, üç UPR sensörünün, IRE1 α (ing., "Inositol-requiring transmembrane kinase/endoribonuclease 1 α "),

PERK (ing., “The Protein Kinase R-like ER Kinase”) ve ATF6 (ing., “Activating Transcription factor 6”) 'nın, ilgili yollar aracılığıyla otofajiyi düzenlediği bulunmuştur (Şekil 2.3). Özellikle, ERS'nin otofajiyi başlatma veya engellemede ikili bir rolü olabilir ve bozulmuş otofajik akışın da ERS ile ilişkilendirildiği görülmüştür (An ve diğ., 2024). Hem ERS hem de otofaji, hücre kaderinin önemli belirleyicileridir ve sıkı düzenleme gerektirir (An ve diğ., 2024).



Şekil 2.3: UPR aracılı otofaji ve kısmi mekanizmalar.

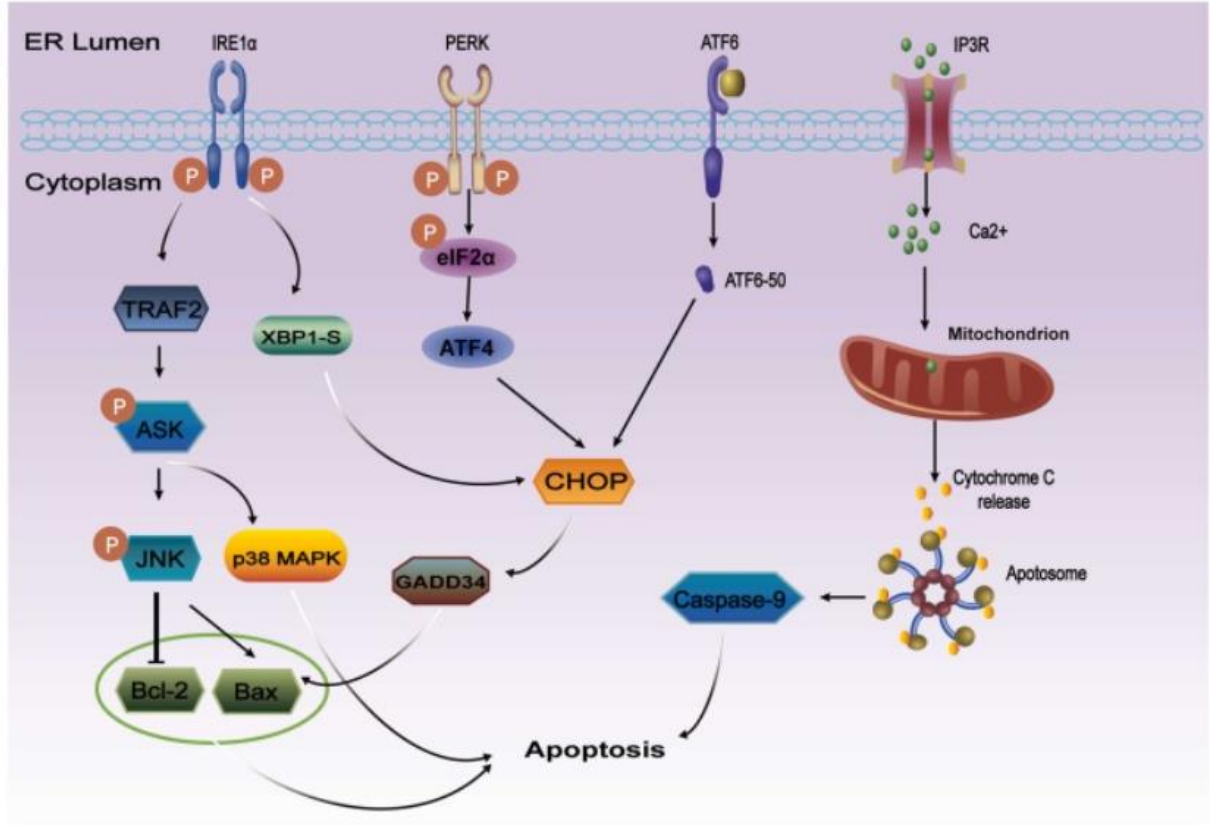
ERS, IRE1 α , PERK, ATF6 ve Ca²⁺ aracılığıyla otofajiye aracılık edebilir. ERS etkinleştirildiğinde, IRE1 α , TRAF2/JNK/Beclin1'in sinyal yolu yoluyla otofajiyi destekler; PERK, ATF4 sinyal yolu boyunca aşağı yöndeki ATG12/CHOP'u aktive ederek otofajiyi indükler; ATF6, aşağı akış CHOP ile aktifleştirilen otofajisini etkinleştirir; Ca²⁺, CaMKII yoluyla otofajiye katılabilir. Ayrıca FAM134B, lipitlenmiş LC3'e bağlanarak otofajiye neden olabilir.

Canlı organizmalar besin açlığı, farklılaşma veya gelişme gibi radikal çevresel değişikliklere maruz kaldıklarında otofaji hızla tetiklenir ve iç hücre bileşenleri yeniden düzenlenir. Ubikitin-proteazom sisteminin aksine, otofaji öncelikle birçok hücre içi proteinin seçici olmayan ve toplu bozunmasına aracılık eder. Tomurcuklanan *Saccharomyces cerevisiae* mayasında, otofaji esas olarak nitrojen veya karbon açlığıyla tetiklenir, ardından endojen proteinler ve organeller

otofagozom adı verilen izole edilmiş zarlar içine alınır. Otofagozomun dış zarı daha sonra vakuol ile birleşerek otofagozom içeriğinin, yani otofajik cisimlerin salınmasına ve vakuolde parçalanmasına izin verir. Genetik teknikler kullanılarak, otofajik yolda eksik olan mutantlar *S. cerevisiae*'de izole edilmiştir (Tsukada ve Ohsumi, 1993; Tucker ve diğ., 2003). Otofaji sürecinde yer alan moleküler mekanizmalar ayrıntılı genetik analize tabi tutulmuş ve *S. cerevisiae*'de otofaji için gerekli olan yaklaşık 30 otofaji ile ilişkili (ATG) gen tanımlanmıştır (Nakatogawa ve diğ., 2009). Bu ATG genlerinin ürünlerinin analizleri, biyokimyasal aktiviteleri yeni konjugasyon sistemlerini, membran protein komplekslerini ve otofajiyi düzenleyen önemli faktörleri temsil ettiklerini düşündüren yeni protein komplekslerini ortaya çıkarmıştır (Ichimura ve diğ., 2000), (Kamada ve diğ., 2000). ATG gen ürünlerinin çoğu aynı zamanda yerleşik hidrolaz aminopeptidaz I ve a-mannosidazı besin açısından zengin büyüme koşulları altında vakuole taşıyan sitoplazmadan vakuole hedefleme (Cvt) yolunda da görev alır (Klionsky ve Ohsumi, 1999) . Otofaji ile yakın bir genetik ilişkiyi paylaşmanın yanı sıra, Cvt vezikül oluşumu da benzer membran dinamikleri yoluyla meydana gelir. Diğer genetik yaklaşımlar ayrıca , büyüme için kullanılan karbon kaynağındaki bir değişikliğin neden olduğu fazla peroksizomların seçici bozunması olan peksofajinin yanı sıra otofajide de yer alan genleri tanımlamıştır . *Pichia pastoris*'te Atg25, Atg26, Atg28 ve Atg30 dahil olmak üzere çeşitli proteinler peroksizomların seçici bozunmasında tanımlanmıştır ancak Cvt yolunda veya makrootofajide tanımlanmamıştır. Son zamanlarda seçici organel bozunmasından sorumlu diğer Atg proteinleri rapor edilmiştir. İşlevsel olmayan mitokondri aynı zamanda seçici otofajinin (mitofaji) hedefleridir ve mitokondriye lokalize olan Atg32 ve Atg33'ün mitofajiye dahil olduğu bilinmektedir. Bu son çalışmalar, açlık sırasında toplu bozulmaya ek olarak etkileyici bir otofajik fonksiyon çeşitliliğini ortaya çıkardı (Tucker ve diğ., 2003).

2.2.2. Apoptoz

Programlanmış bir hücre ölümü süreci olan apoptoz, hücre büzülmesi, organel ve kromatin yoğunlaşması ve apoptotik veziküllerin oluşumu ile karakterize edilir. Özellikle apoptoz, sağlam hücre zarları ile ve ikincil bir inflamatuvar yanıt olmadan meydana gelir. Yaşam aktivitesini sürdürmek için çok önemli bir süreç olarak hizmet eder ve iki ana yolla tetiklenebilir: hücre dışı ölüm ligandı-reseptör yolu ve hücre içi yol. ERS'nin apoptoz için ek bir düzenleyici yol olduğu gösterilmiştir (An ve diğ., 2024). Hücrelerdeki ERS üzerine, ER transmembran protein reseptörleri aktive olur ve sonucunda apoptoz meydana gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: UPR aracılı apoptoz ve kısmi mekanizmalar.

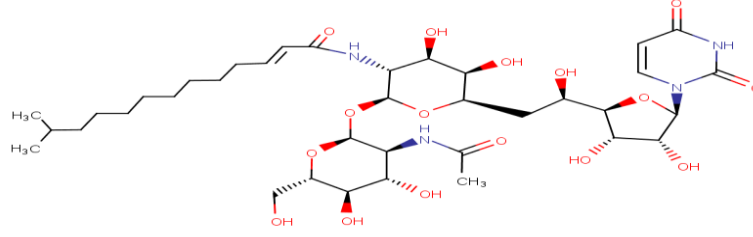
IRE1 α , ERS ve apoptozun bağlanması önemli bir rol oynar. IRE1 α yolunun düzenlenmesi, apoptoza aracılık eden Apoptoz sinyalini düzenleyen kinaz fosforilasyonunu teşvik eder ve JNK veya p38 mitojenle aktifleştirilen protein kinazın aktivasyonu yoluyla oksidatif stresi indükler.

ER, Ca²⁺ konsantrasyonunu homeostazisinin ve protein biyosentezinin korunmasında önemli bir rol oynar. ER'den Ca²⁺ salınımı esas olarak IP3R'ler tarafından düzenlenir ve ERS, hücre içi Ca²⁺ salınımını teşvik ederek apoptoza yol açar. ER Ca²⁺ salınımının ve mitokondriyal Ca²⁺ alımının IP3R aracılı düzenlenmesi, Ca²⁺ transferini kolaylaştırır, ardından mitokondriden sitokrom C salınımını tetikler. Salınan sitokrom C, apoptotik cisimcikler oluşturarak kaspaz-9 aracılı apoptozu başlatır. Kronik ERS, ER bütünlüğünün bozulmasına yol açarak sonuçta apoptoz ve kardiyovasküler fonksiyon bozukluğuna neden olur. ERS'nin aracılık ettiği apoptotik ve inflamatuvar sinyal yolları, kardiyovasküler hastalıkta önemli roller oynar (An ve diğ., 2024).

2.3. TUNİKAMİSİN

Doğal olarak oluşan bir antibiyotik olan tunikamisin (TM), ökaryot hücrelerde proteinlerdeki N-bağlı glikanların biyosentezindeki ilk adımı inhibe ederek yanlış katlanmış proteine neden olup hücrelerde ER stresini indükleyen bir glikosilasyon inhibitörüdür. *Streptomyces lysosuperificus* tarafından üretilen ve glukozamin içeren Tunikamisin, gram pozitif bakteriler de dahil olmak üzere, maya ve mantarlar gibi mikroorganizma türlerine karşı bir etkinliğe sahiptir. Daha önceki araştırmalarda, TM'nin maya, bakteri gibi bitki ve hayvanlarda N-glikoprotein sentezini engellediğini ortaya konmuştur. TM, amino grubuna bağlı bir yağ asidi, N-asetilglukozamin, 11-karbon aminodialdoz ve urasil barındırın homolog antibiyotiklerin bir karışımıdır (Şekil 2.5). TM, birbirlerinden farklı 10 homoloğa sahiptir. Bunun sebebi içeriğindeki yağ asidi karbon zincirlerinin farklı uzunlukta olmasıdır. Glikoprotein sentezinin ilk adımında TM, UDP-N-asetilglukozamin yapısından dolikol fosfata N-asetilglukozamin-1-fosfatın geçişini inhibe eder bu sayede protein ve karbonhidrat arasındaki N-glikozidik bağlanmaya engel olur. Bununla birlikte N-glikoproteinlerin öncüsü olan lipid bağlı oligosakkaritlerin sentezinin ilk adımında N-glukozaminin, poliizoprenoit lipid dolikol fosfata geçişini indirger (Nami ve diğ., 2016).

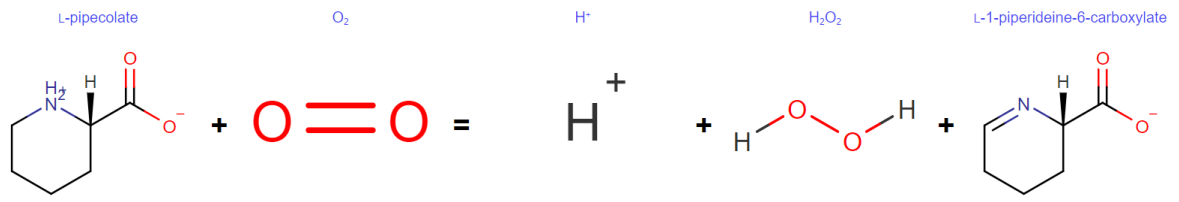
TM, N-asetilglukozamin-1-fosfatın, dolikol fosfata geçişinin hızlandırılmasında görev alan GTP (GlcNAc fosfotransferaz) enzimine etki eder böylece dolikol fosfatın N-asetilglukozamin-1-fosfata bağlanması engellenmiş olur. TM, yeni sentezlenmiş proteinlerin glikozilasyonunda N-bağlı proteinlerin sentezlenmesini durdurur ve ER lümeninde katlanmamış veya katlanması yanlış olan proteinlerin birikmesine, yeni sentezlenmiş proteinlerin glikozilasyonunun bozulmasına sebebiyet verir ve bundan kaynaklı ER stresi ortaya çıkar. TM, bir N-glikozilasyon inhibitörü olarak bilinir ve memeli hücrelerinde UPR'nin aktivasyonuna sebep olur. Hücrelere Tunikamisin uygulanmasına bağlı olarak, glikoproteinlerin birikmesinden kaynaklı ER stresi meydana gelir ve Katlanmamış Protein Yanıtı (İng., "Unfolded Protein Response", UPR) adı verilen sistem aktive olur. Protein sentezini etkilemeden protein glikozilasyonunu tamamen inhibe edebilme özelliği taşır. Bundan dolayı ER stresinin farmakolojik indükleyicisi olarak hem biyolojik hem de in vivo çalışmalarda oldukça sık kullanılmaktadır (Nami ve diğ., 2016).



Şekil 2.5: Tunikamisin'in Kimyasal Yapısı.

2.4. FAP1 GENİ VE L-PIPECOLATE OXİDASE

Fruktozil-amino asit oksidaz (FAOD), fruktozil-amino asidin oksidatif deglisasyonunu katalize ederek reaksiyon sonucu amino asit, glukozon ve H_2O_2 'yi verir. Fruktozil Amino asitler, diyabetin klinik indikatörü olarak yararlı olan glikolize proteinlerin model bileşikleridir. Ayrıca FAOD'ların *Aspergillus*, *Fusarium* ve *Penicillium* cinsleri gibi filamentli mantarlarda yaygın olarak bulunmasının yanı sıra başka FAOD tiplerinin mantarlarda da dağıldığı da görülmektedir. *Corynebacterium 2-4-1* suşu ve *Agrobacterium tumefaciens*'in prokaryotlar arasında FAOD üreticileri olduğu bilinmektedir, ancak bugüne kadar mayalarda FAOD'lar hakkında çok az rapor bulunmaktadır. Son zamanlarda, *Schizosaccharomyces pombe*'nin tamamen sekanslanmış genomunda varsayılan FAOD geni olan *fap1*'in yer aldığı doğrulanmıştır. FAOD'un C-terminal bölgesinin, çeşitli bakteri ve memelilerdeki sarkozin oksidazların (SOXs; EC 1.5.3.1) aktif bölgesine çarpıcı bir benzerlik gösterdiği görülmüştür. Filogenetik analizlere göre, *Fap1*'in amino asit dizilerinin, SOX'lar ve L-pipekolik asit oksidazdan (POX) ziyade FAOD'larinkine benzer olduğu görülmüştür. *Fap1*'in moleküler ağırlığı, jel filtrasyonu ile sırasıyla yaklaşık 98 kDa olarak hesaplandı; bu da *Fap1*'in dimerik bir protein olduğunu ortaya koymuştur. *Fap1*, 380 ve 454 nm'de iki maksimum absorpsiyona sahip olan flavoproteinlerin tipik absorpsiyon spektrumlarını göstermektedir. *Fap1*, L-pipekolatı (20,7 birim/mg) ve L-prolini (L-pipekolata yönelik aktivitenin %6,7'si) oksitleyebilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: L-Pipecolate reaksiyon.

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu yüksek lisans tezi kapsamında *S. pombe fap1Δ* ve *ED666* ırklarına, pSGP572 vektöründe klonlanmış *fap1* geninin transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası elde edilen rekombinant hücrelere farklı konsantrasyonlarda tunikamisin uygulanarak tetiklenen ER stresinde *fap1* geninin şifrelediği L-pipekolat oksidaz enziminin UPR sürecindeki rolünün aydınlatılması hedeflenmiştir.

3.1. ORGANİZMALAR, GEN VE PLAZMİDLER

Çalışmada kullanılan *S. pombe fap1Δ* ve *ED666* ırkları Bioneer Firmasından alınan ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maya Biyoteknolojisi Laboratuvarında muhafaza edilen kültür koleksiyonundan temin edildi. Adenin, urasil ve lösün oksotrofu olan *EDD666* (Haploid/h + /ade6-M210, ura4-D18, leu1-32) ırkı çalışmada kontrol organizma (yabani tip) olarak kullanıldı. *Schizosaccharomyces pombe* Linder str. liquifaciens maya türünün çeşitli ırkları ile çalışma süresince oluşturulacak rekombinant plazmidlerin çoğaltılması amacıyla *Escherischia coli DH5α* ırkları kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan *E.coli* ve *S.pombe* ırkları Tablo 3.1 'de gösterilmiştir.

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

İrklar	Genotipleri
<i>S. pombe ED666</i>	Parental ırk, <i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32</i>
<i>S. pombe 972</i>	Yabani tip
<i>S. pombe SPBC354.15Δ/fap1Δ</i>	<i>SPBC354.15: KanMX4</i>
<i>E. coli DH5α</i>	<i>dlacZ Delta M15 Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rK-mK⁺) supE44 thi-1</i>

3.2. ORGANİZMALARIN ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

3.2.1. *S. pombe* Irklarının Üretimi ve Saklanması

S. pombe ırklarının kontrolü ve üretilmesinde kullanılan besiyerlerine ait içerikler Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: *S. pombe*’nin kontrolünde ve üretilmesinde kullanılan besi ortamları.

Besiyeri	İçeriği	Miktarı
Zenginleştirilmiş Maya Özütü Besi Ortamı (YES)	Yeast Extract	5 g/L
	Glukoz	30 g/L
	Adenin	75 mg/L
	Histidin	150 mg/L
	Lösin	150 mg/L
	Lizin	150 mg/L
	Urasil	150 mg/L
	Agar	20 g/L

S. pombe suşlarının büyütülmesinde kullanılan bileşenler ve muhteviyatı Tablo3.3’te sunulmuştur.

Tablo 3.3: *S. pombe* suşlarının büyütülmesinde kullanılan bileşenler ve muhteviyatı.

Stok Solüsyon Adı	İçerik	Konsantrasyon
50X Tuz Stoğu	Magnezyum Klorür Hekzahidrat (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	0,26 M
	Kalsiyum Klorür Dihidrat (CaCl ₂ ·2H ₂ O)	5 mM
	Potasyum klorür (KCl)	0,67 M
	Sodyum Sülfat (Na ₂ SO ₄)	4.1 mM
10000x Mineral Stoğu	Borik Asit (H ₃ BO ₃)	33.2 mM
	Magnezyum Sülfat (MgSO ₄)	13.9 mM
	Çinko Sülfat Heptahidrat (ZnSO ₄ ·7H ₂ O) Demir (III) Klorür Hekzahidrat (FeCl ₃ ·6H ₂ O)	7.4 mM
	Molibdik asit (MoO ₃ ·H ₂ O)	0,32 mM
	Potasyum İyodür (KI)	6.02 mM
	Bakır (II) Sülfat Pentahidrat (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	1.6 mM
	Sitrik Asit (C ₆ H ₈ O ₇)	47.6 mM
Edinburgh Minimal Medium (EMM2)	Potasyum hidrojen fitalat (C ₈ H ₅ KO ₄)	3 g/L
	Disodium phosphate(Na ₂ HPO ₄)	2.2 g/L
	Amonyum Klorür (NH ₄ Cl)	5 g/L
	50X Tuz Stok Solüsyonu	20 mL/L
	10000x Mineral Stok Solüsyonu	0.1 mL/L

S. pombe *fap1Δ* ırkının -80°C’de %30 gliserolde muhafaza edilen stoklarından alınarak sırasıyla YEA besi ortamına ekimi gerçekleştirildi. İki gün sonrasında elde edilen kolonilerden azaltma ekim yapılarak tek koloni elde edilmesi sağlandı. Azaltma ekimi sonrası birer koloni seçilerek eğri YEA besi ortamına ekilip 30°C’de 2 gün üremesi sağlandı. Hem parental ED666 hem de *fap1Δ* mutantının oksotrofluk bakımından genotip kontrolü için seçici MMA besi ortamına (MMA+Ura, MMA+A, MMA+Leu, MMA+Ade+Leu, MMA+Ade+Ura, MMA+Ura+Leu+Ade), (MMA+Ura+Leu) ekildi ve 30°C’de 2 gün inkübe edildikten sonra üreme durumları göz önüne alınarak istenilen genotipi taşıdığı doğrulanan kolonilerin eğri MMA+Leu+Ura+Ade’ye ekimi yapılarak 2 günlük kültürler elde edilerek 4°C’de saklamaya

alındı. “Minimal Medium Agar (MMA)” Besiyeri içeriği Tablo 3.4’te gösterilmiştir. Tüm besi ortamları otoklavda 121°C’de ve 1.2 atmosfer basınç altında 15 dk sterilizasyona bırakıldı. Katı besi ortamları sterilizasyon işlemi sonrasında tek kullanımlık steril petrilere dökülerek hazırlandı. Seçici besi ortamı için gerekli metabolitler olan Ura, Leu ve Ade 10 mg/mL olacak şekilde hazırlandı ve 121°C’de ve 1.2 atmosfer basınç altında 15 dk steril edildi. *S. pombe fap1Δ* suşlarının genotiplerinin doğrulanmasında yaralanılan selektif besi ortamına sterilizasyondan sonra final konsantrasyonları 50 mg/L olacak şekilde ilgili metabolitler (lizin, urasil, guanin, adenin ,lösin) eklendi. Tüm besiyerleri +4°C’de muhafaza edildi.

Tablo 3.4: Minimal Medium Agar (MMA)” Besiyer için kullanılan bileşenler.

MMA(1L)	
Stok A2	100 ml/L
Stok 3a	1ml/L
Stok3b	1 ml/L
Glukoz	10g/L
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1 g/L
Agar	20g/L

Stok A1	
H ₃ BO ₄	500 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	40 mg
KI	100 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	200 mg
MnSO ₄ .4H ₂ O	530 mg
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	195 mg
ZnSO ₄ .7H ₂ O	400 mg

Tablo 3.4 (devam):

Stok 3b	
Biotin	10 mg/L
%50 Etanol	1L

Stok 3a	
Kalsiyum pentotenat	1 g/L
Nikotinik asit	10 g/L
Mezoinositol	10 g/L

Stok A2	
KH ₂ PO ₄	10 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g/L
NaCl	1 g/L
CaCl ₂ .6H ₂ O	1,5 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g/L
Stok A1	10ml/L

3.2.2. *E. coli DH5α* Suşunun Üretimi ve Saklanması

Escherichia coli DH5α suşunun üretimi Luria Bertani (LB) besi ortamında, plazmit taşıyan *E.coli DH5α* suşunun üretimi ise ampisilin içeren LB besi ortamında yapıldı (Tablo 3.5). LB besi ortamı (pH'ı 7.2) dir. Plazmit içeren *E. coli DH5α* suşlarının üretimi için ampisilin antibiyotiği, son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde LB besi ortamına katıldı.

Tablo 3.5: LB besi ortamı muhteviyatı.

LB(200 ml)	
Tripton	2g
Maya ekstresi	1g
NaCl	2g

3.3 GENETİK ANALİZLER

3.3.1. *S. pombe*'den Genomik DNA İzolasyonu

S. pombe 972 yabani ırkıdan genomik DNA izolasyonu için öncelikle YEL besi ortamında bir gece üretilen (30°C, 180 rpm) *S. pombe* 972 hücreleri, 7000 rpm'de 10dk santrifüj edilerek çöktürüldü. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve pellet 230 µl DNA Lizis Buffer ile süspansiyon edilerek başka bir eppendorfa aktarıldı. Eppendorfun 1/3 kadarlık kısmına kadar cam boncuk konularak üzerine 200 µl fenil: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklendi. Tüpler, en yüksek hızda 5 tekrarlı olacak şekilde 3 dk vortekslenerek cam boncukların hücre çeperini parçalaması sağlandı. Cam boncukları uzaklaştırabilmek amacıyla tüpler 16000g'de 5 dk santrifüjlendi ve süpernatant başka bir tüpe aktarıldı. DNA'nın çökmesi için süpernatant üzerine 600 µl %100 soğuk etanol eklenerek -20°C'de 30 dk bekletildi. Etanolü uzaklaştırabilmek için hücreler 15 dk 16000g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı ve çöken DNA'lar tüpün ağzı açık bir şekilde 30dk kurutuldu. Pellet 200 µl dH₂O ile süspansiyon edildi ve 5 µl RNAz ilavesi sonrası 37°C'de 10 dk bekletildi. 10 dk sonunda 8 µl 5M NaCl, 430 µl %100 soğuk etanol eklenerek -20°C 'de 30dk bekletildi. Hücreler 16000g'de 15 dk santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pellet 30 dk kurumaya bırakıldı. 30dk sonunda pellet 40 µl dH₂O ile süspansiyon edildi. Elde edilen DNA örneğinin ve pSGP572 plazmidinin safsızlık ve miktar kontrolleri spektrofotometrede ("Nanodrop 8000", Thermo Scientific) 260 ve 280 nm dalga boyunda ölçülerek yapıldı. Öncelikle 1 µL ddH₂O "blank" olarak cihaza okutuldu ve örneklerden 1 µl alınıp miktar ve safsızlık değerleri ölçüldü. Elde edilen DNA örneğinin kontrolü %1'lik agaroz jelde yürütme yapılarak sağlandı. Gerekli miktarda agaroz ve 1X TAE karıştırılıp mikrodalga fırınında 2 dk çözdürüldü. Jelin bir miktar soğumasından sonra son konsantrasyon 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (10 mg/mL) ilave edildi ve yatay elektroforez kasetine dökülüp 15-20 dk boyunca jelin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra içinde 1X TAE tamponu bulunan elektroforez tankına yerleştirilip, her bir örnekten 3 µL alınarak, 2 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırılıp jele yüklendi. Bant boyutlarının anlaşılabilmesi için GeneRuler™ 1 kb boyutlu standart DNA ("Marker DNA", Fermentas) kullanıldı. Agaroz jele yüklenen DNA örnekleri 80 V'da 45 dk yürütüldü ve 302 nm dalga boyunda ultraviyole (UV) ışıkta görüntülendi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler Tablo 3.6'da verilmiştir.

Tablo 3.6: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Adı	İçerik	Miktar
50 X TAE (Tris-Asetat-EDTA Tamponu)	Tris Base	121 g
	0.5 M EDTA (pH 8.0)	50 mL
	Glasiyel Asetik Asit	28.6 mL
	dH ₂ O	420 mL
Etidyum bromür	Etidyum Bromür	10 mg
	dH ₂ O	1 mL

3.3.2. *S.pombe*'de *fap1* Geninin PZR ile çoğaltılması

S.pombe yabani suşundan izole edilen genomik DNA'lar kalıp olarak kullanılarak *S.pombe fap1* genine ait primerler (Primer3 programı) kullanılarak PZR yapıldı. Ekspresyon vektörlerinde klonlanacak genlere özgü tasarlanan primerler tablo 3.7 'de verilmiştir.

Tablo 3.7: Klonlamada kullanılan genlere özgü primerler.

Primer Adı	Sekans
Fap1F_Bg/II	5'- CGAAGATCTATGGTAAAGAATACTAGCGT -3'
FapR_NofI	5'- ATAGTTTAGCGGCCGCaGCTTAGCTCTTGTCGAGAGG -3'

Tablo 3.8: Klonlamada kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarı.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
dH ₂ O	11,2 µL
5X Tampon	4 µL
DMSO	0,6 µL
2 Mm dNTP	2 µL

Tablo 3.8 (devam):

Primer (F) (10 pmol/ μ L)	0,5 μ L
Primer (R) (10 pmol/ μ L)	0,5 μ L
DNA (100 ng/ μ L)	1 μ L
DNA Polimeraz (5 U/ μ L)	0,2 μ L

Reaksiyonda kalıp olarak *S. pombe 972h* genomik DNA'sı ve "Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase" enzimi kullanıldı. PZR, Tablo 3.9'da verilen koşullar altında PZR cihazı (Bio-RAD T100 Thermal Cycler) ile gerçekleştirildi.

Tablo 3.9: PZR Koşulları.

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık ($^{\circ}$ C)	Süre	Döngü Sayısı
Pre-Denatürasyon	98	3 sn	1
Denatürasyon	98	10s	35
Bağlanma	58	30s	
Uzama	72	1dk	
Son Uzama	72	5 dk	1

PZR sonrasında ürünler %1'lik agaroz jelde tekrar kontrol edildi. Örnekler 90 Volt, 120mA'da 60 dk yürütüldü ve UV ışıkta 302 nm'de bantlar görüntülendi.

3.4. REKOMBİNANT VEKTÖR ELDESİ

3.4.1. pSGP572 Vektörünün İzolasyonu

Çalışmada kullanılan pSGP572 plazmidi İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maya Biyoteknolojisi Laboratuvarı plazmit koleksiyonundan temin edildi. pSGP572 vektörünü içeren *E. coli* suş stokları 50 mg/L ampisilin içeren katı LB besiyerinden 5 mL LB sıvı besi ortamına ekim yapıldı. Sıvı kültür 37° C'de 150 g'de 16 saat boyunca üretildi. 16 saatlik inkübasyon sonrasında 500 μ L örnek alınarak %30 oranındaki gliserol içeren tüplerde karıştırıldıktan sonra -80° C'de saklandı. İzolasyon için yararlanılan tamponlar Tablo 3.10'da gösterilmiştir.

Tablo 3.10: Plazmit izolasyonunda kullanılan tamponlar.

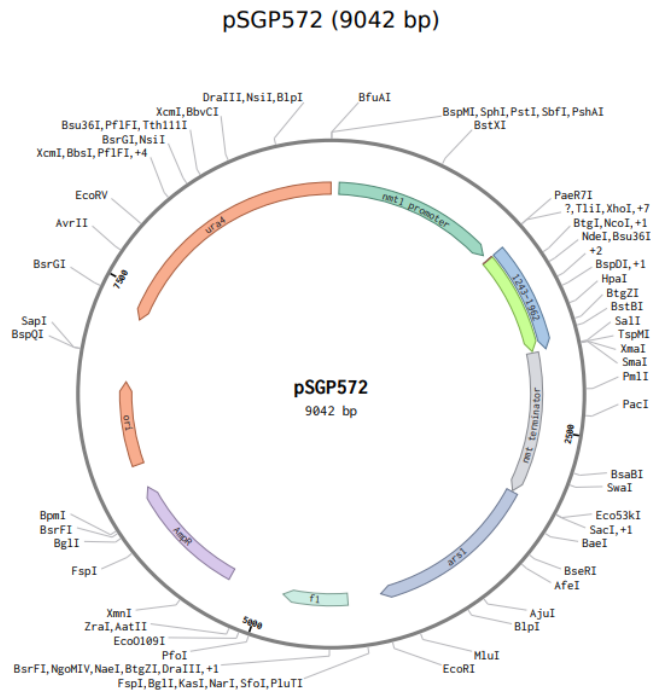
Solüsyonlar	İçerikleri
Solüsyon I (Parçalama Tamponu)	0.05 M Glukoz 0.025 M Tris-HCl 0.01 M EDTA
Solüsyon II (Alkali-SDS Tamponu)	0.2M NaOH %1 SDS
Solüsyon III (3M Potasyum Asetat Tamponu) (100 mL)	60 mL 5 M KoAC 11.5 mL Glacial Asetik Asit

Vektör izolasyonunda öncelikle, 5mL *E. coli* kültürü +4 °C'de 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü ve süpernatant mümkün olduğunca uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 100 µL soğuk solüsyon I eklenerek hücreler süspansiyon edilip 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve buza yerleştirildi. Hücre üzerine RNaz A stok solüsyonundan (10 mg/ml) 4 µL eklenerek pipetaj yardımıyla süspansiyon edildi. Ardından tüplere 200 µL Solüsyon II ilave edilerek 4-5 kez alt üst edilip buzda 5 dk inkübasyona bırakıldı. 5 dk'lık inkübasyon sonrasında tüplere 150 µL Solüsyon III eklenerek alt üst edildi ve buzda 10 dk inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında hücreler 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant başka bir mikrosantrifüj tüpüne aktararak tekrardan maksimum hızda 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant tüplere aktarıldı. Süpernatant üzerine 400 µL izopropanol eklendi ve 5-10 sn. vorteksledikten sonra 2 dk. oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonrasında hücreler oda sıcaklığında maksimum hızda 5 dk. santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pellet 15 dk. kurumaya bırakıldı. 15 dk sonunda pellet üzerine soğuk 1ml %80 etanol eklenerek oda sıcaklığında 2 dk maksimum hızda santrifüj edildi ve süpernatant atılarak DNA pelleti 30dk oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Ardından pellet 30 µL steril distile su ile süspansiyon edildi. İzolasyon sonrası pSGP572 plazmid DNA örneğinin miktarı spektrofotometrede ölçüldü

3.4.2 pSGP572 Vektörünün Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi ve Jelden Geri Kazanılması

Plazmid yapısının düz bir yapıya gelebilmesi ve *fapI* geni ile ligasyonunun sağlanabilmesi için *Bgl*III ve *Not*I restriksiyon endonükleazlarıyla enzimlerin prospektüsünde önerilen koşullarda kesim yapıldı ve %1'lik agaroz jelde beklenen boyut ve kalite doğrulandıktan sonra agaroz jelden saflaştırıldı.

Çalışmada kullanılan pSGP572 plazmidinin restriksiyon haritası Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: pSGP572 plazmidinin restriksiyon haritası.

pSGP572 vektörünün restriksiyon endonükleazlarla kesiminde yararlanılan bileşenler Tablo 3.11'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11: Kesim reaksiyonunda kullanılan bileşenler.

Bileşenler	Miktarları
10X Reaksiyon Tamponu	10 µL
Plazmid vektör(3,8 µg/ µL)	3 µL
<i>NotI</i> (10U/ µL)	2 µL
<i>BglII</i> (10U/ µL)	2 µL
dH ₂ O	83 µL

Toplam hacim: 100 mL

Reaksiyon, 0.5 ml'lik tüplerde kurularak 37°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası kesim işlemi tamamlanarak lineer hale gelen vektörün kesim reaksiyonu bileşenlerinden ayrıştırılabilmesi için jelden geri kazanım yapıldı. Bunun için % 8'lik agaroz jele kesim ürünlerinin tamamı 20 µL boya ile jele yüklenerek jel 90 V 120 mA'da 60 dk yürütüldükten sonra transilluminatörde görüntülenerek vektöre ait olan ~9300 bç uzunluğundaki bant jelden kesildi ve kesilen jel 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Kesilen jelin miktarı hassas terazide ölçülerek her 100 mg için 300 µL Binding Buffer eklendi. Agaroz jelin homojen bir şekilde çözünebilmesi için 55°C'de 2 dk da bir vortekslenerek 10 dk bekletildi. Jel tamamıyla çözüldükten sonra her 100 mg için 150 µL izopropanol eklendi ve tüp alt üst edilerek bileşenlerin iyice homojen hale geçmesi sağlandı. Karışım filtre tüpüne aktarıldı ve bu filtre mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. Tüpler maksimum hızda 1 dk oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve pellet üzerine 700 µL wash buffer eklenerek 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Tekrardan maksimum hızda 2 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı ve boş filtre tüpü wash buffer'ın tamamen uzaklaştırılabilmesi için 3 dk daha maksimum hızda santrifüj edildi. Filtre başka bir mikrosantrifüj tüpüne takıldı ve 10 dk kadar oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. 10 dk sonunda membranın tam ortasına gelecek şekilde 30 µL dH₂O eklenerek 15 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüpler maksimum hızda 2 dk. santrifüj edildi ve elde edilen ürünlerin nanodropta miktar ve saflık tayinleri yapıldı.

3.4.3. pSGP572 Vektörü ile *fapI* Geninin Ligasyonu

BglIII ve *NotI* enzimleri ile lineer hale getirilerek izole edilen pSGP572 ile PZR ürünü olan *fapI* geninin ligasyonu için T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı. Ligasyon işlemi enzim prospektüsüne uygun bir şekilde 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde 16°C'de 16 saat gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri daha sonrasında *E. coli* DH5 α suşuna transfer edildi. Reaksiyona ait bileşenler ve miktarları Tablo 3.12'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12: Ligasyon reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktarları
10X T4 DNA Ligaz Buffer	2 μ L
T4 DNA Ligaz	1 μ L
Plazmit (30 ng/ μ L)	6 μ L
Insert DNA (19ng/ μ L)	2 μ L
dH ₂ O	9 μ L

Toplam hacim: 20 μ L

3.4.4. Ligasyon Ürünlerinin *E. coli* DH5 α Suşuna Transformasyonu

Ligasyon sonrası elde edilen rekombinant plazmitler *E. coli* DH5 α suşuna transfer edildi.

3.4.5. Ligasyon Ürünlerinin Transformasyonu İçin Yeterli *E. coli* DH5 α Hücrelerinin Hazırlanması

E. coli DH5 α suşundan tek koloni elde edebilmek amacıyla LB agar besi ortamına azaltma ekimi yapıldı ve hücreler 37 °C'de bir gece üretildi. Üreyen tek kolonilerden alınan örnekler LB sıvı besi ortamına ekildi ve OD₆₀₀ = 0.5 olana kadar 150 devir/dakika 37 °C'de inkübe edildi. *E. coli* suşunu yeterli hale getirmek ve transformasyon süreçleri için CaCl₂ ve isi şoku teknikleri kullanıldı (Mandel ve Higa, 1970; Cohen ve diğ., 1972; Bergmans ve diğ., 1981; Singh ve diğ., 2010). OD₆₀₀ = 0.5'e ulaşan *E. coli* kültüründen 1.5 mL steril mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 8000 g, +4 °C'de hücreler 3 dk çöktürüldü. Üst sıvı atıldı ve tüpler steril kurutma kağıdında ters çevrilerek kurutuldu. Hücre çökeltisine 500 μ L soğuk MgCl₂ (100 mM) eklenerek karıştırıldı ve 10 dk buzda inkübe edilen tüpler +4 °C 8000 g'de 3 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı. Pellet üzerine 500 μ L soğuk CaCl₂ (100 mM) eklenerek karıştırıldı ve 30 dk buzda inkübe edildikten sonra +4°C'de 3 dk 8000 x g'de santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Pellet

üzerine 50 µL soğuk CaCl₂ (100 mM) eklenerek karıştırıldı ve hücreler zaman kaybetmeden transformasyon için kullanıldı.

3.4.6. Ligasyon Ürününün Yeterli *E. coli* DH5α Hücrelerine Transformasyonu

5 µL'lik ligasyon karışımı 50 µL yeterli *E. coli* hücrelerine eklendikten sonra tüpler hafifçe karıştırılarak 30 dk. buzda bekletildi. 30 dk. sonunda tüplere ısı şoku uygulayabilmek için 90 sn 42 °C su banyosu ve 2 dk buzda inkübe edildi. Bu karışımın üzerine 1 mL LB besi ortamı eklendi ve eğik bir şekilde 37 °C'de, 150 devir / dakika 1 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından, bu karışım 5000 g'de 1 dk santrifüj edildikten sonra 400 µL üst sıvı uzaklaştırıldı. Geri kalan 600 µL ile pellet süspanse edildikten sonra 150 µL'lik kısımlar halinde ampisilin (100 mg/L) içeren LB katı besi ortamına yayma ekimi yapıldı ve 16 saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Aynı işlem pSGP572 plazmidi için de pozitif kontrol olarak gerçekleştirildi. Ek olarak, konak *E. coli* suşunun kontrolü amacıyla bir mikrosantrifüj tüpündeki yeterli hücrelere ligasyon ürünü eklenmeden transformasyon süre uygulandı. Aynı zamanda, yeterli hale getirilen hücrelerin canlılıklarının kontrolü için ampisilin içermeyen besiyerine de ekimleri gerçekleştirildi. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerin istenilen uzunluktaki *fapI* genini içeren rekombinant plazmiti alıp almadıkları koloni PZR ile test edildi. Bu süreçte plazmidin promotör ve terminatör bölgelerine özgü primerler (Tablo 3.7) kullanıldı.

3.4.7. Rekombinant Vektör Taşıyan Hücrelerin Koloni PZR ile Belirlenmesi

Transformasyon sonrası elde edilen kolonilerin *fapI* genini içeren rekombinant vektörü içerip içermediğini belirleyebilmek amacıyla koloni PZR yapıldı. Koloni PZR için petrilere oluşan 15 koloni numaralandırıldı ve Tablo 3.13'te verilen koşullarda koloni PZR gerçekleştirildi.

Tablo 3.13: Koloni PZR koşulları.

Bileşenler	Miktarları
dH ₂ O	11,5 µL
10X Tampon	2 µL
MgCl ₂	1,2 µL
2 Mm dNTP	2 µL
Primer (F)	0,5 µL
Primer (R)	0,5 µL
DNA	2 µL
DNA Polimeraz (5 U/µL)	0,3 µL

PZR sonrasında ürünlerin kontrolü %1'lik agaroz jelde sağlandı. Daha önce bahsedildiği gibi hazırlanan agaroz jele 10 µL PZR ürünleri 2 µL 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak yüklendi ve jel 90 V 120mA'da 60 dk yürütüldükten sonra transilluminatörde görüntülenerek fotoğrafı çekildi. Koloni PZR sonucunda pSGP572 plazmidinin *fap1* genini taşıdığı koloniler doğrulandı (10 kb). *fap1* genini taşıdığı gösterilen bu plazmit İK02 olarak adlandırıldı. Bu sonuca göre koloniler seçilerek 5 ml, ampisilin içeren besiyerine ekilerek 37 °C, 180 rpm'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında üreyen hücrelerden gliserol stok oluşturuldu ve plazmit izolasyonu yapıldı.

3.4.8. Rekombinant Vektörün *E. coli* Hücrelerinden İzolasyonu ve Restriksiyon Enzimi ile Kesimi

Koloni PZR ile rekombinant vektör taşıdıkları belirlenen koloniler ampisilin içeren LB sıvı besiyerinde üretilerek daha önceki bölümde anlatıldığı gibi *E. coli*'den izole edildi ve vektör miktarı spektrofotometrede belirlenip restriksiyon enzim kesimi ile istenilen büyüklükteki *fap1* genini taşıyıp taşımadığı kontrol edildi. İzole edilen plazmitlerin doğruluğunun kontrolü *EcoRI* enzimi ile 37°C 'de yaklaşık 5 saat kesim yapılarak sağlandı. Kesim reaksiyonu, bileşenleri tablo 3.14'te belirtildiği oranlarda karıştırılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon sonrası sonuçların kontrolü agaroz jel elektroforezi ile yapıldı.

Tablo 3.14: Kesim reaksiyonu bileşenleri.

Reaksiyon Bileşenleri	Miktarlar
dH ₂ O	16 µL
10 X Buffer	2 µL
Plazmit DNA'sı	1 µL
EcoRI	1 µL
Plazmit DNA'sı	1 µL

3.4.9. Rekombinant Vektörün Dizi Analizi ile Kontrolü

Restriksiyon enzimleri ile kontrol kesimlerinin ardından pozitif sonuç veren rekombinant vektörlerin dizi analizleri gerçekleştirildi. *fapI* geninin ilgili vektöre doğru biçimde yerleştiğini görmek ve mutasyon sonucu çerçeve kayması olmadığını göstermek için vektördeki *nmtI* promotörüne ait ileri (F); terminatör dizisine ait geri (R) primerler kullanılarak (Tablo 3.7), ilgili vektörler dizilemeye gönderildi. Dizi analizi ile kontrol MedSanTek firmasından hizmet alımı ile sağlandı.

3.4.10. Vektörün *S. pombe* Irklarına Transformasyonu

Hem pSGP572 boş plazmiti hem de bu projede elde edilecek IK02 rekombinant plazmiti, hem *S. pombe* ED666 parental ırkına hem de *fapIΔ* mutantına elektroporasyon yöntemi ile transfer edildi. Hücrelerin istenilen vektörü taşıyıp taşımadığını kanıtlamak amacıyla Transformasyon işleminin ardından koloni PZR yapıldı ve %1'lik agaroz jele yüklenerek bant büyüklükleri belirlenerek doğrulama yapıldı. Elektroporasyon ile transformasyonda ilk olarak *S.pombe* parental hücreleri YEA besiyerinde 30°C'de 2 gece boyunca üretildi. Sonrasında 20 ml YNB (Ade, Ura, His, Leu, Lis) içeren erlene 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekimi yapıldı ve 30°C 180 rpm'de gece boyu çalkalamalı etüvde üretildi. Ertesi gün hücre yoğunluğu 600 nm'de OD değeri 0,7'ye ulaşan hücreler +4°C'de 2500 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet 2 kez 5ml dH₂O ile yıkanıp hafifçe vortekslendikten sonra tekrar aynı koşullarda santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Pellet üzerine hazırlanan DTT çözeltisinden önce 2ml eklenerek pellet süspanse edildi. Daha sonrasında kalan DTT çözeltisi de eklenerek 30°C'de 15dk karanlıkta inkübe edildi. 15 dk'nin sonunda +4°C'de 2500 g'de 5 dk santrifüj yapıldı ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 3 kez 2 ml soğuk 1 M sorbitol ile yıkanıp +4°C'de 2500 g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet, hücre yoğunluğu 1-5x10⁹ olacak şekilde 50 µL soğuk 1 M sorbitol ile süspanse edildi ve mikrosantrifüj tüpüne alınarak buza kondu. Hücre

süspansiyonunun içine 1000 ng olacak şekilde plazmit DNA'sı eklendi ve 10 dk buzda inkübasyona bırakıldı. Ardından hücre ve plazmit DNA süspansiyonu soğuk küvetlere alınarak 1.5 kV, 200 ohm, 25 µF koşullarında (Biorad, GenePulser Xcell) elektroporasyon gerçekleştirildi. Daha sonrasında küvetlere 1ml soğuk 1 M sorbitol eklenerek hücreler tekrardan mikrosantrifüj tüplerine alındı. Maksimum hızda 30 sn kadar santrifüj yapılarak sorbitol uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 900 µL ddH₂O eklenerek hücreler süspanse edildi ve 150 µL olacak şekilde EMM (Ade, His, Leu ,Lis) besiyerine ekilerek 30 °C'de 3-6 gün inkübasyona bırakıldı. Elektroporasyonda kullanılan çözeltiler tablo 3.15'te gösterilmiştir.

Tablo 3.15: Elektroporasyonda kullanılan solüsyonlar ve miktarları.

Solüsyonlar	Miktar
100 mM DTT	Final konsantrasyon:25 mM
1 M Sorbitol	Final konsantrasyonu:0,6 mM
100 mM HEPES	Final konsantrasyonu:20 mM (PH:7,5)

3.4.11. Rekombinant Transformant Kolonilerin Kontrol Edilmesi

Bu kolonilerin rekombinant plazmidleri alan koloniler olup olmadığını belirleyebilmek için koloni PZR yapıldı. Bu PZR'de kürdan yardımıyla kolonilerden hücre alındı ve 10 µL dH₂O ile süspanse edilerek kalıp olarak kullanıldı. Primer olarak, pSGP572 plazmidinin *S.pombe*'ye transformasyonu ile oluşan kolonilerin kontrol edilmesi için gene özgü primerler kullanıldı.

3.5. FİZYOLOJİK ANALİZLER

3.5.1. *S. pombe* Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması

Bu çalışmada elde edilen *S.pombe* transformantları (*pSGP572 / ED666*, *IK02 / ED666*, *pSGP572 / fap1Δ* ve *IK02 / fap1Δ*) ve konak *S. pombe* ırklarının (*ED666* ve *fap1Δ*) üreme eğrilerinin çıkarılması için EMM besi ortamında 30°C'de, 180 devir / dakika, 2 gün boyunca hücrelerin inkübasyonu sağlandı. Daha sonra 1 mL distile su ile süspanse edilerek toplandı. 100 kat seyreltilen hücrelerin sayımı Malassez Lamı (0.0025 mm², Superior, Marienfeld) kullanılarak yapıldı. Mililitredeki hücre sayısı verilen denkleme göre hesaplandı.

$$\text{Hücre/mL} = \text{Ortalama hücre sayısı} \times \text{Sulandırma faktörü} \times 10^5$$

10 mL seçici besi ortamı içeren 100 mL'lik erlenlere 10^6 hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı ve çalkalayıcı etüvde 180 rpm'de, 30°C'de üremeye bırakıldı. Bu inkübasyon esnasında, hücrelerin üremesindeki artış 2 saatte bir alınan örneklerin spektrometre cihazında (Biotek Cytation 5, Elx8080) 600 nm dalga boyundaki optik yoğunluğunun (OD) ölçülmesiyle belirlendi. Ölçüm verilerine göre her bir ırk için ayrı üreme eğrileri oluşturuldu ve deneyler 2 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Logaritmik fazda hücrelerin kaç bölünme geçirdiğinin ifadesi eden generasyon sayısını hesaplanabilmek için denklem (3.1) 'den yararlanıldı

$$\text{Generasyon sayısı (n)} = (\log N_2 - \log N_1) / \log 2. \quad (3.1)$$

N_2 = Logaritmik üreme sonundaki hücre sayısı

N_1 =Kültürde üremenin başlangıcındaki hücre sayısı

Logaritmik fazda hücrelerin iki katına çıkmaları için gerekli süre olan generasyon süresinin (St) hesaplanmasında ise aşağıdaki denklemden yararlanıldı.

$$St = (T_2 - T_1)/n \quad (3.2)$$

T_2 =Logaritmik üremenin bitiş zamanı

T_1 = Logaritmik üremenin başlama zamanı

n =Generasyon sayısı

3.6. ENDOPLAZMİK RETİKULUM (ER) STRESİNİN UYGULANMASI

S.pombe 972 h⁻ ırkında ER stresi tunikamisin ile sağlandı. ER stresine maruz kalacak *S. pombe* yabani ırkının YEA besi ortamında 30°C'de 2 gün üremesi sağlandı. Taze kültürden 10^6 hücre/mL olacak şekilde alınarak EMM2 besi ortamına ekim yapıldı ve 180 devir/dakika'da 30°C'de çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Logaritmik fazın ortasına (16. saat) kadar üretilen hücre kültürleri deney ve kontrol grupları olarak ikiye ayrıldı. Tunikamisin solüsyonu firmanın önerdiği şekilde 1mg/ml olacak şekilde DMSO'da çözülürülerek hazırlandı. Deney gruplarına tunikamisin 0 µ/ml, 2,5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 20µg/ml dozlarında uygulandı. Kontrol gruplarına ise sadece DMSO uygulaması yapıldı. Hazırlanan kültürler 180 devir/dakika 30°C'da inkübasyona bırakıldı ve hücre canlılığının tespiti için hücreler 0, 4, 8, 24, 32 ve 48.

saatlerde 5 dakika 5000 xg'de santrifüj edilerek çöktürüldü ve taze besi ortamına alınıp aynı santrifüj değerlerinden yararlanılarak yıkandı.

3.6.1. ER Stresinin Canlılık Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

ER stresinin canlılık üzerinde oluşturduğu etkiyi belirleyebilmek için hazırlanan kontrol ve deney guruplarına ait hücrelerden alınan örnekler steril besi ortamı ile 5 dakika 5000 xg'de santrifüj edilerek yıkandı. Sonrasında dH₂O ile 10⁰, 10¹, 10², 10³, 10⁴, 10⁵ olacak şekilde seyreltildi. Bu gruplardan 10 µl alınarak EMM2 besi ortamına spot ekim yapıldı. Hücreler 30°C'de 3-6 gün inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonrası deney ve kontrol grupları görsel olarak değerlendirildi.

3.7. PROTEİN ANALİZLERİ

3.7.1. Hücrelerde Proteozomal Aktivitenin Belirlenmesi

S.pombe transformantları (pSGP272 / ED666, IK02 / ED666, pSGP272 / *fap1Δ* ve IK02 / *fap1Δ*) ve konak *S. pombe* ırkları (ED666 ve *fap1Δ*), YES besiyerinde 30°C, 180 devir/dakika, bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası OD 0,2 olacak şekilde kontrol ve deney grupları ayrılarak EMM2 besi ortamına ekim yapılarak 24 saat inkübasyona bırakıldı. Protein izolasyonu için deney ve kontrol grupları 10 dk 7000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet üzerine 400 µl parçalama tamponu eklendi. Mikrosantrifüj tüplerine yaklaşık 0,3 g kadar (0,5 ml çizgisine kadar) cam boncuk eklendi ve parçalama tamponuyla süspanse edilen pellet cam boncuk üzerine ilave edildi. Her bir tüp için 3 tekrarlı olacak şekilde 1 dk dismembratörde (Sartorius Mikro-Dismembratör S) parçalama işlemi yapıldı. Parçalama işlemi tamamlandıktan sonra mikrosantrifüj tüplerinin altı ısıtılmış iğne yardımıyla delinerek başka bir mikrosantrifüj tüpüne geçirildi ve santrifüj yapılarak süpernatantın diğer tüpe geçmesi sağlandı. Maksimum hızda 20 dk santrifüj yapılarak süpernatant başka bir tüpe aktarıldı. Flood ve ekibinin (2005) *S. pombe*'lerdeki 20S proteozom aktivitelerinin ölçümüne dayanan yöntemin temelinde, proteozom tarafından kesilen işaretli substrat süksinoil-Leu-Leu-ValTyr-amino-4-metilkumarin (Suc-LLVY-AMC) "den ayrılıp serbest kalan amino-4- metilkumarin (AMC)"in flouresan özelliği göstermesi yer almaktadır. Toplam hacmi 100 µL olan assay tamponu (Tablo 3.6) içerisinde 50 µg/mL protein ile 4 mM proteozom substratı Suc-LLVY-AMC, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µL etanol eklendikten sonra 0,1 M sodyum borat tamponu (1.6 mL, pH 9.0) ile muamele edilerek kuyucuklu plakalarına

yüklendi ve açığa çıkan serbest AMC, spektrofluorometre cihazında 390 nm ve 470 nm'de ölçüldü (Hamad, 2007). Her deney üç defa tekrarlanarak kontrol edildi.

Proteozomal aktivitenin belirlenmesinde kullanılan bileşenler Tablo 3.16, Tablo 3.17 ve Tablo 3.18'de gösterilmiştir.

Tablo 3.16: Hücre parçalama tamponu.

Bileşenler	Miktar
Tris (50 mM) stok 1M	2,5 mL
NaCl (150 mM) stok 1M	7,5 mL
Nonidet P40 (%0,5)	0,25 mL
EDTA (5 mM) stok 0,5M	0,5 mL

Toplam hacim: 50 mL

Tablo 3.17: Lowry çözeltileri (Çözelti A:B:C =100:1: 1).

Çözelti A	%2 (w/v) Na ₂ CO ₃ (suda)
Çözelti B	%1 (w/v) CuSO ₄ .5H ₂ O (suda)
Çözelti C	%2 (w/v) Na-K tartarat (suda)

Tablo 3.18: Proteozomal aktivite deney tamponu.

Bileşenler	Miktar
50 mM Tris (pH 7.8)	605 mg
20 mM KCl	30 mg
0,5 mM DTT	5 mg
5 mM MgOAc	105 mg
Toplam hacim: 100 mL	

3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMİN BELİRLENMESİ

Hücre içi oksidasyon düzeyindeki değişimin belirlenebilmesi amacıyla öncelikle *S.pombe* ırkları EMM2 (kontrol) ve EMM2 + tunikamisin besiyerlerine ekilerek yaklaşık 16 saat inkübasyona bırakılarak üremeleri sağlandı. İnkübasyon sonrasında hücre sayısı 10^7 hücre/ml olacak şekilde tekrardan EMM besiyerine deney ve kontrol grupları şeklinde ekildi ve 16 saat üremeye bırakıldı. Ardından hücreler 1ml mikrosantrifüj tüplerine alındı ve hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant atıldı ve elde edilen pelletin 1ml besi ortamında çözünmesi sağlandı. Mikrosantrifüj tüplerinin etrafı alüminyum folyo ile sarılarak hücrelerin ışığa maruz kalması tamamıyla engellendikten sonra etanolde hazırlanan dikloro-dihidro floresan diasetal (DHCF-DA) çözeltisinden son derişim 4 μ l olacak şekilde (5,2 μ l) her tüpe eklendi ve 1 saat 30°C 'de çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik süre sonunda kontrol grupları 10^4 ; deney grupları 5×10^3 kat sulandırılarak EMM besiyerlerine 2'şer tekrarlı olacak şekilde ekildi. Mikrosantrifüj tüpündeki hücreler 3500g'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pellet dH₂O ile yıkandıktan sonra tekrar aynı koşullarda santrifüjlendi ve pellet üzerine 650 μ l PBS eklenerek 3 tekrarlı olacak şekilde 96'lık platelere 200 μ l konularak spektrofloreometrede kinetik okuma yapıldı.

3.9. MİKROSKOBİK İNCELEME

S. pombe hücreleri, çeşitli floresan boyalardan yararlanılarak ER stresinin hücre üzerinde meydana getirdiği etkilerin belirlenebilmesi için öncelikle konfokal mikroskobunda (Leica TCS SP8) görüntülendi. *S.pombe* ırklarına ait deney ve kontrol grupları rodamin ve akridin turuncusu ile aşağıda verilen aşamalar izlenerek boyandı ve görsel olarak analizi yapıldı. Rodamin boyama için Tablo 3.19’da verilen bileşenlerden yararlanılmıştır.

Tablo 3.19: Rodamin boyama için kullanılan solüsyonlar.

Bileşen	Miktar
Rodamin (5mM)	3,8 mg
Etanol	200 µl
Sodyum sitrat(%2 glikoz, pH:5)	1 mL

} Rodamin solüsyonu
için kullanıldı

S.pombe hücrelerinin rodamin boyası ile boyanabilmesi için öncelikle 500 µl örnek çöktürüldü ve daha sonrasında 1 mL sodyum sitrat ile süspansedildikten sonra 1 µl rodamin boyasından konularak 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 5 dk. 5000 rpm’de santrifüj edildi ve süpernatant atılarak pellet 500 µl PBS ile yıkandıktan sonra 10 µl kadar örnek alınarak mikroskopta görüntüleme yapıldı.

Çalışmada konak hücre olarak kullanılan *ED666* ve *fap1Δ* ırklarına ait canlılık ve apoptoz durumunun tespit edilmesi amacıyla ayrıca AO/EtBr (Actidine Orange/Ethidium Bromide) yöntemi kullanıldı. İlk olarak AO ve EtBr ayrı ayrı 1 mg/mL konsantrasyonun olacak şekilde PBS ile çözdürüldü. Sonrasında AO konsantrasyonu 60 µL/mL ; EtBr konsantrasyonu ise 100 µL/mL olacak şekilde bir araya getirilerek hacmi PBS ile mL’ye tamamlandı. *ED666* ve *fap1Δ* ırklarına ait hücreler EMM2 besiyerine ekilerek 30 °C, 180 rpm’de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası elde edilen taze kültürler 6500 g’de 10 dakika santrifüjle çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet taze besiyeri ile homojen olacak şekilde süspansedildi. Her bir ırkın başlangıç saatinde OD600 nm değeri 0,2 olacak şekilde EMM2 (kontrol) ve EMM2 + tunikamisin besiyerlerine ekimleri yapılarak 30 °C 180 rpm’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra hücreler 6.500 g’de 10 dakika santrifüjle çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1,5 mL PBS eklenerek homojen olarak süspansedildi.

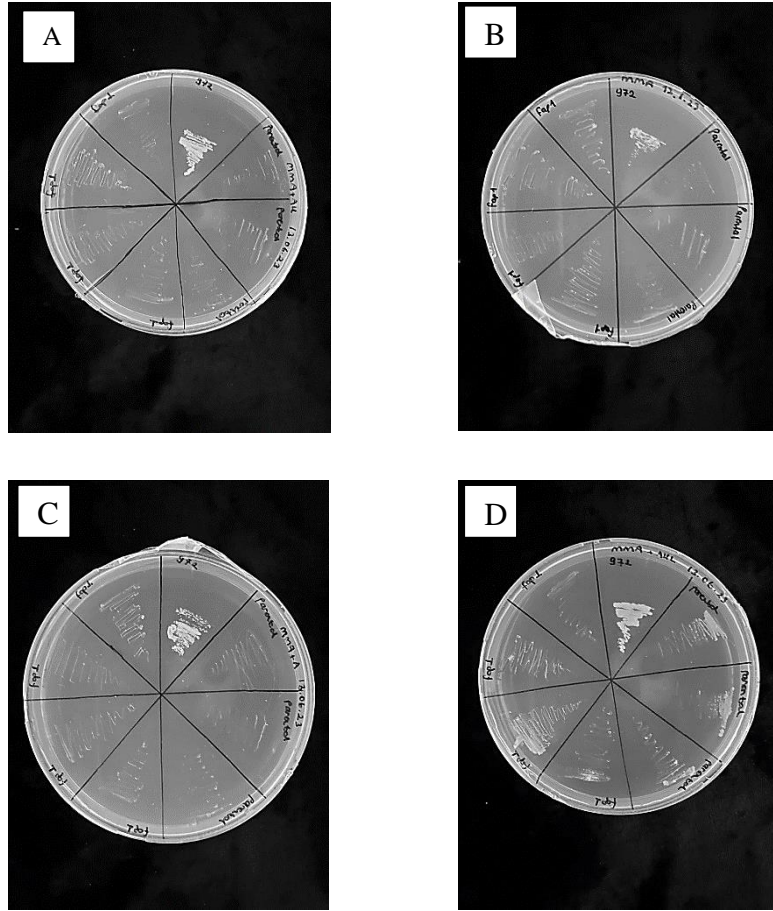
Sonrasında 5.000 g'de 5 dakika santrifüj ile hücreler çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı. Bu şekilde hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Son yıkama işlemi sonrası süpernatant atıldı ve 100 µL hücreye (2×10^5) 5 µL AO/EtBr eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5.000 g'de 5 dakika santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında 2 kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirildi. Son yıkama işleminden sonra pellet 100 µL PBS ile homojen olarak süspanse edildi. Sonrasında örneklerden 10 µL alınarak preparatlar hazırlandı ve Olympus BX53 marka floresan mikroskopta inceleme yapıldı. EtBr için eksitasyon 510 nm, emisyon 598 nm; acridine orange için 500 nm eksitasyon, 530 nm emisyon dalga boyları kullanıldı. Kontrol ve deney grubundaki apoptoza uğramış hücreler sayılarak değerlendirme yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. *S. POMBE* IRKLARININ GENOTİPİK KONTROLÜ

4.1.1. *S. pombe* Irklarının Seçici Besiyerinde Üreme Özellikleri

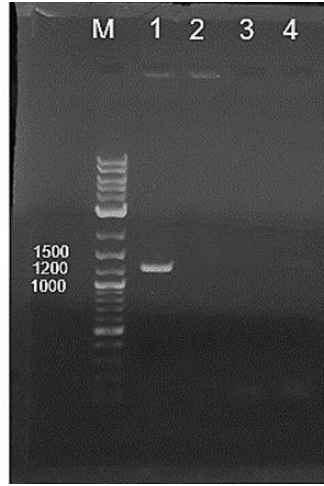
Hem parental *ED666* hem de *fap1Δ* mutantının oksotrofluk bakımından genotip kontrolü Bölüm 3.2.1’de verildiği gibi yapıldı. *ED666* ve *fap1* ırkının beklenildiği şekilde yalnızca tüm aminoasitlerin eklendiği besi ortamında ürediği gözlemlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Genotipik kontrol için selektif besiyerlerine (A: MMA+Adenin+U; B: MMA; C: MMA+Adenin; D: MMA+Adenin+Urasil+Lösin) ekilmiş *S. pombe* *ED666*, *972h⁻* ve *fap1Δ* ırklarının üreme profilleri.

4.1.2. *S. pombe* Irklarının PZR ile Genotipik Kontrolü

Genotipik kontrolü sağlanan *fap1Δ* ırkının genomunda *fap1* geninin yer almadığını göstermek amacıyla, bu gene özgü primerlerle yapılan PZR'nin Şekil 4.2'de verilen sonuçlarına göre *ED666* ırkında *fap1* geninin tam boy (1239 bç) olarak çoğaldığı, beklenildiği üzere bu genin delesyonlu olduğu *fap1Δ* ırkında herhangi bir ürünün oluşmadığı gözlemlendi.

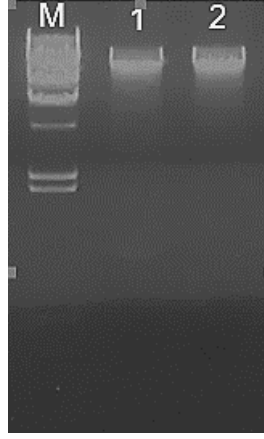


Şekil 4.2: Çalışmada kullanılan *fap1Δ* ırkının *fap1* geni bakımından PZR ile kontrolü. Sol baştan sırasıyla M: NEB 1kb Plus DNA Ladder; 1: *ED666* Genomik DNA'sı ;2: *fap1Δ* genomik DNA'sı;3: Negatif kontrol;4: Negatif kontrol.

4.2 REKOMBİNANT PLAZMİDLERİN OLUŞTURULMASI

4.2.1. *S. pombe*'den genomik DNA İzolasyonu

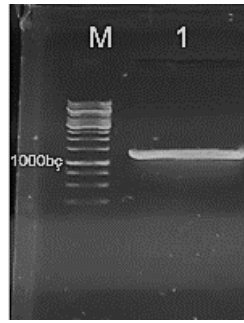
Klonlamada kullanılacak olan *fap1* geninin eldesi için *S. pombe* yabani ırkından genomik DNA izolasyonu yapıldı ve agaroz jel elektroforezi ile teyit edildi. Beklenen ağır yaygın bantlar Şekil 4.3'te görülmektedir.



Şekil 4.3: *S.pombe* yabani ırkıdan izole edilen genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi ile kontrolü (Sol baştan sırasıyla M: Thermo Scientific Lambda DNA/HindIII Marker; 1 ve 2: *S. pombe* genomik DNA'sı).

4.2.2 *S. pombe* *fap1* Geninin PZR ile Amplifikasyonu ve Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi

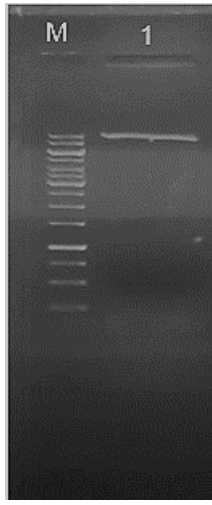
S. pombe yabani ırkıdan izole edilen genomik DNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve *S. pombe* *fap1* genine özgü olan primerler ile PZR gerçekleştirildi. PZR sonrasında ürünlerin boyutları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile doğrulandıktan sonra PZR ürünü saflaştırma kiti ile saflaştırıldı ve *Bgl*III ve *Not*I enzimleri ile kesimi yapılarak tekrar %1'lik agaroz jelde beklenen boyut ve kalite doğrulandıktan sonra agaroz jelden saflaştırma yapıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: *fap1* geninin *Bgl*III ve *Not*I enzimleriyle kesimi sonrasında saflaştırılması (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: Saflaştırılan kesim ürünü).

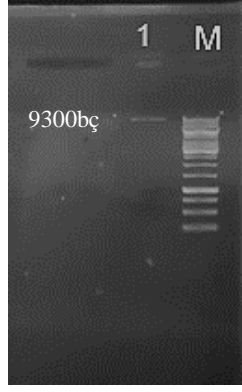
4.2.3. *pSGP572* Plazmidinin İzolasyonu, Restriksiyon Endonükleazlarla Kesimi ve Jelden Geri Kazanılması

Plazmidi lineer hale getirmek ve *fapI* geni ile ligasyonunu gerçekleştirebilmek için *Bgl*III ve *Not*I restriksiyon endonükleazlarıyla enzimlerin prospektüsünde önerilen koşullarda kesimi yapıldı ve %1'lik agaroz jelde beklenen boyut (~9300 bç) ve kalite doğrulandıktan sonra agaroz jelden saflaştırma yapıldı (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: pSGP572 plazmidinin *Bgl*III ve *Not*I enzimleriyle kesimi (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pSGP572 *Bgl*III + *Not*I kesim ürünü).

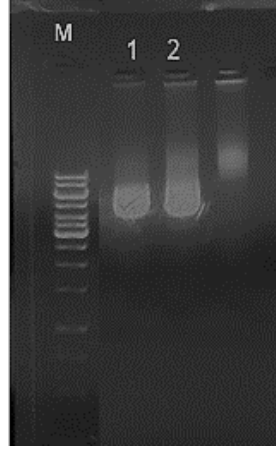
*Bgl*III + *Not*I restriksiyon endonükleazlarıyla kesilerek lineer hale getirilen plazmid agaroz jelde yürütülerek ilgili bantın (~9300 bç.) jelden geri kazanım kitiyle saflaştırması yapıldı. Jelden geri kazanım sonrasında kazanılan ürünün kontrolü Şekil 4.6'da verilen agaroz jel elektroforezi görüntüsü ile doğrulandı.



Şekil 4.6: pSGP572 plazmidinin jelden geri kazanımı sonrası kontrol edilmesi (Sol baştan sırasıyla: pSGP572 jelden geri kazanım ürünü; M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

4.2.4. pSGP572 ile *fapI* Geninin Ligasyonu ve Yeterli *E. coli DH5 α* Hücrelerine Transformasyonu

*Bgl*III ve *Not*I enzimleri ile lineer hale getirilerek izole edilen *pSGP572* ile daha önceden restriksiyon endonükleazlarla kesimi gerçekleştirilen *fapI* geninin ligasyonu için T4 DNA ligaz enzimi kullanıldı. Daha önceden *Bgl*III ve *Not*I restriksiyon endonükleazlarla kesimi yapıp agaroz jelde kontrolü sağlandıktan sonra jelden geri kazanımı sağlanan *pSGP572* ve *fapI* geninin konsantrasyonlarıyla orantılı olacak şekilde (*fapI*: 19,1 ng/ μ l; *pSGP572*: 30 ng/ μ l) uygun reaksiyon koşulları doğrultusunda ligasyon, 3:1 (insert/vektör) oranında gerçekleştirildi. Ligasyon ürünleri daha sonrasında *E. coli* DH5 α suşuna transfer edildi ve ampisilin içeren LBA besiyerinde, 37 °C’de, 1 gece inkübasyona bırakıldı. Oluşan kolonilerin kontrolü koloni PZR yapıldı. Burada da Tablo 3.7’ de verilen primerler kullanıldı. Şekil 4.7’de görüldüğü gibi *fapI* genini taşıyan pSGP572 rekombinant plazmidini yalnızca 1 ve 2 nolu koloniler içermektedir (Şekil 4.7). *fapI* genini taşıdığı gösterilen bu plazmidler İK01 ve İK02 olarak adlandırıldı. Bu sonuca göre 1 ve 2 numaralı koloniler seçilerek Bölüm 3.4.7.’de anlatıldığı gibi üretilen hücrelerden gliserol stok oluşturuldu ve plazmid izolasyonu yapıldı.



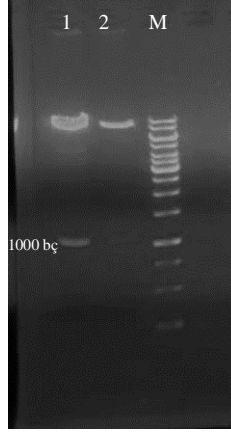
Şekil 4.7: Ligasyon ürünlerinin *E. coli DH5α* suşuna transformasyonu sonucu oluşan kolonilerin koloni PZR ile kontrolü. (Sol baştan sırasıyla M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: 1 numaralı koloni; 2: 2 numaralı koloni.

İzole edilen plazmidlerin konsantrasyonları nanodrop ile belirlendi (Tablo 4.1). İzole edilen 1. ve 2. plazmitlerin doğruluğu Bölüm 3.4.8.'de açıklandığı gibi *EcoRI* ile kesilerek ikinci bir kontrol sağlandı. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi izole edilen İK01 ve İK02 plazmidleri *EcoRI* Restriksiyon endonükleaz ile kesim sonucunda beklenen 2 bant tespit edildi (9.3 kb ve 1.2 kb).

Kullanılan örneklerin konsantrasyonları ve saflık dereceleri ;

1: 2559.3 ng/ µl ; A260/280: 2.01; A260/230: 2.34

2: 1467.4 ng/ µl; A260/280: 1.98; A260/230: 2,37



Şekil 4.8: pSGP572/*fap1Δ* plazmidleri EcoRI restriksiyon endonükleazı ile kesildikten sonra kontrolü (Sol baştan sırasıyla 2: pSGP572/*fap1Δ* plazmidi (1); 1: pSGP572/*fap1Δ* plazmidi; M:GeneRuler 1 kb DNA Ladder).

4.2.5. İK01 ve İK02 Rekombinant Plazmidlerin Sekans Analizi ile Doğrulanması

Son olarak bu çalışmada elde edilen İK01 ve İK02 plazmidlerinde *nmt1*promoter-gen-GFP kasetinin aynı okuma çerçevesinde olduğunu teyid etmek için hizmet alımı (MedSanTek) ile yaptırılan sekans sonuçlarına göre İK02’de istenen kasetin oluştuğu, İK01’de ise bir mutasyonun varlığı tespit edildi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10)

Buna göre, çalışmaya İK02 ile devam edildi. Şekil 4.11’da İK02’nin plazmidinin Benchling Programı kullanılarak çizilen haritası verildi.

Tablo 4.1: Dizilemede kullanılan primerler.

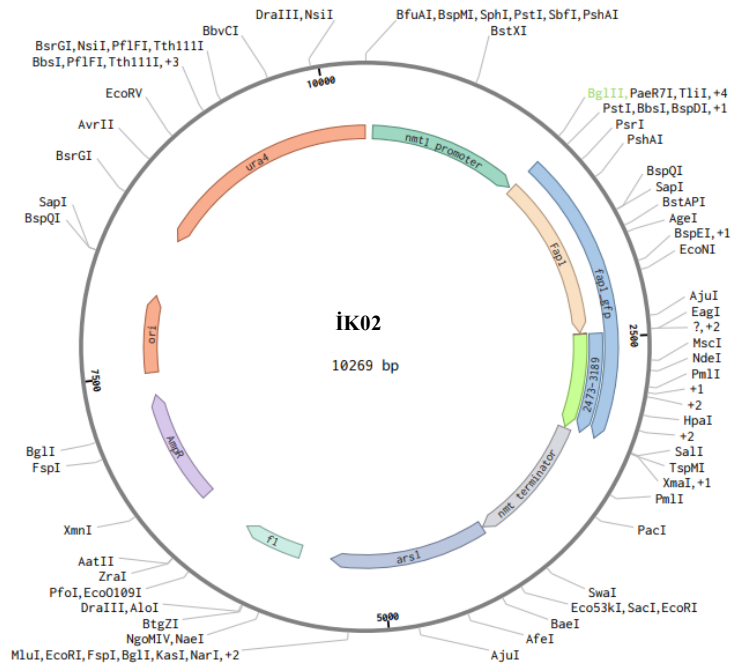
Primerlerin Adı	Primerin Dizisi	Tm (°C)
<i>nmt1</i> İleri Primeri	5' TTTCAATCTCATTCTCACTTTCTG 3'	55
GFP Geri Primeri	5' CTGTAGTTCCTCCGTCATCTTT 3'	55



Şekil 4.9: Dizilemede nmt ileri primeri ile elde edilen dizileme sonucu.



Şekil 4.10: Dizilemede GFP geri primeri ile elde edilen dizileme sonucu.



Şekil 4.11: İK02 Plazmidinin restriksiyon haritası.

4.3. İK02 PLAZMİDİNİN *S. POMBE*'YE TRANSFERİ

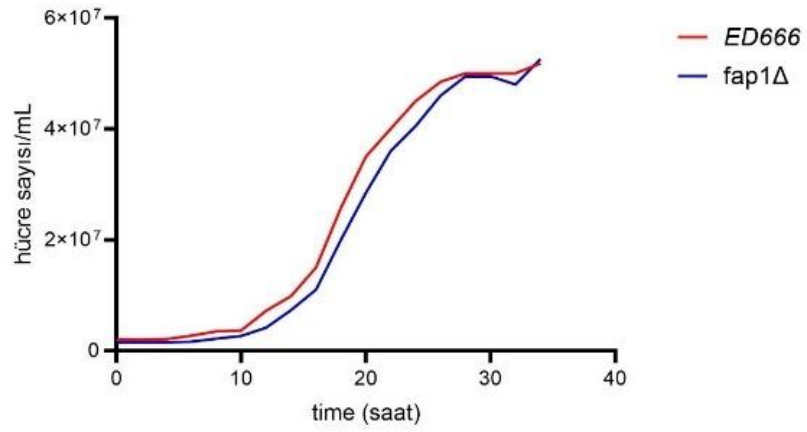
İK02 *S. pombe* ED666 ve *fap1Δ* Irklarına transfer edilerek GFP işaretli *fap1* genini içeren *S. pombe* hücreleri elde edildi ve ER stresinin hücre ölüm yolları üzerindeki etkisini ölçmek için kullanıldı. Aynı zamanda bu hücrelere pSGP572 de transfer edilerek hücrede plazmidinin toksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanıldı.

4.3.1. *S. pombe* Irklarının Üreme Eğrilerinin Çıkartılması

Önce, plazmidlerin transfer edileceği hücrelere doğru zamanda transformasyonu yapabilmek için üreme eğrileri Bölüm 3.5.1'de verildiği şekilde hesaplandı. ED666 ve *fap1Δ* *S.pombe* ırklarının %2 glukoz içeren YNB besiyerinde üreme eğrisi oluşturuldu. Kültürlerden 2 saatte bir 200 µL örnek alınarak 600 nm'de OD değeri ölçüldü. YNB sıvı besi ortamı, kör örnek olarak kullanıldı. 36 saat boyunca her bir kültür için elde edilen değerler kullanılarak üreme grafiği oluşturuldu. Her iki hücrenin üreme profili paralel çıktı (Şekil 4.12). Buna göre, her iki hücrenin logaritmik faza 16. saatte girdiği hesaplandı.

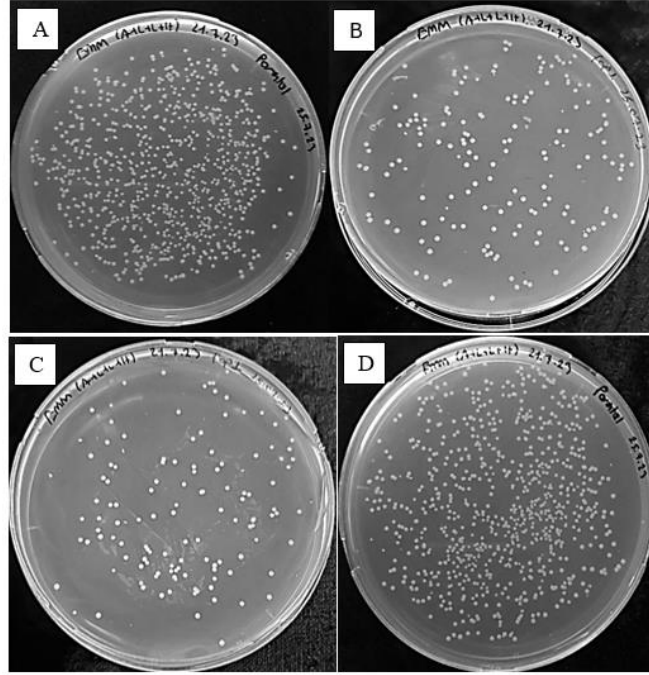
Tablo 4.2: 0-34 saatleri aralığında parental ve fap1 irkları için elde edilen değerler.

Saat	Parental	Fap1
0	0,041	0,03
2	0,04	0,03
4	0,042	0,03
6	0,054	0,033
8	0,07	0,043
10	0,073	0,053
12	0,144	0,083
14	0,197	0,147
16	0,3	0,22
18	0,515	0,4
20	0,7	0,57
22	0,8	0,72
24	0,9	0,81
26	0,97	0,92
28	1	0,99
30	1	0,99
32	1	0,96
34	1,035	1,051

**Şekil 4.12:** *fap1Δ* ve *ED666* irklarına ait üreme eğrisi.

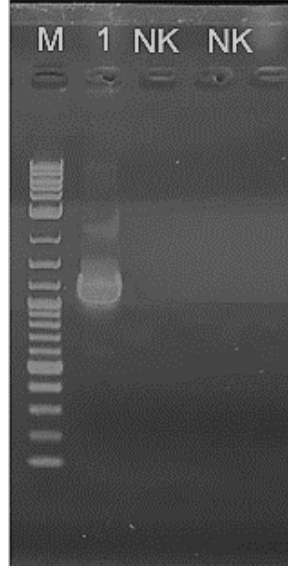
4.3.2. İK02 Rekombinant Plazmidinin *S. pombe* Irklarına Transferi

Hem *pSGP572* boş plazmidi hem de bu projede elde edilen *İK02* rekombinant plazmidi hem *S. pombe* *ED666* parental ırkına hem de *fap1Δ* mutantına elektroporasyon yöntemi ile transfer edildi. Transformasyon sonrası hücrelerin istenilen vektörü taşıyıp taşımadığını kanıtlamak için koloni PZR yapıldı ve % 1'lik agaroz jele yüklenerek bant büyüklükleri belirlenerek doğrulama sağlandı (Şekil 4.14).



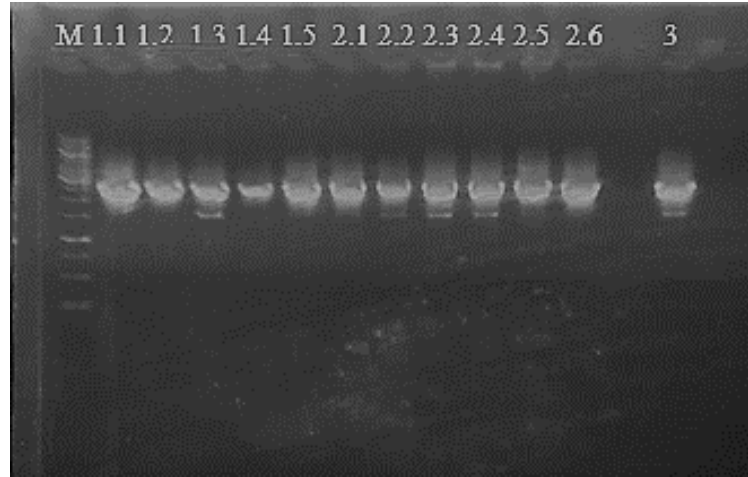
Şekil 4.13: Elektroporasyon sonrasında selektif besiyerinde üreyen koloniler. (A: *pSGP572* plazmidinin *ED666* hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler; B: *pSGP572* plazmidinin *fap1Δ* hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde ü üreyen koloniler C: *pSGP572/ fap1Δ* plazmidinin *ED666* hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler; D: *pSGP572/ fap1Δ* plazmidinin *fap1Δ* hücrelerine transformasyonu sonucunda EMM2 besiyerinde üreyen koloniler.

pSGP572 ve *İK02*'nin *S. pombe* *ED666*'ya elektroporasyon yöntemiyle transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası elde edilen hücreler EMM besiyerlerine ekilerek 30°C'de 3-6 gün üremesi sağlandı (Şekil 4.13).



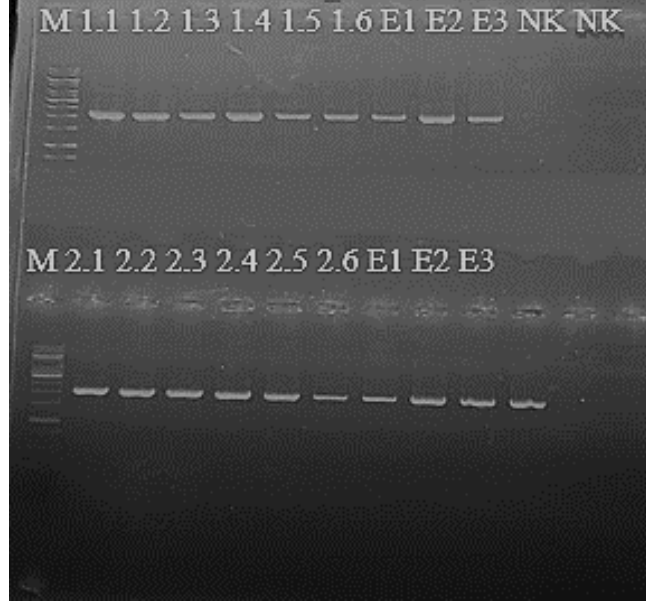
Şekil 4.14: pSGP572 boş plazmidinin *S. pombe* 'ye transformasyonu. Sol baştan sırasıyla GeneRuler 1 kb DNA Ladder; transformasyon ürünü, Negatif kontrol.

Her bir transformasyonun istenen plazmidi içerip içermediği Koloni PZR ile 6 koloni bir PZR tüpünde olacak şekilde 6 PZR ile toplam 36 koloni taranarak gerçekleştirildi. PZR sonuçlarına göre *fap1(1)3.* ve *fap1(2)2.* Numaralı kuyularda istenen bantlar gözlemlendi (Şekil 4.15)



Şekil 4.15: Koloni PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. Sol baştan sırasıyla M, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, *fap1(1)1,2,3,4,5;* *fap1(2)1,2,3,4,5,6;* 3: ED666).

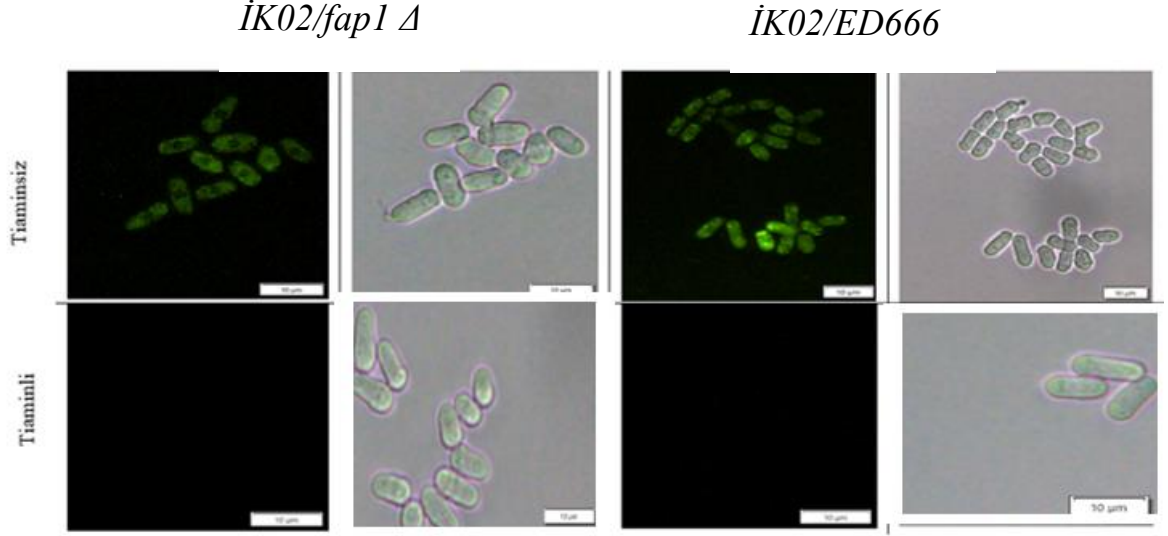
PZR sonuçlarına göre *fap1(1)3.* ve *fap1(2)2.* grup açılarak tekrar koloni PZR yapıldı. Buna göre, koloni PZR'si yapılan tüm ırkların istenen bantları (2175bç) içerdiği kanıtlandı (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: *fap1(1)* örneğine ait 3.ve *fap1(2)* örneğindeki 2.grup açılarak yapılan PZR sonuçlarının agaroz jel elektroforezi ile kontrolü. (Üstte sırasıyla M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; *fap1(1)*1,2,3,4,5,6; *ED666(1)*1,2,3,4,5 ;Altta sırasıyla M, GeneRuler 1kb DNA Ladder; *fap1(2)*1,2,3,4,5,6; *ED666(2)*1,2,3.

4.3.3. Transformant *S. pombe* Hücrelerinin Floresan Mikroskopta Teyidi

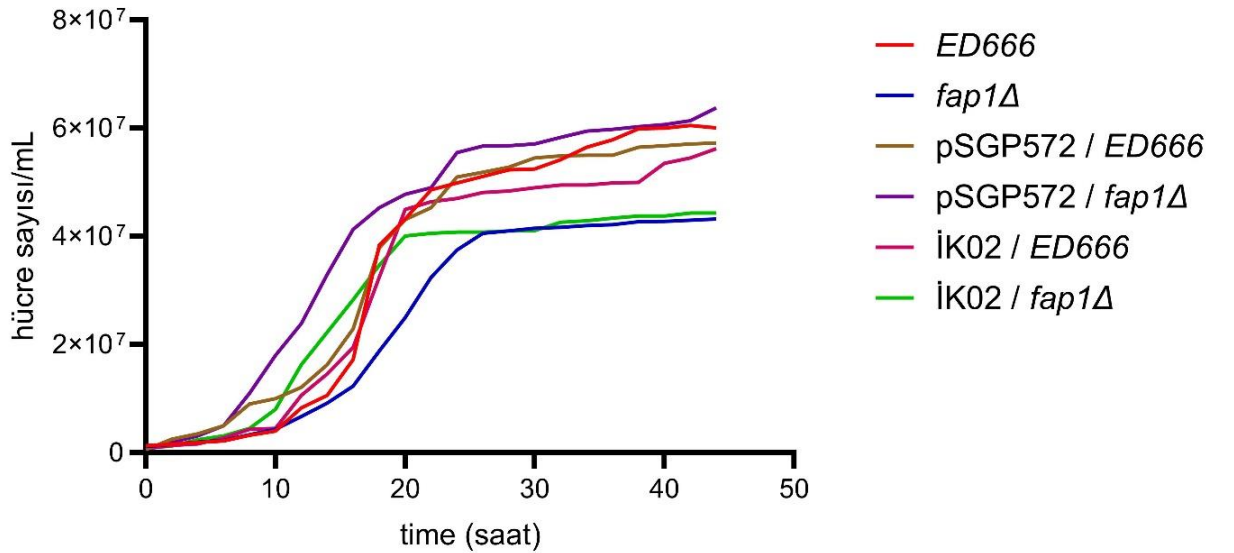
Transformant *S. pombe* hücreleri tiaminli ve tiaminsiz EMM2 besiyerinde üretildikten sonra elde edilen taze kültürlerden alınan hücre örnekleri Bölüm 3.9' da belirtildiği gibi hazırlanan preparatlar floresan mikroskopta incelendi. Tiaminli EMM2 besiyerinde üretilen transformant *S. pombe* hücrelerinde floresan ışığa gözlemlenmezken, tiaminsiz EMM2 besiyerinde üretilen transformant *S. pombe* hücrelerinde floresan ışımalar gözlemlendi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17: Tiaminli ve tiaminsiz EMM2 besiyerinde üretilen transformant *S. pombe* $\dot{I}K02/ED666$ ve $\dot{I}K02/fap1\Delta$ hücrelerinin floresan mikroskop altındaki görüntüsü.

4.3.4. Tüm *S. pombe* Irklarının Üreme Eğrilerinin Oluşturulması

Elde edilen *S. pombe* transformantlarının (pSGP572 / ED666, $\dot{I}K02$ / ED666, pSGP572 / $fap1\Delta$ ve $\dot{I}K02$ / $fap1\Delta$) üreme eğrilerinin çıkarılması Bölüm 3.5.1.'de Verildiği şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 4.18: A: $\dot{I}K02/fap1\Delta$ ve $\dot{I}K02/ED666$; B: ED666 ve pSGP572/ ED666; C: $fap1\Delta$ ve pSGP572/ $fap1\Delta$; D: $fap1\Delta$, pSGP572/ $fap1\Delta$, $\dot{I}K02/fap1 \Delta$ ve $\dot{I}K02/ED666$; E: ED666, pSGP572/ED666, $fap1\Delta$, pSGP572/ $fap1\Delta$, $\dot{I}K02/fap1\Delta$ ve $\dot{I}K02/ ED666$ ırklarına ait üreme eğrisi.

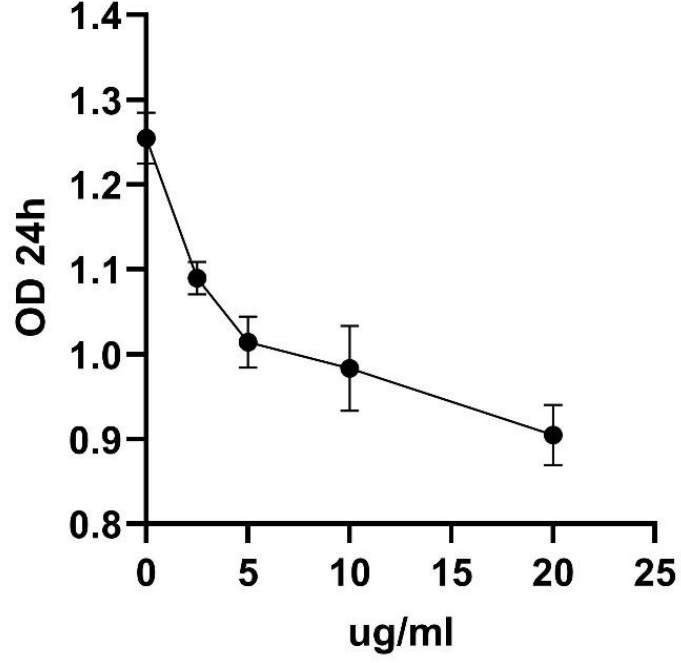
Tablo 4.3: Suşlara ait generasyon sayısı ve süreleri.

	St	n
<i>ED666</i>	2,15	1,86
<i>fap1Δ</i>	7,35	1,36
pSGP572/ <i>ED666</i>	3,28	1,22
pSGP572/ <i>fap1Δ</i>	4,30	1,86
İK02/ <i>ED666</i>	60	0,33
İK02/ <i>fap1Δ</i>	4,3	2,32

Buna göre üreme eğrilerine bakıldığında tüm suşlar arasında paralellik olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.18).

4.4. *S. POMBE* IRKLARINDA TUNİKAMİSİNİN MİNİMUM İNHİBİSYON KONSANTRASYONUNUN (MIC) BELİRLENMESİ

Sunulan tezde, Bölüm 3.8’de açıklandığı şekilde tunikamisinin minimum inhibisyon konsantrasyonu *S. pombe ED666* ırkında çıkarıldı ve buna göre IC₅₀ değeri tüm ırklar için 3,240 µg/mL olarak hesaplandı.

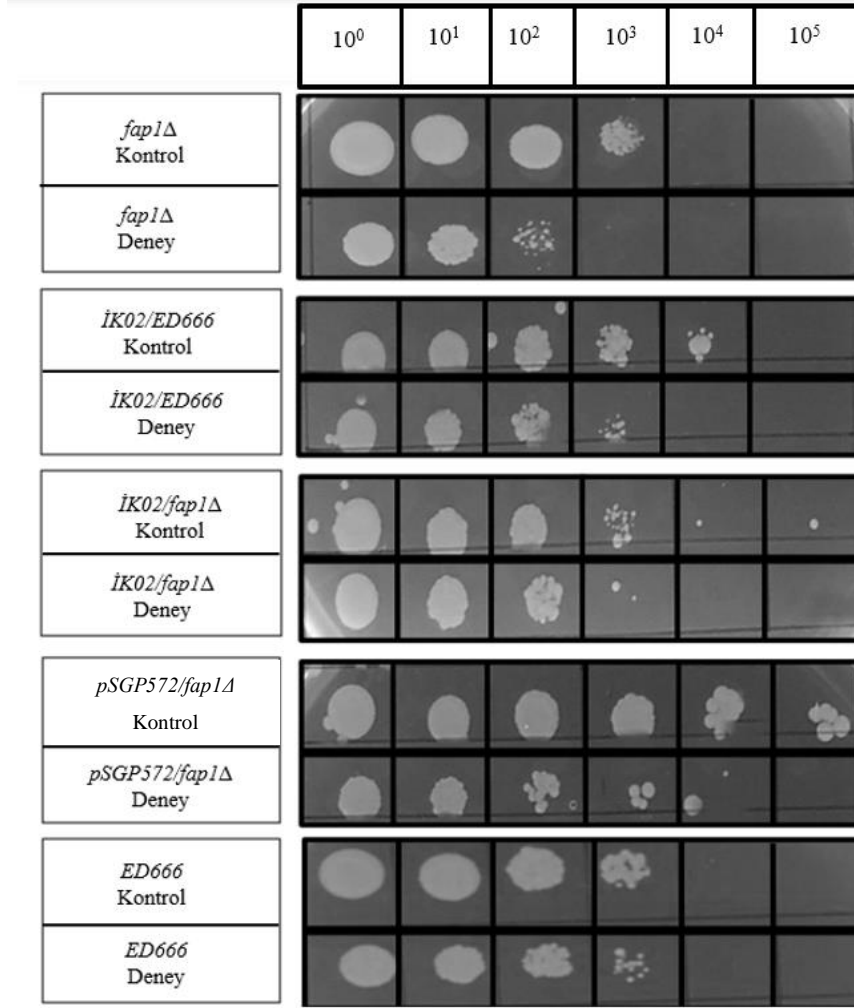


Şekil 4.19: *S. pombe* ED666 ırkına ait MİK eğrisi.

4.5. TUNİKAMİSİNİN ARACILI ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİNİN HÜCRE CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Tunikamisinin çalışmada kullanılan konak ırklar ile transformant ırklardaki hücre canlılığı üzerine etkisini belirleyebilmek amacıyla bölüm 3.6.1’de anlatıldığı şekilde spot ekim yapıldı.

Kontrol ve deney gruplarının seri sulandırım sonrası ekilerek oluşturulan spot üreme sonuçları Şekil 4.20’de görülmektedir.



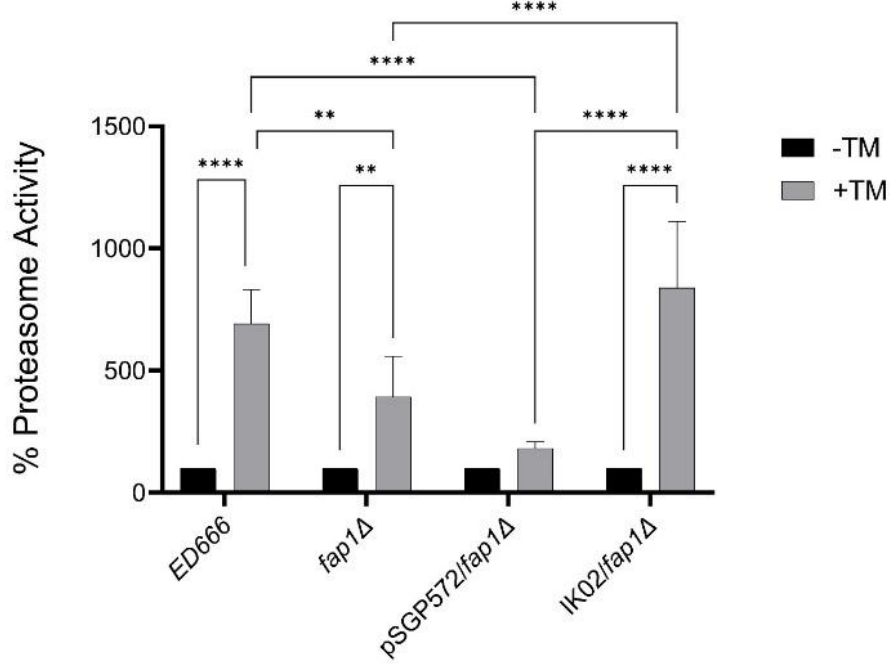
Şekil 4.20: *S.pombe* ırklarına ait tunikamisinin farklı konsantrasyonlardaki canlılık üzerine etkisini gösteren spotlar.

Buna göre şekil 4.20’de sulandırım oranlarının artışına bağlı olarak hücrelerdeki üreme miktarında azalma meydana geldiği görülmektedir. Kontrol ve deney grupları arasında ise deney gruplarında üremenin daha da az olduğu gözlemlendi.

4.6.TUNİKAMİSİNİN *S. POMBE* IRKLARINDAKİ PROTEOZOMAL AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİ

S.pombe transformantları (*pSGP572 / ED666*, *İK02 / ED666*, *pSGP572 / fap1Δ* ve *İK02 / fap1Δ*) ve konak *S. pombe* ırklarından (*ED666* ve *fap1Δ*), Bölüm 3.7.1.’de anlatıldığı şekilde protein izolasyonu yapıldı ve ardından protein miktarları hesaplandı. Kontrol ve deney gruplarında protein konsantrasyonu 50 µg/mL’ye ayarlandıktan sonra proteozomal aktivite

deneyi 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi (Bölüm 3.7.1). Deney sonucunda elde edilen veriler GraphPad Prism 7 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda oluşturulan grafik Şekil 4.21’de verildi.



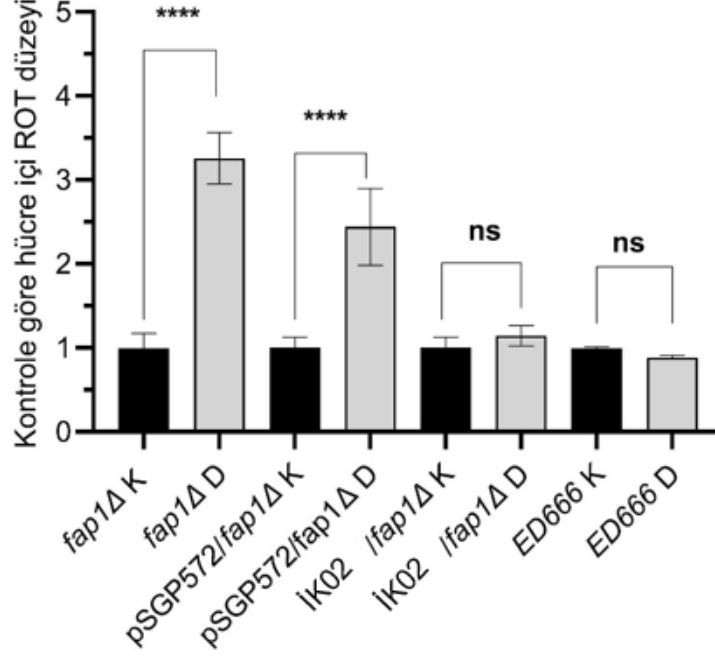
Şekil 4.21: *S.pombe* ırklarına ait, tunikamisin proteozomal aktivite üzerine etkisi.

Kontrol ve deney gruplarındaki proteozomal aktivite karşılaştırıldığında tunikamisin pSGP572 / *fap1Δ* ırkı haricindeki diğer tüm ırkların proteozomal aktivitelerinde anlamlı bir artışa sebep olduğu görülmektedir. *pSGP572/fap1Δ* ırkında proteozomal aktivitenin kontrole göre çok yüksek oranlarda değişmediği görülmüştür. *fap1Δ* ve *ED666* ırklarında kontrole göre tunikamisin uygulanmış deney gruplarında proteozomal aktivite yaklaşık olarak 10 kat artmaktadır. İK02 / *fap1Δ* ırkına bakıldığında ise kontrole göre deney grubundaki proteozomal aktivitedeki artış yaklaşık olarak 25 kat olarak ölçülmüştür.

4.7. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNDEKİ DEĞİŞİMLERİN İNCELENMESİ

Hücre içi oksidasyon düzeyinin belirlenebilmesi için bölüm 3.8’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen deney sonrasında ölçülen değerler baz alınarak kontrol grubunun ROT miktarı %100 olarak kabul edildi ve deney gruplarında ölçülen ROT miktarı kontrol ile kıyaslama yapılarak hesaplandı. Deney 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi ve elde edilen verilerin

analizleri GraphPad Prism 7 programı kullanılarak tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile değerlendirilerek grafik oluşturuldu.

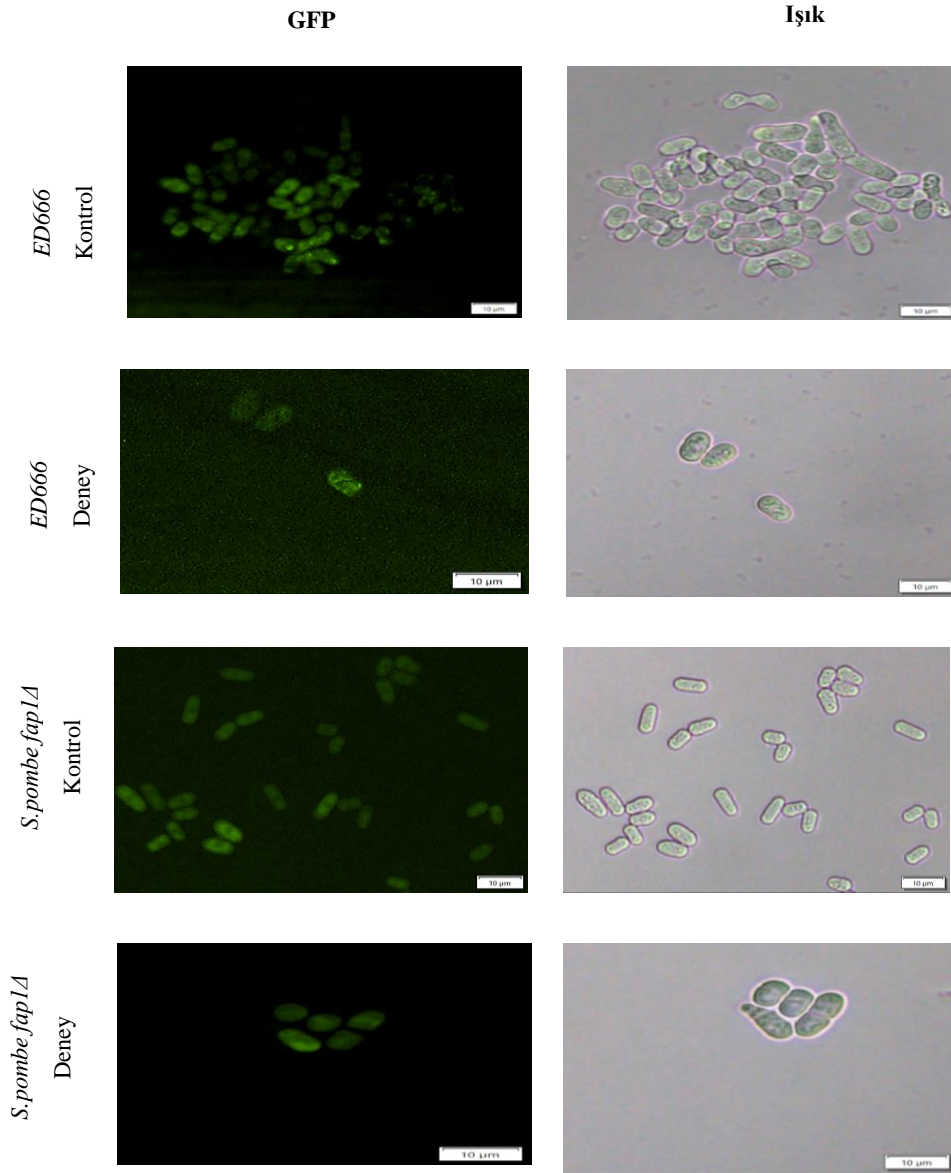


Şekil 4.22: *S.pombe* ırklarına ait hücre içi oksidasyon düzeyindeki değişim.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda *S. pombe fap1Δ* ve *pSGP572 /fap1Δ* ırklarında tunikamisin uygulamasının kontrole göre ROT miktarında anlamlı bir artışa sebep olduğu görülürken *İK02/fap1Δ* ırkında tunikamisin uygulamasına karşın ROT miktarında kontrole göre istatistiksel olarak azalma olduğu görüldü. *ED666* ırkında ise tunikamisin uygulamasının ROT miktarı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığı görüldü.

4.8. RODAMİN 123 İLE MİTOKONDİRİYAL MEMBRAN POTANSİYELİNDEKİ DEĞİŞİMİN İNCELENMESİ

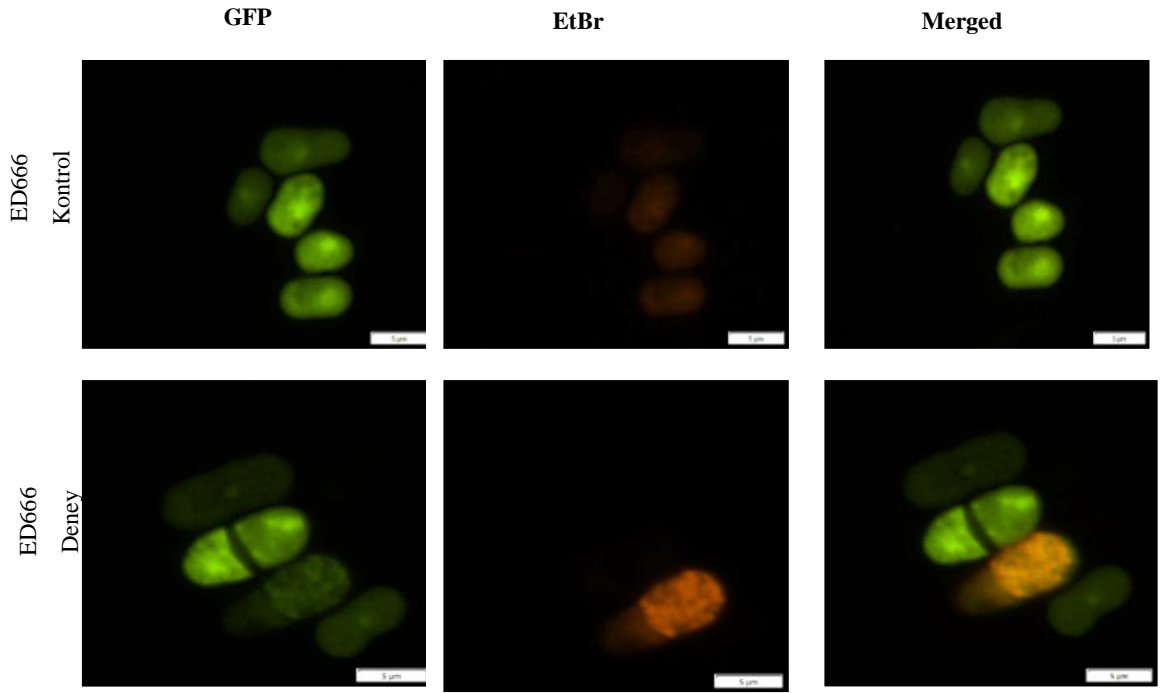
Mitokondriyal membran potansiyelinde meydana gelen değişimi gözlemleyebilmek amacıyla *S. pombe fap1Δ* ve *ED666* ırklarından elde edilen taze kültürler kullanılarak kontrol ve tunikamisine maruz kalmış deney grupları oluşturuldu. Ardından kontrol ve deney grupları bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde Rodamin 123 ile muamele edilerek floresan mikroskopta incelendi.



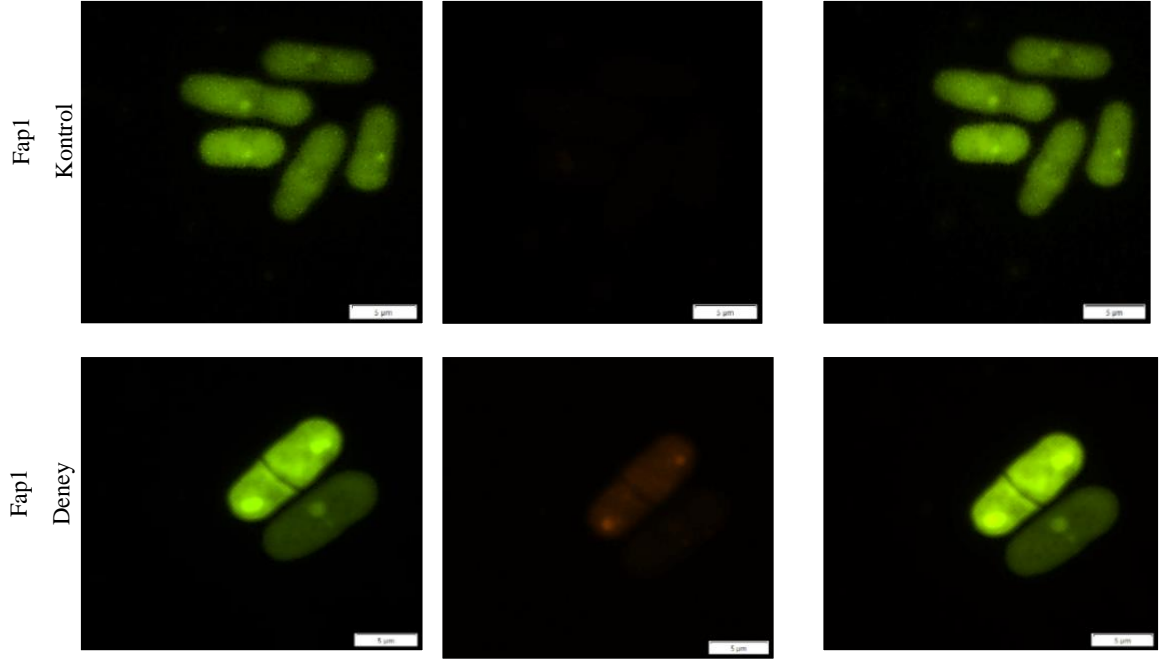
Şekil 4.23: Rodamin 123 ile muamele edilen *S.pombe* ırklarına ait kontrol ve deney gruplarının floresan mikroskop altındaki görüntüsü.

4.9. HÜCRELERDE TUNİKAMİSİNİN CANLILIK VE APOPTOZ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

S.pombe ırklarında tunikamisinin canlılık ve apoptoz üzerindeki etkisinin gözlemlenebilmesi adına *S. pombe fap1* ve *ED666* ırklarından elde edilen taze kültürler kullanılarak oluşturulan kontrol ve tunikamisine maruz kalmış deney grupları bölüm 3.9’da anlatıldığı şekilde AO/EtBr ile muamele edilerek Olympus BX53 floresan mikroskopta incelendi.



Şekil 4.24: *S. pombe* *fap1Δ* ve ED666 ırklarına ait kontrol ve deney gruplarının AO/EtBr ile muamelesi sonrası floresan mikroskop altındaki görüntüsü



Şekil 4.24 (devam):

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ökaryotik hücrelerde endoplazmik retikulum (ER), karakteristik kanallı yapısı olan ve protein sentezi, katlanma, translokasyon, kalsiyum homeostazisi ve lipit biyosentezinden sorumlu olan hayati bir membran organelidir. Ayrıca, protein kalite kontrolünde ve hücrel aktivitelelerin desteklenmesinde de etkin bir role sahiptir. Tüm ökaryotik hücrelerde, salgılanan ve transmembran proteinlerin ER'den çıkmadan önce doğru şekilde katlanması ve bir araya getirilmesi gerekir. ER'deki katlanmaya bir dizi enzim yardımcı olur. Çevresel ve fizyolojik koşullar ER'de ER stresi olarak adlandırılan, katlanmamış proteinlerin birikmesine neden olabilir. ERS, glukoz açlığı, tunikamisin veya 2-deoksiglikoz gibi çeşitli etkenlerle indüklenebilmektedir. glikosilasyon inhibisyonu; uygun disülfür bağı oluşumunu önleyerek protein katlanmasını etkileyebilmektedir (Cox, Shamu ve Walter, 1993). ER ise toplu olarak katlanmamış protein tepkisi (UPR) olarak adlandırılan hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek lümenindeki katlanmamış proteinlerin yükünü (ER stresi) düzenler (Walter ve Ron, 2011). ER stresinin ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesini inhibe ettiği, hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğu ve hücreyi apoptoza yönlendirdiği bildirilmiştir. Önceki çalışmalarımızdan birinde *S. pombe*'de tunikamisinin tetikleme sonucu oluşan ER stresinde otofajide de artış olduğu görülmüştür. ER lümenindeki oligosakkariltransferaz (OST) enziminin mutasyona uğraması ya da hücrelerin, UDP-Nasetilglukozamin-1-P transferaz (Alg7p) enzimini bloke eden bir antibiyotik olan tunikamisine (TM) maruz kalması proteinlerin N-glikosilasyonuna engel olarak apoptoza benzer şekilde hücre ölümüne sebebiyet verir (Takatsuki ve diğ., 1971; Hauptmann ve diğ., 2006; Hauptmann ve Lehle, 2008). ER stresinin tetiklediği gerek otofajide gerek apoptozda moleküler mekanizmaların aydınlatılmasında *S.pombe*'de yapılan ve yapılmakta olan bu çalışmaların önemi büyüktür. Yine araştırma grubumuz tarafından yapılan bir diğer çalışmada, bu tezin de konusu olan, *S. pombe fap1Δ* ırkında parental (*ED666*) ırka kıyasla, tunikamisin ile tetiklenen ER stresi altında apoptozun arttığı rapor edilmiştir (Yemenici, 2020).

Sunulan bu tez çalışmasında, L-pipekolat oksidaz, ("L-pipecolate oxidase") enzimini şifreleyen *SPBC354.15, fap1*, geninin tunikamisin tetikli ER stresinde apoptoz sürecinin gelişiminde etken rol oynayıp oynamadığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda, *fap1* geni 3'ucundan GFP geni ile kuyruklanacak şekilde *fap1: GFP* kaseti oluşturuldu. Ayrıca, bu kasetin *fap1* promotörü yerine tiamin ile düzenlenebilir olan bir promotör olan *nmt1* promotörünün

kontrolünde anlatım yapması sağlandı. pSGP572 plazmidinde promotör olarak *nmt1* promotörü, reporter gen olarak ise GFP geni bulunmaktadır. Tiamin ile baskılanabilen *nmt1* promotörü, *S. pombe*'de gen ifadesi çalışmalarında en yaygın olarak kullanılan promotördür (McQuire ve Young, 2006). Klonlama çalışmasında pSGP572 plazmidinin tercih edilmesinin sebebi, *nmt1* promotörünün tiamin ile baskılanabilmesi ve GFP işaret geni sayesinde transformant hücrelerdeki yeşil renkli floresan ışımının floresan mikroskop altında tespit edilebilmesidir. Bunun için, *fap1* geni sadece okuma çerçevesi içinde olacak şekilde pSG572 ekspresyon vektöründe klonlanarak bu vektör üzerinde *nmt1* kontrolünde çalışan *fap1*: GFP kasetini içeren İK02 plazmidi elde edildi (Şekil 4.11). Koloni PZR, enzim kesimi ve sekans analizi ile kasetin hatasız ve doğru bir şekilde bu rekombinant plazmidde (İK02) oluşturulduğu doğrulandı. İK02 plazmidi *S.pombe fap1Δ* ve *ED666* ırklarına ayrı ayrı transfer edilmeden önce, her iki ırkın da genotipik kontrolleri hem selektif besi ortamlarında üreme durumlarının izlenmesi, hem de gene özgü primerlerle yapılan PZR ile doğrulandı (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2, sırasıyla). Ek olarak, üreme grafikleri çıkarılan bu hücrelerin her ikisinin de 16. saatte erken log. evrede oldukları belirlendi (Şekil 4.12). İK02 ve pSGP272 plazmidlerinin bu *S. pombe* ırklarına transformasyonu elektroporasyon yöntemi ile gerçekleştirildi. Beklendiği gibi elde edilen çok sayıda transformantlardan (Şekil 4.14) seçilen kolonilerin doğrulaması, gen ve *nmt1* promotörüne özgü tasarlanan primerlerle koloni PZR tekniğini kullanarak gerçekleştirildi (Şekil 4.15 ve Şekil 4.16). İK02/*fap1Δ* ırkında sadece *nmt1* kontrolünde anlatım yapan *fap1* geni bulunurken, İK02/*ED666* ırkında doğal *fap1* geninin yanında *nmt1* kontrolünde de anlatım yapan *fap1* geni bulunduruldu (Şekil 4.15). Aynı zamanda, pSG572 plazmidi de *S.pombe fap1Δ* ve *ED666* ırklarına ayrı ayrı transfer edilerek pSG572 / *fap1Δ* ve pSG272/*ED666* ırkları elde edildi. Buradaki amaç, boş plazmidin bu *S. pombe* ırklarına olumsuz etkisinin olup olmadığını gözlemlemektir. Şekil 4.18'de verilen üreme grafiklerinde de görüldüğü gibi plazmidin (pSGP572) hücre üremesine negatif bir etkisi olmadığı gibi tüm transformantların benzer üreme profili göstermesi, çalışmanın ana amacı olan tunikamisin *fap1* geni açısından doğru değerlendirme yapılabilmesi için önemlidir.

İK02/*fap1Δ* ve İK02/*ED666* transformant *S. pombe* hücrelerinde *nmt1* promotörünün etkin bir şekilde çalıştığını ve aynı zamanda kasetin anlatım yapıp yapmadığını anlamak için, tiaminli ve tiaminsiz EMM2 besiyerinde bir gece üretildikten sonra elde edilen taze kültürlerden alınan hücre örnekleri floresan mikroskopta incelendi. Tiaminli besiyerinde bulunan 15µM/mL tiaminin *nmt1* promotörünü tamamen susturduğu, Şekil 4.17'de de görüldüğü gibi görünür

ışıkta hücre varken, flouresan ışımda yeşil noktaların gözlenmemesi ile belirlendi. Bunun yanında, hiç tiamin içermeyen besiyerinde üreyen hücrelerden hazırlanan preparatların mikroskop görüntülerinde tüm hücre yüzeyine yayılan yoğun küçük yeşil noktalar olarak tiamin kontrolünde, *fap1*: GFP kasetinin anlatım yaptığı tespit edildi (Şekil 4.17).

Sunulan bu tezde pSGP272 ve İK02 plazmidlerinin transferinde konak hücre olarak kullanılan *S. pombe* ırkları arasında parental ırk olan *S. pombe* ED666 ırkı tunikamisinin minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlemede kullanıldı. Buna göre, IC₅₀ değeri 3,240 µg/mL olarak hesaplandı. Daha sonraki analiz deneylerinde elde edilen *S.pombe* transformantları ve konak ırkları, çalışma amacımız doğrultusunda, seçilerek kullanıldı.

İlk olarak, *S.pombe* transformantları (İK02 / ED666, pSGP572 / *fap1Δ* ve İK02 / *fap1Δ*) ve konak *S. pombe* ırklarında (ED666 ve *fap1Δ*), tunikamisinin Şekil 4.20’de de görüldüğü gibi yaklaşık %50 üreme inhibisyonuna yol açtığı tespit edildi. Bu durum, hücre canlılığında doğrudan tunikamisinin etkili olarak yorumlandı.

Tunikamisinin proteozomal aktivite ve hücre içi reaktif oksijen türleri (ROT) üzerine *fap1* aracılı etkisini araştırmak için konak ırkların yanında transformantlardan sadece İK02 / *fap1Δ* ve pSGP572 / *fap1Δ* kullanıldı. Buradaki amaç Fap1 proteininin hücre içindeki varlığının söz konusu süreçlere etkisini araştırmaktır. Zira, İK02 / ED666’da *nmt1* kontrollü *fap1*’in yanında doğal promotörlü *fap1*’in de bulunması, deney sonundaki değerlendirmede karışıklığa yol açacağı için kullanılmadı. Çünkü bu ırkta tunikamisin, *fap1* geninin anlatımını ve/veya Fap1 proteininin doğrudan ROT ve proteozomal aktiviteyi düzenleyebilir olması tam olarak anlaşılamayacağı için sadece *nmt1* kontrolünde anlatım yapan *fap1* genini içeren İK02/*fap1Δ* hücreleri araştırıldı. Tunikamisin varlığında *S. pombe* pSGP572 / *fap1Δ* hariç tüm ırklarda proteozomal aktivitenin arttığı gözlemlendi. Aynı çalışmada grup analizi verilerine göre proteozomal aktivite, *S. pombe* *fap1Δ* ırkında ED666 ‘ya kıyasla düşerken, İK02 / *fap1Δ* ırkında *fap1Δ* ırkına oranla arttığı tespit edildi (Şekil 4.21). Bu sonuçlar, tunikamisinin ırklara bağlı olarak proteozomal aktiviteyi etkilediğini düşündürdü. Yine *fap1* genini içermeyen pSGP572 / *fap1Δ* ırkta da anlatımın anlamlı olmaması bu bulgumuzu da desteklemektedir. Mayalarda ER stresi oluşumuna bağlı olarak UPR’nin aktivasyonu oksitleyici bir ortam meydana gelir (Merksamer ve diğ., 2008). ER stresi ve buna bağlı olarak ROT miktarında bir artışın meydana gelmesi, hücrede UPR yolağının aktifleşmesini sağlayan temel bileşenler arasında yer almaktadır. Yalnızca ROT miktarında meydana gelen artışın, tek başına UPR’yi

tetikleyebileceği daha önce yapılan çalışmalarla desteklenmiştir. Ayrıca ER stresinin oluşmasıyla birlikte ROT üretiminin arttığını destekleyen çalışmalar literatürde yer almaktadır (Santos ve diğ., 2009). Diğer taraftan, *fap1* genini içermeyen ırklarda (pSGP572/*fap1Δ* ve *fap1Δ*) tunikamisin uygulaması ile ROT artarken, *fap1* genini içeren ırklarda (İK02/*fap1Δ* ve ED666) ROT'un değişmemesi de Fap1 proteininin hücre içinde varlığının ROT oluşumu üzerinde etkili olduğunu düşündürdü (Şekil 4.22). Mitokondriyal membran potansiyelindeki değişim Rodamin ile hem de ölü hücrelerin tespiti AO/EtBr muamelesi ile test edildi. Her iki çalışmada da gruplar arasında beklenenin aksine anlamlı farklar gözlenmedi (Şekil 4.23 ve 4.24). Bu aşamalar, transformantların GFP ışımının Rodamin ve AO/EtBr daki ışımalarla çakışması nedeniyle, sadece *S. pombe fap1Δ* ve ED666 ırkları kullanıldı. Ancak, Yemenici (2019)'nin raporunda *S. pombe fap1Δ* ırkında tunikamisin uygulamasının %60 apoptoza yol açtığı; ED666 ırkında ise değişim oluşturmadığı rapor edilmiştir. Bu durumun, Yemenicinin kullandığı besi ortamından kaynaklandığı düşünüldü. Çünkü, Yemenici tüm çalışmayı zengin besi ortamında yapmıştır. Sunulan tezde ise bu çalışmalar minimal ortamda gerçekleştirildi. Minimal ortamın stres yanıtını tetiklediği ve ilaç direncine yol açtığı bilinmektedir.

Sonuç olarak, *nmt1* kontrolünde çalışan *fap1*: GFP kasetini içeren İK02 plazmidi bu tez çalışmasında elde edildi ve *S.pombe fap1Δ* ve ED666 ırklarına ayrı ayrı transferi gerçekleştirildi. Transformantların üreme grafiklerinden ve mikroskopik kontrollerinden başarılı bir klonlama gerçekleştirildiği sonucuna varıldı. EMM2 besi ortamında üretilen bu ırkların tunikamisinin IC₅₀ dozuna, hücre farkı olamadan, yanıt verdiği görülse de proteozomal aktivitenin ve ROT'un Fap1 proteininin hücre içinde varlığına bağlı olduğunu düşündürdü. Buna karşın, membran potansiyeli ve apoptoz üzerindeki etkide Fap1 proteininin önemli olmadığı belirlendi. Bu sonuç, Yemenici (2019) tarafından sunulan çalışmayla uyuşmamakla birlikte, sunulan tezde transformantların tunikamisine verdikleri yanıt ile uyumludur.

KAYNAKLAR

- Abdulvahid, K. M., V. Burçak, 2018, HEK293 Hücreleri Üzerine Endoplazmik Retikulum Stresi Uyarını Tunikamisin Etkisi, *Experimed*, 8(3), 71-78.
- An, Y., Wang, X., Guan, X., Yuan, P., Liu, Y., Wei, L., Wang, F., Qi, X., 2024, Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in cardiovascular disease, *Cell Stress and Chaperones*, 29(1), 158-174.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D J., Koonin, E. V., 2000, Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 11319–11324.
- Cox, J. S., Shamu, C. E., & Walter, P., 1993, Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase, *Cell*, 73(6), 1197–1206.
- Cybulsky, A. V., 2017, Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases, *Nature Reviews Nephrology*, 13, 681-696.
- Ellgaard, L., Helenius, A., 2001, ER quality control: towards an understanding at the molecular level, *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 431-437.
- Fantes, P. A., Hoffman, C. S., 2016, A brief history of *Schizosaccharomyces pombe* research, A perspective over the past 70 years. *Genetics*, 203(2), 621–629.
- Forsburg, S. L., 2003, Overview of *Schizosaccharomyces pombe*, *Current Protocols in Molecular Biology*, 64, 13.4.1–13.4.3.
- Fowler, K. R., Sasaki, M., Milman, N., Keeney, S., Smith, G. R., 2014, Evolutionarily diverse determinants of meiotic DNA break and recombination landscapes across the genome, *Genome Research*, 24, 1650–1664.
- Friedman, J. R., Voeltz, G. K., 2011, The ER in 3D: a multifunctional dynamic membrane network, *Trends Cell Biology*, 21, 709–717.

- Ghaemmaghami, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K., Weissman, J. S., 2003, Global analysis of protein expression in yeast, *Nature*, 425, 737-741.
- Gomes, F. C., Pataro, C., Guerra, J. B., Neves, M. J., Corrêa, S. R., Moreira, E. S., Rosa, C. A., 2002, Physiological diversity and trehalose accumulation in *Schizosaccharomyces pombe* strains isolated from spontaneous fermentations during the production of the artisanal Brazilian cachaca., *Canadian Journal of Microbiology*, 48, 399–406.
- Gupta, R., Ambasta, R.K., Pravir, K., 2021, Autophagy and apoptosis cascade: which is more prominent in neuronal death ?, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 78, 8001-8047.
- Guydosh, N., R., Kimmig, P., Walter, P., Green, R., 2017, Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. Pombe*, *eLife* 6, e29216.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L., Hedges, S. B., 2001, Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants, *Science*, 293, 1129–1133.
- Hoffman, C. S., Wood, V., Fantes, P. A., 2015, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System, *Genetics*, 201(2), 403–423.
- Hu, J., Prinz, W. A., and Rapoport, T. A., 2011, Weaving the web of ER tubules. *Cell* 147, 1226–1231.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., Ohsumi, Y., 2000, A ubiquitin-like system mediates protein lipidation, *Nature*, 408, 488-492.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 2000, Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex, *Journal of Cell Biology*, 150, 1507-1513.
- Klionsky, D.J., Ohsumi, Y., 1999, Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 1-32.

- Kong, X., Murphy, K., Raj, T., He, C., White, P. S., Matisse, T. C., 2004, A combined linkage-physical map of the human genome, *American Journal of Human Genetics*, 75, 1143–1148.
- Marciniak, S.J., Chambers, J. E., Ron, D., 2022, Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress in disease, *Nature Reviews Drug Discovery*, 21, 115-140.
- Maundrell, K., 1997, Exploiting the thiamine biosynthetic gene *nmt1* for regulated expression of heterologous DNAs in fission yeast, In: Giga-Hama Y. (ed.), Springer, Foreign Gene Expression in Fission Yeast: *Schizosaccharomyces pombe*, Heidelberg, Berlin, 43-56.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M. D., Klionsky, D. J., Ohsumi, M., Ohsumi, Y., 1998, A protein conjugation system essential for autophagy, *Nature*, 395, 395–398.
- Moloudizargari, M., Asghari, M. H., Ghobadi, E., Fallah, M., Rasouli, S., Abdollahi, M., 2017, Autophagy, its mechanisms and regulation: implications in neurodegenerative diseases, *Ageing Research Reviews*, 40, 64-74.
- Mukaiyama, H., Nakase, M., Nakamura, T., Kakinuma, Y., Takegawa, K., 2010, Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *FEBS Letters*, 584(7), 1327-1334.
- Murrow, L., Debnath, J., 2013, Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8, 105-137.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., Ohsumi, Y., 2009, Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 458-467.
- Nami, B., Donmez, H., Kocak, N., 2016, Tunicamycin-induced endoplasmic reticulum stress reduces in vitro subpopulation and invasion of CD44+/CD24- phenotype breast cancer stem cells, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 68(7), 419-426.
- Orr-Weaver T., L., Szostak J., W., Rothstein, R., J., 1981, Yeast transformation: a model system for the study of recombination, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 6354–6358.

- Sipiczki M, 2000, Where does fission yeast sit on the tree of life ?, *Genome Biology*, 1, 1011.
- Sipiczki M, 2004, Fission yeast phylogenesis and evolution, in *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, In: Egel R. (ed), Springer, *Genetics, Genomics, and beyond*, , Berlin, 431–443.
- Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G., 1971, Tunicamycin, a new antibiotic, Isolation and characterization of tunicamycin, *The Journal of Antibiotics*, 4, 215-23.
- Tang, Z., Edwalds-Gilbert, G., 2016, Nucleic acid and protein sample preparation from yeasts, In: Micic, M. (ed.), Springer, *Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples*, New York, 285–305.
- Taşci, N., 2021, *Tunikamisin ile uyarılmış endoplazmik retikulum stresine bağlı gelişen apoptozis üzerine shilajitin etkileri*, Yüksek Lisans, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Tsukada, M., Ohsumi, Y., 1993, Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Letters*, 333, 169-174.
- Tucker, K. A., Reggiori, F., Dunn Jr., W.A., Klionsky, D. J., 2003, Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not, pexophagy, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 48445-48452.
- Volschenk H, Van Vuuren, H. J., Viljoen-Bloom M., 2003, Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*, *Current Genetics*, 43, 379–391.
- Vyas, A., Freitas, A. V., Ralston, Z. A., Tang, Z., 2021, Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*: A Unicellular “Micromammal” Model Organism. *Current Protocols*, 1(6), 151.
- Wang, S., Binder, P., Fang, Q., Wang, Z., Xiao, W., Liu, W., Wang, X., 2018, Endoplasmic reticulum stress in the heart: insights into mechanisms and drug targets, *British Journal of Pharmacology*, 175, 1293-1304.
- West, M., Zurek, N., Hoenger, A., Voeltz, G. K., 2011, A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature, *Journal of Cell Biology*, 193, 333–346.

- Wood V, 2006, How to get the most from fission yeast genome data, European Fission Yeast Meeting computing workshop, 2006, *Yeast*, 23, 905–912.
- Xia, S. W., Wang, Z. M., Sun, S. M., Su, Y., Li, Z. H., Shao, J. J., Tan, S. Z., Chen, A. P., Wang, S. J., Zhang, Z. L., Zhang, F., Zheng, S. Z., 2020, Endoplasmic reticulum stress and protein degradation in chronic liver disease, *Pharmacological Research*, 161, 105218.
- Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., Klionsky, D. J., 2006, Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 30299-30304.
- Yoshida, N., Akazawa, S.-I., Katsuragi, T., Tani, Y., 2004, Characterization of two fructosyl-amino acid oxidase homologs of *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(4), 278–280.
- Zhang, Y., Qi, Y., Huang, S., Jiang, X., Xiao, W., Wang, L., Liu, Z., Liu, S., 2022, Role of ER stress in xenobiotic-induced liver diseases and hepatotoxicity, *Oxidative Med Cell Longevity*, 4640161.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	İrem KARAN
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Yıldız Teknik Üniversitesi
Fakülte	Fen Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Kimya
Mezuniyet Yılı	18.09.2020

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

Makale ve Bildiriler	