



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ASPARTAM ve SWI6 İLİŞKİSİNİN *Schizosaccharomyces pombe*'DE
İNCELENMESİ**

Beste BAYRAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Bedia PALABIYIK**

Haziran, 2019

İSTANBUL

Bu alışma, 12.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

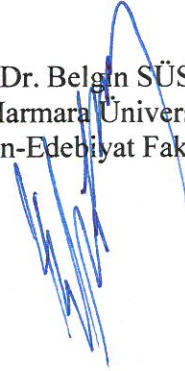
Tez Jürisi



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



Prof. Dr. Ercan ARICAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Belgin SÜSLEYİCİ
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi 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.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 30854 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilim birikimle ilerler. Bu yüzden en ufak buluşlar dahi birleştiklerinde büyük resmi görmemizi sağlarlar ve bize yeni perspektifler katarlar. Hücrenin karmaşık örüntüsünün açığa çıkarılmasında bir adım daha ilerlemek adına tasarlanmış bu çalışmanın, gelecekte üzerine yeni bilgiler eklenerek topluma faydalı bir sonuca ulaşması, beni en çok onan şey olacaktır.

İstanbul Üniversitesi'ndeki Yüksek Lisans mevcudiyetim boyunca bana pozitif bir çalışma ortamı sunan, başta bir akademisyene yaraşan hoşgörülü kişiliğiyle saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Bedi PALABIYIK olmak üzere, icra ettiğimiz işe dört kolla sarılan Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER'e, üzerimde büyük emeği geçen Araş. Gör. Merve YILMAZER'e, azmiyle bana ilham veren Araş. Gör. Burcu KARTAL'a, kısacası tüm Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı ile Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü mensuplarına, öğrencisiyle öğretim üyeleriyle, teşekkür ederim.

Ve elbette ki, farklı şehirlerde yaşıyor olsak dahi bana eğitim hayatımın her alanında destek çıkan ve güven duyan sevgili aileme, sergiledikleri cesaret adına sonsuz teşekkür ediyorum.

Haziran 2019

Beste BAYRAK

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. ASPARTAM	3
2.1.1. Aspartamın Dünü ve Bugünü	3
2.1.2. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması	4
2.1.3. Aspartamın Genotoksik ve Kanserojenik Bulguları	5
2.2. SWI6	6
2.2.1. Gen ve Protein Yapısı.....	6
2.2.2. İşlevi	7
2.3. KANSER EPİGENETİĞİ	8
2.3.1. HP1 Ailesi Proteinlerinin Kanserle İlişkisi	11
2.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
2.5. <i>S. pombe</i> 'DE ÇEŞİTLİ HÜCRESEL SÜREÇLER	13
2.5.1. Enerji Metabolizması.....	13
2.5.2. Stres Yanıtı	15
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	17
3.1. ORGANİZMA VE BESİYERLERİ	17
3.2. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ, GENOTİP TAYİNİ VE SAKLANMASI	17
3.3. ASPARTAM DOZUNUN BELİRLENMESİ	19
3.4. ORGANİZMANIN ASPARTAM İÇEREN BESİYERİNDE ÜREME SÜRECİNİN GÖZLENMESİ	19
3.5. HÜCRE CANLILIĞI BELİRLENMESİ (“COLONY FORMING UNITS” YÖNTEMİ)	20

3.6. GLUKOZ TÜKETİM TESTİ	20
3.7. MİKROSKOPİK İNCELEME	21
3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON	21
3.9. TOTAL RNA İZOLASYONU	22
3.9.1. Kalitatif Analiz	22
3.9.2. Kantitatif Analiz	23
3.10. cDNA SENTEZİ	23
3.11. GERÇEK ZAMANLI PZR İLE GEN ANLATIMI ANALİZİ.....	24
3.11.1. Verilerin Değerlendirilmesi.....	26
3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. GENOTİP TAYİNİ	27
4.2. ASPARTAMIN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ.....	29
4.3. ASPARTAMIN ÜREME SÜRECİNE ETKİSİ.....	31
4.5. ASPARTAMIN GLUKOZ TÜKETİMİ	32
4.6. ASPARTAMIN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİ	33
4.7. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON	36
4.8. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ.....	37
4.9. ASPARTAMIN ÇEŞİTLİ HÜCRESEL SÜREÇLER ÜZERİNE ETKİSİ.....	38
4.9.1. Aspartamın kromatin yapısı üzerine etkisi	38
4.9.2. Aspartamın enerji metabolizmasına etkisi.....	39
4.9.3. Aspartamın stres yanıtına etkisi.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
KAYNAKLAR.....	45
EKLER	55
EK-A. BESİYERLERİ.....	55
EK-B. ÇÖZELTİLER	57
ÖZGEÇMİŞ.....	58

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Aspartamın kimyasal yapısı (Budavari, 1989).	4
Şekil 2.2: Swi6 proteininin “ribbon” diyagramı (Wang ve diğ., 2000).	7
Şekil 2.3: Swi6’nın diğer proteinlerle etkileşimi (Motamedi ve diğ., 2008).	8
Şekil 3.1: Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kullanılan “DNA Ladder”.	19
Şekil 4.1: <i>swi6Δ</i> ırkının <i>swi6</i> gen bölgesi gösteren şema.	27
Şekil 4.2: <i>swi6Δ</i> ırkının KANMX4 içeren <i>swi6</i> gen bölgesinin ve PZR’de kullanmak üzere seçilen primerlerin DNA dizisi.	28
Şekil 4.3: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. (M) Marker, (1) <i>swi6Δ</i> ’da üst bölgeden Swi6UpF ve KANMX4R ile çoğaltılan 972 bp’lik bant, (2) <i>swi6Δ</i> ’da alt bölgeden KANMX4F ve Swi6DownR ile çoğaltılan 1180 bp’lik bant, (3) Parental’de <i>swi6</i> genine ait üst bölge, (4) Parental’de <i>swi6</i> genine ait alt bölge.	28
Şekil 4.4: Farklı aspartam konsantrasyonları uygulanması sonucu gerçekleştirilen spot ekimler.	29
Şekil 4.5: Aspartam uygulanması sonucu oluşan koloniler. (A) Parental (B) Parental + APM (C) <i>swi6Δ</i> (D) <i>swi6Δ</i> + APM.	30
Şekil 4.6: CFU analizi, P (260±48.08), PA (220.5±12.02), S (41±1.73), SA (34.33±4.62), N=3.	31
Şekil 4.7: Hücre üreme eğrisi.	32
Şekil 4.8: Aspartam uygulanması sonucu gözlenen glukoz tüketim hızı grafiği.	33
Şekil 4.9: Hücre boyut analizi. P (7.28±1.3), PA (9.03±1.65), S (12.05±1.70), S (12.28±1.65), N=30.	34
Şekil 4.10: Parental ve aspartam uygulanmış parental ile <i>swi6Δ</i> ve aspartam uygulanmış <i>swi6Δ</i> hücrelerinin görünür ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.	35
Şekil 4.11: Hücre içi oksidasyon analizi. P (0.428±0.097), PA (0.264±0.072), S (1.010±0.062), SA (0.903±0.095), N=3.	36
Şekil 4.12: RNA jel görüntüsü (1) P, (2) PA, (3) S, (4) SA.	37

Şekil 4.13: cDNA jel görüntüsü, (M) Marker, (2) P, (3) PA, (4) S, (5) SA.....	38
Şekil 4.14: Aspartamın <i>swi6</i> gen anlatımına etkisi.	38
Şekil 4.15: Aspartam uygulamasının parental ve <i>swi6Δ</i> ırklarında <i>fbp1</i> , <i>hxx2</i> , <i>tup11</i> , <i>cyr1</i> ve <i>cox4</i> gen anlatımına etkisinde SA/S ve PA/P oranları arasında, <i>fbp1</i> geni için $P < 0.01$ (**) değerinde ve <i>hxx2</i> ile <i>tup11</i> genleri için $P < 0.0001$ (****) değerinde fark mevcuttur; <i>cyr1</i> ve <i>cox4</i> genleri için fark anlamlı değildir.	40
Şekil 4.16: Aspartam uygulamasının parental ve <i>swi6Δ</i> ırklarında <i>atf1</i> , <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> gen anlatımına etkisinde SA/S ve PA/P oranları arasında, <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genleri için $P < 0.0001$ (****) değerinde fark mevcuttur, <i>atf1</i> geni için fark anlamlı değildir.	41



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: HP1 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim sonucu oluşturdukları kanser tipleri.	11
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ırklarının genotipleri.	17
Tablo 3.2: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR tekniğinin bileşenleri ve miktarları.	18
Tablo 3.3: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR tekniğinin koşulları.	18
Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan <i>S. pombe</i> ırklarının genotip tayini için kullanılan primerler.	18
Tablo 3.5: Çalışma süresince uygulanan kültür dizaynı.	20
Tablo 3.6: cDNA sentez bileşenleri.	23
Tablo 3.7: cDNA sentez koşulları.	23
Tablo 3.8: GZ-PZR tekniğinde kullanılan primerler ve dizileri.	24
Tablo 3.9: GZ-PZR tekniğinde kullanılan bileşenler ve miktarları.	25
Tablo 3.10: GZ-PZR tekniğinde kullanılan reaksiyon koşulları.	25
Tablo 4.1: İzolasyon sonucu elde edilen RNA miktarları.	37

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
%	: Yüzde
°C	: Santigrad derece
α	: Alfa
β	: Beta
Δ	: Delta
γ	: Gama
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
atm	: Atmosfer
CaCl_2	: Kalsiyum klorür
CuSO_4	: Bakır (II) sülfat
dH ₂ O	: Distile hidrojen dioksit
dL	: Desilitre
EtBr	: Etidyum bromür
EtOH	: Etil alkol
FeCl_3	: Demir (III) klorür
H_3BO_3	: Borik asit
g	: Gram
kg	: Kilogram
kb	: Kilobaz
kDA	: Kilodalton
KH_2PO_4	: Potasyum dihidrojen fosfat
KI	: Potasyum iyodür
L	: Litre
MgCl_2	: Magnezyum klorür
Mb	: Megabaz
mg	: Miligram
mL	: Mililitre

mm²	: Milimetre kare
MgSO₄	: Magnezyum sülfat
MnSO₄	: Mangan (II) sülfat
NaCl	: Sodyum klorür
Na₂HPO₄	: Disodyum hidrojen fosfat
Na₂MoO₄	: Sodyum molibdat
ng	: Nanogram
(NH₄)₂SO₄	: Amonyum sülfat
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojenin gücü (“Power of Hydrogen”)
V	: Volt
xg	: Çarpı yerçekimi kuvveti
ZnSO₄	: Çinko sülfat

Kısaltmalar

Açıklama

ADI	: Kabul edilebilir günlük alım (“Acceptable Daily Intake”)
APM	: Aspartam
ATP	: Adenozin trifosfat
bç	: Baz çifti
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CD	: “Chromo domain”
cDNA	: Tamamlayıcı DNA (“Complementary DNA”)
CESR	: Çevresel Stres Temel Yanıtı (“Core Environmental Stress Response”)
CFU	: Koloni Oluşturan Birimler (“Colony Forming Units”)
CoA	: Koenzim A (“Coenzyme A”)
CpG	: Sitozin-fosfat-guanin
CSD	: “Chromoshadow domain”
C_t	: Eşik çevrimi (“Threshold cycle”)
DAPI	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleozid trifosfat
DTT	: Ditiyotritol

EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
FDA	: “Food and Drug Administration”
GZ-PZR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
H3K9Me	: Histon-3-Lizin-9 metilasyonu
HP1	: Heterokromatin protein 1
HU	: Hidroksiüre
JECFA	: “The Joint FAO/WHO Expert Committee”
kb	: Kilobaz
MAPK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz (“Mitogen-activated protein kinase”)
MAPKK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz
MAPKKK	: Mitojen ile aktive olan protein kinaz kinaz kinaz
MMA	: Agarlı minimal besiyeri (“Minimal Media Agar”)
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit hidrojen
NCBI	: “National Center for Biotechnology Information”
NTC	: Kalıp içermeyen kontrol (“No template control”)
OD	: Optik yoğunluk (“Optical density”)
PBS	: Fosfat tamponlu salin (“Phosphate-buffered saline”)
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
PKA	: Protein kinaz A
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SAPK	: Stres ile aktive olan protein kinaz
SCF	: “Scientific Committee on Food”
sn	: Saniye
TAE	: Tris-asetat EDTA tamponu
T_m	: Erime sıcaklığı (“Melting temperature”)
TCA	: Trikarboksilik asit döngüsü
UV	: Ultraviyole
YEA	: Agarlı maya özütü besiyeri (“Yeast Extract Agar”)
YEL	: Sıvı maya özütü besiyeri (“Yeast Extract Liquid”)
YES	: Takviyeli maya özütü besiyeri (“Yeast Extract Supplemented”)

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ASPARTAM ve SWI6 İLİŞKİSİNİN *Schizosaccharomyces pombe*'DE İNCELENMESİ

Beste BAYRAK

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Bedia PALABIYIK

Aspartam (APM) dünya çapında 1981'den beri ilaçlar da dahil olmak üzere birçok üründe yaygın olarak kullanılan ve besin değeri olmayan birinci kuşak bir yapay tatlandırıcıdır. Her ne kadar FDA tarafından onaylı bir madde olsa da yapılan medikal çalışmalarda lenfoma ve lösemiye sebep olduğu tespit edilmiştir. Moleküler çalışmalarda ise *TP53* tümör baskılayıcı geninin ve *c-Myc* ve *Ha-ras* onkogenlerinin ekspresyonlarında artış yarattığı; metabolize edilmesi sonucu oluşturacağı formaldehitin DNA-DNA ve DNA-protein kovalent bağlantılarına, kardeş kromatid değişimine yol açabileceği kanıtlanmıştır. Bulunan bu sonuçlar ile aspartamın kanserojenik etkileri teyit edilmiştir.

Çalışmada, bu etkileri ortaya çıkaran moleküler mekanizmaların hücre işleyişi memelilere benzeyen ancak daha basit yapılı bir model organizma olan *Schizosaccharomyces pombe*'de incelenmesi amaçlanmıştır, inceleme için insan HP1 ailesi ortologu olan *swi6* geni seçilmiştir. Swi6 telomer, sentromer ve eşleşme tipi lokuslarında heterokromatin yapının düzenlenmesini sağlayan bir proteindir. Öte yandan, HP1 proteininin ise çeşitli kanser tiplerinde gen anlatımının düştüğü belirlenmiştir. Histon etkileşimi ile kromatin yeniden düzenleme, Cdc18 etkileşimi ile hücre döngüsü, kohezinin etkileşimi ile mitoz gibi süreçlerle ilişkili olması Swi6'nın da kanser veya apoptoz yolunda rol üstlenebilmesini olası hale getirmektedir.

Aspartamın kanserojenik etkilerinin Swi6 ile ilişkili olup olmadığı hipotezini test etmek için *S. pombe* parental ve *swi6Δ* ırkları; hücre canlılığı, hücre içi oksidasyon, glukoz tüketimi, nukleus DAPI boyama ve gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (GZ-PZR) gibi analizlere tabii tutuldu. Buna göre 1 mg/mL APM'nin her iki ırk için de canlılık ile glukoz tüketimine etki etmediği ve reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuna yol açmadığı belirlendi. Mikroskopik incelemeler sonucu ise APM'nin nuklear fragmentasyonu tetiklemezken hücre boyutunu arttırdığı saptandı. Ayrıca *swi6Δ* ırkı parentali ile kıyaslandığında üreme ile glukozu tüketme hızının yavaş olduğu, hücre içi ROT bulundurduğu ve hücre boyutunun uzun olduğu tespit edildi. Hücre boyutu farklılığı APM ile Swi6 arasındaki istatistiksel ilişki analizinde de anlamlı bulundu. GZ-PZR verilerine göre ise parentalde *swi6* anlatımının düştüğü ve APM etkisine bağlı olarak parental ile *swi6Δ* arasında *fbp1*, *hxx2*, *tup11*, *sod1* ve *ctt1* genleri için anlamlı bir fark olduğu saptandı.

Bulgular bir araya getirildiğinde, *S. pombe* parental ırkın stres yolağını aktifleştirerek APM etkisine adapte olduğu ve *swi6Δ*'nın anlamlı bir yanıt oluşturmadığı görüldü. Böylece APM ile Swi6 arasında bir ilişki olduğu ve APM'nin etkisini Swi6 üzerinden gerçekleştirebileceği önerildi. Fakat bu etkiler *swi6Δ* ırkının fenotipi ile karşılaştırıldığında zayıf kaldığından aspartamın kanser oluşumunda yeterli bir ajan olmadığı anlaşıldı.

Haziran 2019, 74 sayfa.

Anahtar kelimeler: Aspartam, Swi6, kanser, stres yanıtı, *Schizosaccharomyces pombe*

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN ASPARTAME AND SWI6 IN *Schizosaccharomyces pombe*

Beste BAYRAK

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Bedia PALABIYIK

Aspartame (APM) is a non-nutritive first generation artificial sweetener used widely in many products including pharmaceuticals since 1981. Although it is a substance that is approved by FDA, previous medical studies have shown that it induces lymphomas and leukaemias. Molecular studies have found that it alters the expression of tumor suppressor gene *TP53* and oncogenes *c-Myc* and *Ha-ras*; the formaldehyde it metabolizes to, forms DNA-DNA and DNA-protein crosslinks and sister chromatid exchanges. With these results, it has been confirmed that aspartame is a carcinogenic substance.

In this research, our aim is to reveal molecular mechanisms of such effects in a simpler model organism *Schizosaccharomyces pombe* which has similar cellular processes with mammals. For the evaluation, human HP1 (heterochromatin protein 1) family ortholog of *swi6* is selected. Swi6 is a telomere, centromere, and mating-type locus binding protein for the regulation of heterochromatin structure. On the other hand, it has been found that HP1 gene expression decreases in several cancer types. Since Swi6 interacts with cell cycle through Cdc18, mitosis through cohesin, and chromatin remodeling through histones, it is possible that Swi6 also plays a key role in cancer or apoptosis.

To verify if the carcinogenic effects of APM is related to Swi6; *S. pombe* parental and *swi6Δ* strains were analyzed with cell viability, intracellular oxidation, glucose consumption, nucleus DAPI staining and real time polimerase chain reaction (qRT-PCR) methods. According to the results, 1 mg/mL APM did not affect viability or glucose consumption and did not cause reactive oxygen species (ROS) production for both strains. But microscopic examinations showed that while APM did not induce nuclear fragmentation, cell size of the parental strain was increased. Additionally, when *swi6Δ* was compared with parental strain, slower rate of growth and glucose consumption, presence of intracellular ROS and cell size elongation were detected. Cell size difference was also found significant in the statistical interaction analysis of Swi6 and APM. Furthermore, qRT-PCR data showed a decrease in the expression of *swi6* in parental and expression differences between parental and *swi6Δ* in *fbp1*, *hxx2*, *tup11*, *sod1* and *ctt1* genes were found significant, depending on the effect of APM.

Taken together, it has been seen that *S. pombe* parental strain has adapted to APM effects by activating the stress response pathway and *swi6Δ* did not present a meaningful response. Thus, we proposed that there is a relationship between APM and Swi6, and that APM may be carrying out its effects through Swi6. Nevertheless, it is understood that aspartame is not an efficient agent for carcinogenesis, since its effects are weak when compared with *swi6Δ* phenotype.

June 2019, 74 pages.

Keywords: Aspartame, Swi6, cancer, stress response, *Schizosaccharomyces pombe*

1. GİRİŞ

Aspartam (L-fenilalanin N-L- α -aspartil-1-metil ester) dünya çapında yaygın olarak 1981'den beri kullanılan yapay bir tatlandırıcıdır. FDA tarafından genel amaçlı tatlandırıcı olarak sınıflandırılan aspartam 100'den fazla ülkede kullanım için onaylanmıştır ve 6000'den fazla yiyecek ve içecekte bulunur (Soffritti ve diğ., 2014). Bundan dolayı aspartam içeren ürünlerin aynı anda tüketimiyle doz aşımına uğranmaması için günlük alım değerine belirli kısıtlamalar getirilmiştir. Günlük önerilen maksimum tüketim değeri Avrupa'da 40 mg/kg, ABD'de 50 mg/kg'dir (Butchko ve diğ., 2002; Magnuson ve diğ., 2007).

Yapılan bazı medikal ve moleküler çalışmalar aspartam tüketimi maksimum dozun altında olsa dahi kanser fenotipinin gözlemlendiğini tespit ederken, bazı çalışmalar ise anlamlı bir etki saptayamamıştır (Shephard ve diğ., 1991; Gebara ve diğ., 2003; Gombos ve diğ., 2007; Schernhammer ve diğ., 2012). Bu tez çalışması aspartamın kanserojen olduğunu teyit eden çalışmaları referans alarak fakat etki saptamayan diğer çalışmalar da göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir.

Kromatin, transkripsiyon faktörleri ile sinyal yollarının, gen aktivitesini ve hücrel fenotipleri değiştirdiği temel araçtır (Margueron ve Reinberg, 2010; Allis ve Jenuwein, 2016). İçsel ve dışsal sinyallere bağlı olarak herhangi bir lokustaki düzenleyici veya baskılayıcı aktiviteyi güçlendirmek üzere belirli konformasyonlar oluşturmak için yeniden organize olur (Esteller, 2008; Feinberg ve diğ., 2016). Kromatin organizasyonunu bozan genetik, metabolik ve çevresel uyarıcılar; hücrenin durumunu ve yanıtını değiştirerek bireyleri bir dizi hastalığa yatkın hale getirir. Kanser tipik olarak genetik bir hastalık olarak kabul edilmekle birlikte, kromatinin epigenetik düzenlenmesindeki bozukluklar; tümörün oluşması, güçlenmesi ve ilerlemesinde önemli rol oynar (Suvà ve diğ., 2013).

Yapılan çalışmalar sonucu heterokromatin düzenlemesinde rol oynayan insan HP1 ailesi proteinlerinin çeşitli kanser tiplerinde anlatımının düştüğü saptanmıştır (Kirshmann ve diğ., 2000; Pomeroy ve diğ., 2002; Wasenius ve diğ., 2003; Lukasova ve diğ., 2005; Popova ve diğ., 2006; Ruginis ve diğ., 2006; Maloney ve diğ., 2007). Buna ek olarak, bu protein ailesinin anlatımını artırıcı birtakım müdahalelerde bulunulduğunda ise tümör oluşumunun gerilediği belirlenmiştir (Kirshmann ve diğ., 2000; Lukasova ve diğ., 2005; Ruginis ve diğ., 2006;

Maloney ve diğ., 2007). HP1'in *S. pombe*'deki ortologu Swi6; sentromer, telomer ve eşleşme tipi lokusunda H3K9me histon modifikasyonuna dayalı olarak heterokromatin düzenlenmesinden sorumlu bir proteindir (Cam ve diğ., 2005). Hücrede sentromer ve telomer gibi kromozom yaşamını koruyan iki önemli bölgenin stabilitesinden sorumlu olması, Swi6'nın *S. pombe*'de kanser araştırmaları için değerlendirilmesinin uygun olduğunu düşündürmektedir.

Bu sebeple model organizma olarak *S. pombe*'nin kullanıldığı bu tez çalışmasının amacı, hem aspartamin kanserojenik etkilerini araştırmaya hem de bu etkilerde Swi6'nın bir rolü olup olmadığının sorgulanmasına yöneliktir. Elde edilen bulguların daha iyi yorumlanabilmesi için enerji metabolizması ve stres yanıtı mekanizmalarına ait genler de kullanılmıştır.



2. GENEL KISIMLAR

2.1. ASPARTAM

2.1.1. Aspartamın Dünyü ve Bugünü

Sentetik tatlandırıcı aspartam, farmasötik firması G.D. Searle'da çalışan kimyager James Schlatter tarafından 1965'te keşfedilmiştir. Sükrozdan 200 kat daha tatlı olduğunun keşfiyle, tatlandırıcı olarak kullanımı için firma tarafından FDA onayına sunulmuştur. Yapılan toksikoloji çalışmaları sonucunda FDA ilk ADI değerini 20 mg/kg olarak belirlese de; Kanada Sağlık Koruma Şubesi (1979), JECFA (1980) ve SCF (1985) tarafından belirlenen ve Avrupa'da halen geçerli olan 40 mg/kg ADI değerinden sonra 50 mg/kg değerinin kullanımına 1983'te ABD de izin vermiştir (Butchko ve diğ., 2002; Magnuson ve diğ., 2007). Aspartam FDA'dan ilk onayını 1981'de alarak; sakız, kahvaltı gevrekleri, gıdaların kuru bazları (içecekler, hazır kahve ve çay, jelatin, puding, dolgu ve süsleme maddeleri, ve süt ürünleri) gibi bazı ürünlerde ve belli koşullar altında tatlandırıcı olarak kullanılmaya başlamıştır. Gazlı içecekler ve gazlı içeceklerin şurup bazlarında da kullanımı için gelen onay ise 1983'te olmuştur. 1996 onayından sonra da “genel amaçlı tatlandırıcı” olarak piyasada kullanımına izin verilmiştir¹. Aspartamın Avrupa'da kullanımı ise 1994'te Avrupa Parlamentosu ve Konseyi tarafından onaylanmıştır (Soffritti ve diğ., 2014).

1970'e kadar tatlandırıcıların temel kullanımı; ilaç tadının iyileştirilmesi ve diyabetik hastalar için üretilen ürünlerde şeker yerine kullanılması şeklindedir (Talbot ve diğ., 1978). Fakat o zamandan bugüne muazzam bir endüstri gelişmiştir ve tatlandırıcıların diyet, düşük kalorili ve “light” gibi etiketlerle piyasaya sürülerek geniş kitlelere pazarlanması söz konusu olmuştur. Aspartam; bugünkü global üretimi yılda 15500 tonu bulmakla birlikte, 500'ü ilaç olmak üzere >6000 üründe ve >90 ülkede kullanımıyla bir market lideri haline gelmiştir (Soffritti ve diğ., 2014) ve dünya çapında 200 milyondan fazla insan tarafından tüketimi gerçekleştirilmektedir².

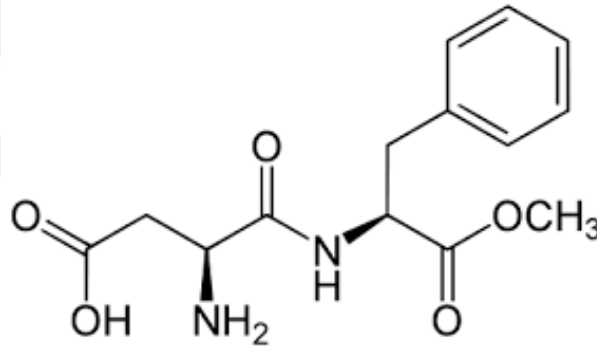
¹<https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/additional-information-about-high-intensity-sweeteners-permitted-use-food-united-states> [Ziyaret Tarihi: 12.08.2018]

² <https://aspartame.org/> [Ziyaret Tarihi: 12.08.2018]

2.1.2. Aspartamın Kimyasal Yapısı ve Metabolizması

Aspartam, L-aspartik asit ve L-fenilalanininden oluşan bir dipeptidin metil esteridir (Şekil 2.1). Maddenin α ve β olmak üzere iki farklı kimyasal formu vardır, fakat sadece α formu tatlıdır (Kirkland ve Gatehouse, 2015). Kemirgenlerin ve insanların gastrointestinal yolunda 4 farklı yapıya indirgenir: aspartik asit, fenilalanin, metanol ve diketopiperazin (Ranney ve diğ., 1976).

Diketopiperazin, aspartam yapısındaki metil grubunun ayrılması sonucu dipeptidin siklik bir yapı oluşturmak üzere N- ve C-terminalinin birleşmesiyle meydana gelmektedir (Borthwick, 2012). Bu madde aynı zamanda 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda parçalanma ürünü olarak da oluşabilmektedir. (Kirkland ve Gatehouse, 2015). Reno ve Bowles (1972) bu ürünün en az 500 mg/mL'de dahi kromozom kırıklarına yol açtığını belirlemiştir.



Şekil 2.1: Aspartamın kimyasal yapısı (Budavari, 1989).

Metanol, aspartamın yapısında bulunan metil ester bağının ince bağırsağın üst kısmında pankreatik kimotripsin ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkmaktadır ve bağırsak tarafından hemen emilmektedir (Monte, 1984). Dokularda alkol dehidrogenaz tarafından oksidasyonu gerçekleşen metanol formaldehite dönüşmektedir. Bu dönüşüm sonucunda, yarı ömrü 90 saniye olan aşırı reaktif bir ara ürün, format, açığa çıkmış olur (Liesivuori ve Savolainen, 1991). Bu reaktif ara ürünün DNA üzerindeki etkilerini araştırmak üzere aspartamdaki formaldehit oluşturan karbon atomu ^{14}C ile işaretlenmiş ve aspartam kökenli formaldehitin DNA-protein kovalent bağlarını oluşturmada rol oynadığı tespit edilmiştir (Gombos ve diğ., 2007). Metanolü her ne kadar meyve gibi doğal kaynaklardan da tüketiyor olsak, maddenin kimyasal yapısı

gereği bu yapının monomerlerini vücudun doğal kaynaklarda olduğu gibi algılaması olası görünmemektedir. Bunu doğrular nitelikte, bitkisel ürünlerden alınan metanol pektine bağlı olduğundan sindirim sisteminden herhangi bir zarara yol açmadan geçerken (Siragusa ve diğ., 1988) aspartam yapısında bulunan metil ester bağı zayıf olduğundan hemen parçalanıp serbest metanol oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum her ne kadar madde önerilen doz sınırları içerisinde alınsa da, biyokimyasal yapısının göz ardı edilemeyecek etkilerini ortaya koymaktadır.

Fenilalanin ve aspartik asit dipeptidi ise diğer peptidlerin hidrolizi ile aynı biçimde gerçekleştirilir. Oluşan serbest aminositlerden aspartik asidin herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmezken, fenilketonüri hastalığına sahip bireylerde fenilalanin hidroksilaz enzimi bulunmadığından kanda ve beyinde fenilalanin birikimi sonucu toksik etki yaratabilme olanağına rağmen aspartamın bir sorun yaratmadığı tespit edilmiştir (Trefz ve diğ., 1994).

2.1.3. Aspartamın Genotoksik ve Kanserojenik Bulguları

Aspartamın genotoksik ve kanserojenik etkileri birçok model organizmada incelenmiştir. Bakterilerde genotoksik etkilerin incelenmesi üzerine: Molinary (1978) *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA153, TA1538 ırklarında 5000 µg/petri'ye kadar aspartam konsantrasyonu sonrası uyguladığı Ames testinde herhangi toksik bir bulguya ulaşamamıştır. Fakat *S. typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA104 ırkları nitroze edilmiş aspartamla muamele edildiğinde TA102 dışında diğer ırkların mutajenik aktivitelerinin arttığı tespit edilmiştir (Shephard ve diğ., 1991; Shephard ve diğ., 1993). Ancak aspartamın deneyde gerçekleştirilen nitrozasyon oranı insanda *in vivo* gerçekleşecek kadar olmadığından, aspartamın kayda değer bir zararı olmadığını belirtmişlerdir. *Escherichia coli* K12 *uvrB* ırkında 0.5-2 mM fenilalanin konsantrasyonları için gerçekleştirilen mutajenite testinde baz değişimi mutasyonları saptanmıştır (Sargentini ve Smith, 1986) ancak daha önce Shephard ve diğ. aynı sonucu *S. typhimurium*'da negatif olarak belirttikleri için bakterilerde aspartamın etkileri tartışılabilir hal almıştır. Mayalardaki genotoksik etkiler için *Aspergillus nidulans* diploid UT448/UT196 ırklarında mitotik rekombinasyon oranları incelenmiştir. Aspartamın 100-12000 µg/ml serilerinde 6 gün inkübasyonu sonucu 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında mitotik segregantların ve mitotik rekombinasyonun arttığını gözlemlemişlerdir (Gebara ve diğ., 2003).

Hayvan modellerinde genotoksik etkiler: Albino sıçanlarda ve dölllerinde kromozomal kırıklar ve DNA fragmentasyonu tespit edilmiştir (Abd Elfatah ve diğ., 2012). Swiss albino farelerinde kromozomal kırıklar, mikronukleus oluşumu ve sperm morfolojisinde değişim gözlenmiştir (Kamath ve diğ., 2010). Swiss albino farelerinde Comet testi pozitif bulunmuştur (Bandyopadhyay ve diğ., 2008). Aspartam metabolitlerinin buzağı timüs DNA'sına bağlandığı tespit edilmiştir (Kashanian ve diğ., 2013). Kanserojenik çalışmalar ise şöyledir: Sprague-Dawley sıçanlarında; iki cinsiyette de lenfoma ve lösemi, sadece dişilerde renal pelvis ve üreterde geçici hücre karsinomu, sadece erkeklerde periferik sinirlerin malignant schwannoması tespit edilmiştir (Soffritti ve diğ., 2006). CBA/CA farelerinde 40-2500 mg/kg APM dozları sonucu *TP53*, *c-Myc* ve *Ha-ras* genlerinin ekspresyonlarında değişim gözlenmiştir (Gombos ve diğ., 2007).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda: İnsan lenfositlerinde doza bağlı kromozom kırıkları, mikronuklei, replikasyon indeksi ve mitotik indeks oluşumu gözlenmiştir (Rencüzoğulları ve diğ., 2004). Epidemiyolojik çalışmalarda: beyin tümörü (Olney ve diğ., 1996); idrar yolu tümörü (Andreatta ve diğ., 2008); erkeklerde Non-Hodgkin lenfoma, çoklu myeloma ve lösemi oluşturduğu tespit edilmiştir (Schernhammer ve diğ., 2012). HeLa hücre hattında yapılan bir çalışma; aspartamın *TP53*, *BAX* ve *BCL2* gibi apoptotik genlerin mRNA ekspresyonunda artışa sebep olduğu bulunmuştur (Pandurangan ve diğ., 2015).

2.2. SWI6

2.2.1. Gen ve Protein Yapısı

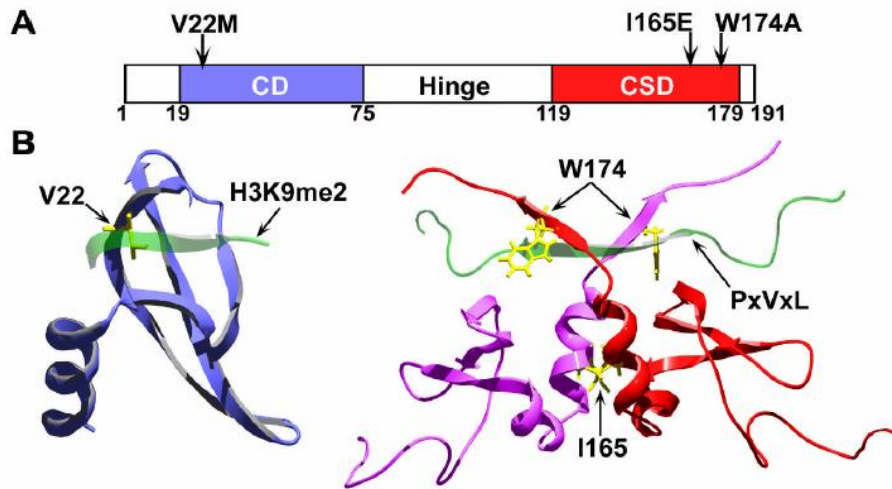
Fisyon mayasından memelilere kadar korunmuş olan ve insan HP1 ortologu olan *swi6* geni; *S. pombe*'nin 5.58 Mb'lık 1. kromozomunun 1.704.073-1.702.406 baz çiftleri arasında yer alır, 1.668 baz çiftinden oluşur ve %GC değeri 36,03'tür³. Sentromer ve telomer bölgelerine olan uzaklığından dolayı kolay çalışılabilen bir gendir. Protein olarak toplamda 328 aminoasitten oluşur ve 37.29 kDa'luk bir kütleye sahiptir. Tüm HP1 proteinlerinde olduğu gibi CD ("chromo domain") ile CSD ("chromo-shadow domain") alt birimlerinden ve bu iki alt birimi birbirine

³ <https://www.pombase.org/gene/SPAC664.01c> [Ziyaret Tarihi: 15.08.2018]

bağlayan “hinge” bölgesinden oluşur (Eissenberg ve Elgin, 2000; Wang ve diğ., 2000) (Şekil 2.2).

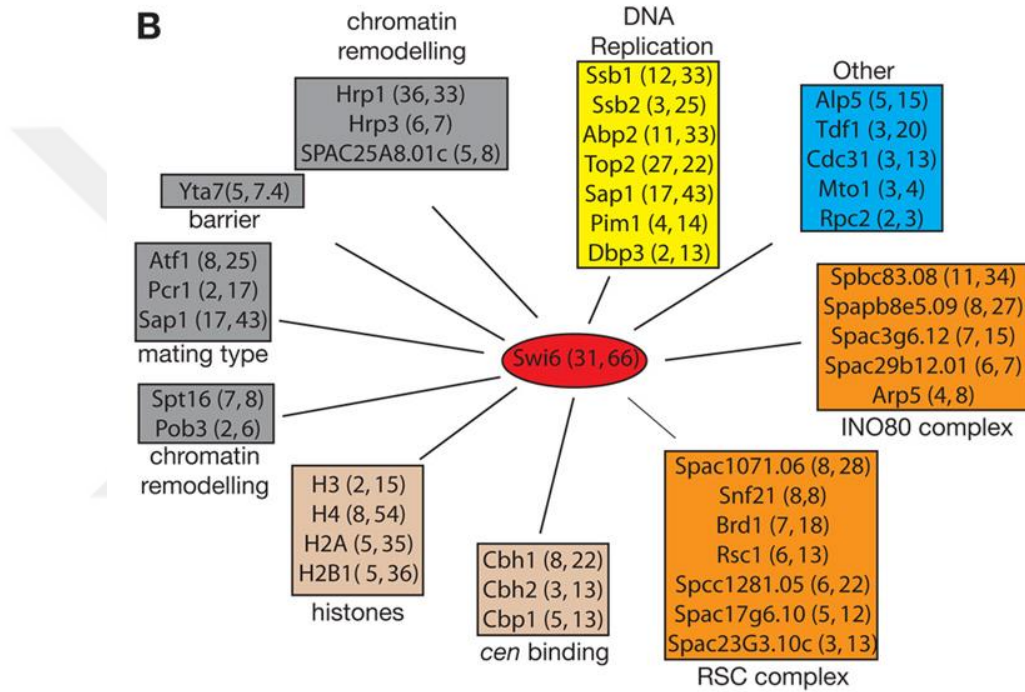
2.2.2. İşlevi

Swi6, telomer, sentromer ve eşleşme lokusunda heterokromatin oluşumunu ve düzenlenmesini sağlayan bir proteindir (Cam ve diğ., 2005). Transkripsiyonel sessizleşmeyi sağlayan bu proteinin kromatine bağlanmasını H3K9 metilasyonu sağlar ve CD alt birimi tarafından gerçekleştirilir (Wang ve diğ., 2000; Dialynas ve diğ., 2008). Histon proteininin bu metilasyon tipi beklenildiği gibi telomer, sentromer ve eşleşme lokusunda yaygındır (Nakayama ve diğ., 2001). Hücre döngüsünün S evresinde H3S10 fosforilasyonu sebebiyle perisentromerik bölgeden ayrılır ve fazın sonuna doğru tekrar bağlanır. Böylece perisentromerik bölgeden transkripsiyona kapı aralanmış olur (Chen ve diğ., 2008; Kloc ve diğ., 2008). İlginç bir şekilde, perisentromerik dizilerden gerçekleştirilen bu transkripsiyon sonucu oluşan ncRNA’lar replikasyon sonrası heterokromatin proteinlerini bölgeye geri taşıyıp sessizleşmenin korunmasını sağlarlar. (Holoch ve Moazed, 2015) Diğer HP1 ailesi proteinleri gibi hücre içinde üstlendiği bu görevden ötürü Swi6 transkripsiyon kontrolünde kilit bir noktadadır (Cheutin ve diğ., 2014).



Şekil 2.2: Swi6 proteininin “ribbon” diyagramı (Wang ve diğ., 2000).

Kromatine bağlanmasının yanı sıra birçok proteinle de ilişkilidir (Motamedi ve diğ., 2008) (Şekil 2.3) ve hem bu etkileşimi hem de dimerizasyonu için CSD alt birimini kullanır (Wang ve diğ., 2000). Hücre döngüsünde sentromer replikasyonu için *cdc18* ile (Li ve diğ., 2011) ve mitozda kohezin ile (Nonaka ve diğ., 2001) etkileşmektedir. Bu sebeple *Swi6* yokluğunda; yanlış kromozom dağılımı ve anafaz köprüsü oluşumu gelişmektedir (Ekwall ve diğ., 1995; Pidoux ve diğ., 2000).



Şekil 2.3: Swi6'nın diğer proteinlerle etkileşimi (Motamedi ve diğ., 2008).

2.3. KANSER EPİGENETİĞİ

Çok hücreli canlılarda organizmanın sahip olduğu tüm hücreler bireyin iyiliği için birbirleri ile uyumlu çalışmaya programlıdır. Hücre dışı sinyaller yardımıyla gereken zamanlarda bölünen, farklılaşan veya ölen bu hücreler çevresel streslere maruz kalarak ya da spontan bir biçimde mutasyona uğrayabilirler. Her koşulda olmasa da olumsuz etki gösterebilen bu mutasyonlar, olduğu hücreye selektif avantaj kazandırarak topluluktaki uyumu bozma potansiyeli taşırlar. Böylelikle kanser, bir hücrenin bulunduğu organizmada işbirliği yapmak

yerine kendi başına çoğalarak bir mutant klonu oluşturmaya genetik bir hastalıktır (Albert ve diğ., 1994).

Tipik bir kanser hücresinin genomu zaman içerisinde biriken birçok mutasyon ve epigenetik değişim içerir. Fakat moleküler düzeyde yapılan yoğun çalışmalar sonucu kanser oluşumunda kritik öneme sahip olan iki grup gen keşfedilmiştir. Hücre döngüsünü denetleyen ve DNA tamirini sağlayan tümör baskılayıcı genler (Levine, 1993) ile transkripsiyon faktörü, büyüme faktörü ve hücre içi sinyal iletimi gibi görevleri üstlenen proto-onkogenler (Garrett, 1986). Kanser oluşumu, tümör baskılayıcı genlerde meydana gelen işlev kaybı mutasyonları ve proto-onkogenlerde meydana gelen işlev kazanımı mutasyonları sonucu tetiklenir.

Epigenetik, gen fonksiyonlarındaki DNA dizi varyasyonlarına dayanmayan kalıtsal değişimlerin incelenmesidir (Goldberg ve diğ., 2007). Genom projelerinin tamamlanmasının ardından elde edilen gen organizasyonu ile bilgiler, bu genlerin anlatımlarının nasıl düzenlendiği ile ilgili yeni soruları beraberinde getirmiş ve epigenetik kavramını canlandırmıştır. Bu düzenlenmede kalıtsal bilgi taşıyan DNA'nın histon proteinleri ile birlikte oluşturduğu 3 boyutlu kromatin yapısı temel bir rol oynamaktadır. Yüksek derecede yoğunlaşmış olan kromatin, heterokromatin olarak adlandırılır ve çoğunlukla aktif olmayan genler içerir. Buna karşılık, ökromatin daha gevşek bir yapıya sahiptir ve aktif genleri içerir. Kromatin yapısı; DNA metilasyonu, nükleozom konumlaması ve histon modifikasyonu ile dinamik olarak düzenlenir (Benneth ve Licht, 2017).

Kornberg ve Thomas (1974), DNA'nın bir histon oktamere çekirdeği etrafına sarılmış yaklaşık 147 bp DNA ve bir başka 20 bp etrafına sarılmış bir "linker" histondan oluşan nükleozom içine paketlenildiğini keşfetmiştir. Daha sonraki çalışmalar, histon proteinlerinin C- ve N-terminal kuyruklarının nükleozom çekirdek yapısının dışına uzandığını ve post-translasyonel modifikasyona erişilebilir olduğunu ortaya koymuştur (Richmond ve diğ., 1984; Luger ve diğ., 1997). Uzun yıllar boyunca histonların gen anlatımını etkileyebileceği öne sürülmüştür, ancak histon modifikasyonlarının asıl önemi, Allis ve arkadaşlarının histon asetilasyonunun gen anlatım mekanizmalarının düzenlenmesi için önemli olduğunu gösterdiğinde anlaşılmıştır (Brownell ve diğ., 1996). Araştırmalar asetilasyon, metilasyon, ubiquitinasyon veya fosforilasyon gibi birçok post-translasyonel modifikasyon çeşidini ortaya koymuştur. Histon modifikasyonları, iki ana mekanizma ile kromatin yeniden düzenlenmesine yol açmaktadır. İlk olarak asetilasyon veya fosforilasyon gibi modifikasyonlar, kromatin erişilebilirliğini arttırmak

için lizinlerin pozitif yükünü nötralize etmekte ve DNA ile histonlar arasındaki ayrışmayı sağlamaktadır (Steger ve Workman, 1996; Luger ve Richmond, 1998). İkinci olarak histon modifikasyonları, histon modifiye edici diğer enzimlerin veya kromatin mimarisi ile gen anlatımını düzenleyen spesifik kromatin faktörlerinin bağlanma bölgeleri olarak görev yapmaktadır.

DNA metilasyonu genellikle bir guaninden (CpG) önce gelen sitozin bazında meydana gelmektedir. CpG dinükleotitlerinin çoğu, gen promotörlerinin yaklaşık %70'inde transkripsiyon başlangıç bölgelerinin yakınında bulunan ve "CpG adaları" olarak adlandırılan CpG bakımından zengin DNA bölgelerinde yoğunlaşmıştır (Saxanov ve diğ., 2006). CpG adalarının hipermetilasyonu ilgili genin susturulmasına, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını önleyerek ve baskılayıcı histon modifiye eden enzimlerle etkileşime giren metil-CpG bağlanan proteinlerin toplanmasını sağlayarak yol açmaktadır (Herman ve Baylin, 2003; Rodriguez ve diğ., 2010). Bu nedenle, DNA metilasyonu kromatin mimarisini ve gen anlatımını düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır.

Yeni nesil sekanslama sayesinde, epigenetik düzenleme yollarını etkileyen gen mutasyonları, amplifikasyonları, delesyonları ve yeniden düzenlenmelerinin kanserli hücrelerde sıklıkla bulunduğu tespit edilmiştir (Lawrence ve diğ., 2014). DNA metilasyonunda veya histon modifikasyon örüntülerinde değişime yol açan epigenetik düzenleyicilerdeki mutasyonlar, kromatin yapısının ve normal gen anlatımının bozulmasına neden olabilmektedir. Bir promotörde meydana gelen DNA hipermetilasyonu ve/veya baskılayıcı histon modifikasyonları, gen anlatımını susturarak tümör baskılayıcı genlerdeki fonksiyon kaybı mutasyonlarının fenotipini kopyalayabilir. Tersine, DNA metilasyonu veya aktive edici modifikasyonların kaybı gen ekspresyonunu, onkogenik kromozomal translokasyonlar veya gen amplifikasyonu sonrasında gözlendiği gibi önemli ölçüde arttırabilir.

Genetik değişimlerin aksine, epigenetik değişiklikler geri dönüşümlüdür. Bu doğal plastisite nedeniyle anormal epigenetik mekanizmaların malign transformasyonda nasıl geliştiğini deşifre etmek, kanser tedavisinde bu mekanizmaların nasıl hedeflenebileceği konusunda yeni bilgiler verebilir.

2.3.1. HP1 Ailesi Proteinlerinin Kanslerle İlişkisi

Gen ekspresyonlarındaki değişimler kanser oluşumu ve ilerlemesine eşlik ederler. Bu değişimlerin kaynağı hem genetik hem de epigenetik olabilir. Çoğu transkripsiyon faktörü, gen-spesifik değildir ve bir faktördeki hasar birçok hedef genin ekspresyonunu değiştirebilir. Bir kromatin katlanma proteini veya histon modifiye eden enzimde meydana gelen hasarlar ise birçok genomik bölgenin kromatin durumunu değiştirerek yüzlerce genin ekspresyon seviyesini aynı anda değiştirebilir. HP1 ailesi proteinlerinin genomdaki yaygın dağılımı ve transkripsiyondaki rolü göz önünde bulundurulursa, bu proteinlerin kanser ile olan ilişkisi şaşırtıcı değildir.

Şu an için hiçbir insan hastalığı HP1 proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlarla ilişkili değildir. Ancak ekspresyonlarındaki azalma birçok kanser tipi için bildirilmiştir (Kirshmann ve diğ., 2000; Pomeroy ve diğ., 2002; Wasenius ve diğ., 2003; Lukasova ve diğ., 2005; Popova ve diğ., 2006; Ruginis ve diğ., 2006; Maloney ve diğ., 2007) (Tablo 2.1). Bu bulguyla tutarlı olarak, artan HP1 ekspresyonunun da metastaz baskılayıcı (Kirshmann ve diğ., 2000; Lukasova ve diğ., 2005; Ruginis ve diğ., 2006) anti-kanser olduğu (Maloney ve diğ., 2007) tespit edilmiştir.

Tablo 2.1: HP1 proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim sonucu oluşturdukları kanser tipleri.

Kanser tipi	HP1 protein	Ekspresyon değişimi	Doku/Hücre Tipi/Hücre Soyu	Referans
Beyin	Hsα	Azalma	Embriyonik beyin tümörlerinin çoklu tipleri	Pomeroy, 2002
Meme	Hsα	Azalma	MDA-MB-231 ve MCF7 meme kanseri hücre soyları	Kirshmann, 2000
Kolon	Hsα	Azalma	HCT116 kolon kanseri soyu Caco-2 ve Ht-29 kolon kanseri soyları	Ruginis, 2006
Lösemi	Hsα, Hsβ, Hsγ	Azalma	Periferik kan lökositleri	Lukasova, 2005 Popova, 2006
Ovaryum	Hsγ	Azalma	A2780 ovaryum kanseri hücre soyu	Maloney, 2007
Papiller tiroid	Hsα	Azalma	Papiller tiroid karsinom dokusu	Wasenius, 2003

2.4. *Schizosaccharomyces pombe*

1893'te Paul Lindner tarafından darı birasından izole edilen *Schizosaccharomyces pombe*, alkolik fermentasyondan sorumlu bir mayadır. Doğu Afrika'dan ithal gelen birada keşfedildiği için Swahili dilinde bira anlamına gelen “pombe” adı verilmiştir (Lindner, 1893). *S. pombe*, Ascomycota şubesinden tek hücreli bir mantar türüdür ve içeriği 74–82% glukan ile 9–14% galaktomannandan oluşan ve çevresel etkenlere karşı mekanik güç sağlayan bir hücre duvarı ile çevrilidir (Bush ve diğ., 1974). Apikal uzama sonucu ortadan ikiye bölünerek çoğaldığından fisyon mayası da denilmektedir. *S. pombe*'nin hücre döngüsü, gelişmiş ökaryotlarla aynı şekilde interfaz (G1, S ve G2) ve mitoz evrelerinden oluşmaktadır (Russell ve Nurse, 1986). Karyokinezin ardından başlayan G1 evresi oldukça kısa sürmektedir ve döngünün yaklaşık %10'luk bölümünü kapsar. Sitokinezin ardından DNA sentezinin gerçekleştiği S evresi gelir. Bu evreyi takip eden G2, döngünün en uzun evresidir (%70) (Nurse ve diğ., 1976). Döngünün son evresi olan mitoz, çok hücreli organizmaların mekanizmalarına benzer şekilde gerçekleşmektedir. Hücre boyutu, hücre döngüsünün hangi aşamada olduğunu gösterir (Wixon, 2002). Silindirik çubuk şekline sahip olan bu mayanın eni 3-4 µm ve boyu 7-14 µm uzunluğundadır (Forsburg, 2005).

Hem haploid hem de diploid yaşam döngüsüne sahip olan *S. pombe* hücreleri ortadan bölünme ile vejetatif üremenin yanı sıra eşeyli olarak da çoğalmaktadırlar. Bu durumdan eşleşme lokusu olarak adlandırılan *mat1*, *mat2* ve *mat3* genleri sorumludur (Kelly ve diğ., 1988). Hücrenin eşey tipini belirleyen *mat1* lokusuna ait h^+ (975) ya da P, h^- (972) ya da M, ve h^{90} (968) olmak üzere 3 adet allel bulunmaktadır. *Mat2* ve *mat3* donör lokusları da sırasıyla *mat P* ve *mat M* genlerini kodlar. P ve M allelleri eşleşme reaksiyonu için belirleyicidir ve haploid hücreler tek bir allel bulundurduğunda heterotallik (h^+ veya h^-), iki alleli beraber bulundurduğunda homotallik suş (h^{90}) adını almaktadır (Leupold, 1950). Bu durumda homotallik suş kültüründe bulunan hücreler, 4 askospor içeren bir zigotik askus oluşturmak üzere eşleşebilmektedirler. Normal koşullarda haploid halde bulunan hücreler eşleşme sırasında diploid hale geçerler. Organizma iki formda da stabildir (Gutz ve Doe, 1973).

S. pombe, Genom projesi kapsamında genom dizilemesi gerçekleştirilen 6. organizmadır ve 2002'de tamamlanmıştır (Wood ve diğ., 2002). Toplam genom boyutu 13.8 Mb olmakla beraber, genom organizasyonu I (5.7 Mb), II (4.6 Mb), III (3.5 Mb) olacak şekilde 3 kromozoma dağılmıştır ve mitokondriyal genomu 19.43 kb'dir (Robinow ve diğ., 1997). Organizmanın

genomu 5118 protein kodlayan gen ve 28 psödojen içermektedir (Lock ve diğ., 2018). Genlerin %43'ü intron içermektedir ve ortalama intron uzunluğu 81 nükleotittir. In silico analizler sonucu, insanda kanserle ilişkili olduğu öne sürülmüş bazı genler dahil, *S. pombe* ile bitki ve hayvan türleri arasında yüksek derecede korunmuş genlerin bulunduğu tespit edilmiştir (McDowall ve diğ., 2015).

Fisyon mayasının genetik çalışmalarda kullanılmaya başlaması 1950'lere dayanmaktadır. Urs Leupold öncülüğünde başlanan bu kullanım, Paul Nurse ile hücre döngüsü çalışmalarını beraberinde getirmiştir. Gen manipülasyonunda homolog rekombinasyon veriminin yüksek olması nedeniyle de heterolog protein üretimi çalışmalarında kullanımı yaygınlaşmıştır (İdiris ve diğ., 2006). Üretiminin basit ve ucuz olmasının yanı sıra *Escherichia coli* ve *Saccharomyces cerevisiae*'ya nazaran gelişmiş ökaryotlarla mRNA işlenmesi, post-translasyonel modifikasyonlar, hücre döngüsü düzenlenmesi, besin algılama yolları gibi benzer moleküler, genetik ve biyokimyasal özellikler taşıması fisyon mayasının mikro-memeli olarak tanımlanmasına yol açmıştır (Barnett, 2007). Bununla beraber PomBase verilerine göre, fisyon mayasının protein kodlayan genlerinin %69'unun insanda ortologu bulunmaktadır ve bunların 912'sinin insan hastalıklarıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Lock ve diğ., 2018). Böylece günümüzde *S. pombe*, insan hastalıklarının aydınlatılmasına yönelik model organizma olarak kullanılmasında yerini sağlamlaştırmıştır.

2.5. *S. pombe*'DE ÇEŞİTLİ HÜCRESEL SÜREÇLER

2.5.1. Enerji Metabolizması

Hücresel enerji metabolizması hücre çoğalması, stres direnci ve yaşlanma gibi biyolojik süreçler için temeldir. Besin algılaması, büyüme ortamındaki mevcut kaynakları kullanmak için metabolizmalarını düzenleyen prokaryotik ve ökaryotik mikroorganizmaların hayatta kalabilmesi için kritiktir. Ayrıca, hücresel metabolik durumun epigenetik mekanizmalar yoluyla gen anlatımını veya protein fonksiyonunu kontrol edebilmesi muhtemeldir: ATP, asetil-CoA veya NAD/NADH gibi anahtar metabolitlerin seviyeleri, enerji metabolizması için önemli değerlerdir. Bu tür metabolitler, genom düzenlenmesini ve protein aktivitelerini etkileyen protein fosforilasyon, asetilasyon veya metilasyon seviyelerini değiştirebilir (Wallace ve Fan, 2010; Huang ve diğ., 2014; Chandel, 2015).

Mayalar, sıkı bir şekilde kontrol edilen korunmuş enerji metabolizma programlarını araştırmak için basit fakat verimli model organizmalardır. Fısyon mayası, solunum veya fermentasyon süreçleriyle çoğalabilir, ancak bu süreçlerde kesin anaerobik koşullara ihtiyaç duymaz (Heslot ve diğ., 1970). Solunum ve fermentasyon süreçleri arasındaki dengenin düzenlenmesi, büyük ölçüde, gen anlatımını kontrol eden besin algılayan sinyal yollarının aracılığıyla (Molenaar ve diğ., 2009; Takeda ve diğ., 2015) besin ulaşılabilirliğine bağlıdır (Roux ve diğ., 2009; Wallace ve Fan, 2010). Glukozun varlığında fısyon mayası oksijen olsa bile esas olarak fermentasyon yoluyla çoğalır (Crabtree etkisi), ancak karbon kaynağı olarak gliserol (Heslot ve diğ., 1970; Klein ve diğ., 2013) veya galaktoz (Chiron ve diğ., 2007) kullandığında solunum yoluyla çoğalmayı tercih eder. Fısyon mayasında glukozun solunumu baskılamasına rağmen, bu etki çok güçlü değildir ve solunum bazal seviyede devam eder (Heslot ve diğ., 1970). Düşük glukoz konsantrasyonları ise solunumun artmasına neden olur (Zuin ve diğ., 2008).

S. pombe'deki glukoz algılaması, memeli sistemleriyle pek çok özelliği paylaşan cAMP sinyal yolağıyla meydana gelir. Bu yolak, G-protein aracılı transmembran reseptör protein Git3 ile Gpa2G α , Git5G β ve Git11G γ 'den oluşan bir heterotrimerik G-proteinini içerir (Isshiki ve diğ., 1992; Landry ve diğ., 2000; Landry ve Hoffman, 2001). Glukoz sinyali bu modül üzerinden Gpa2'nin aktivasyonuna yol açar ve bu protein de adenilat siklazı (Cyr1) aktive eder. Bu enzim dış uyarılara yanıt olarak ATP'nin cAMP'ye dönüşümünü katalizler ve bu ikincil mesajcı molekül ökaryotik hücrelerde birçok sinyal yolağında rol alır (Gilman, 1984; Levitzki 1988). Bu sinyal yollarında cAMP'nin rolü, bir çift katalitik alt birim (Pka1) ile bir çift düzenleyici alt birimden (Cgs1) oluşan PKA'yı aktive etmektir. cAMP, PKA'nın düzenleyici alt birimlerini bağlar ve bunların katalitik alt birimlerinden ayrılmasını ve böylece aktive olup hedef proteinleri fosforilleyebilmelerini sağlar (Beebe ve Corbin, 1986; Edelman ve diğ., 1987). Bilinen bazı hedef proteinler fosforilasyon sebebiyle inaktif hale getirilen enzimler ve transkripsiyonel aktivatörlerdir (Beebe ve Corbin, 1986; Roesler ve diğ., 1988).

cAMP bağımlı PKA yolağının ortamdaki glukoz varlığını belirlemesinin ardından hücre içine glukoz alımı ve glikoliz için gerekli olan genlerin anlatımı, sırasıyla, heksoz taşıyıcıları ve heksokinazlar (Hxk2), indüklenir (Rolland ve diğ., 2001). Buna karşılık, solunum (Cox4), glukoneogenez (Fbp1) ve alternatif karbon kaynaklarının kullanımı (sükroz, fruktoz) gibi süreçlerde rol oynayan proteinlerin gen anlatımı baskılanır (Hoffman ve Winston 1991). Fbp1'in anlatımı hem aktif Pka1'in transkripsiyon faktörü olan Rst2 aktivitesini fosforile edip

negatif olarak düzenlemesiyle (Higuchi ve diğ., 2002), hem de genel baskılayıcı Tup11 sayesinde baskılanır (Asada, 2017).

Glikolizde üretilen piruvat, fermentasyon sırasında organik asitlere, gazlara veya etanole dönüştürülür. Ortamdaki glukoz miktarı az olduğunda alternatif olarak piruvat, Krebs veya sitrik asit döngüsü olarak da adlandırılan mitokondriyal trikarboksilik asit (TCA) döngüsü aracılığıyla solunum ile metabolize edilebilir (Wallace ve Fan, 2010; Lunt ve van der Heiden, 2011). Bu süreç mitokondrinin iç zarında bulunan elektron transport sistemi (ETS) kompleksleri tarafından gerçekleştirilir. Komplekslerde sıralı oksidoredüksiyon işlemleriyle taşıyıcı moleküllerden (NADH ve diğer TCA ürünleri) alınan elektronlar, kompleks IV (Cox4) tarafından son alıcı oksijen molekülüne aktarılır ve bu aktarım süresince membranlar arası bölgeye proton pompalanıp elektrokimyasal gradyan oluşturulur. Oluşan gradyan farkı yardımıyla protonlar iç zarda bulunan ATP sentaz kompleksinden geçerken ATP oluşturulur. ATP üretimiyle ilgili olarak, solunum fermentasyondan çok daha verimlidir ve her glukoz molekülü başına sadece 2 ATP molekülüne karşı 36'ya kadar net kazanç sağlar.

2.5.2. Stres Yanıtı

Tüm hücreler, çevresindeki değişiklikleri algılar ve bu değişikliklere tepki verir. Özellikle tek hücreli organizmalar; besin, pH, sıcaklık ve dış ozmolarite dalgalanmalarının yanı sıra UV radyasyonu ve bir dizi potansiyel toksik çevre bileşiği ile de mücadele etmelidir. Bu çevresel streslere uygun yanıtlar, hücrenin hayatta kalması ve çoğalması için indüklenmelidir (Chen ve diğ., 2003). Mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarının, ökaryotik hücrelerin çevresel değişikliklere ve stres koşullarına karşı cevabında anahtar bir rol üstlendiğine dair kanıtlar artmıştır (Kim ve Choi, 2010). Açlık, ozmotik stres, oksidatif stres ve ısı stresi gibi çevresel stres sinyalleri, stres ile aktive olan mitojenle aktive olan bir protein kinaz (MAPK) yolağını aktive eder. MAPK kaskadları; MAPK, MAPK kinaz (MAPKK) ve MAPKK kinaz (MAPKKK) olarak üç protein kinazdan oluşan yüksek oranda korunmuş sinyal iletim yollarıdır. Bu *S. pombe* yolağı; Win1 ve Wis4/Wik1/Wak1 MAPKKK'lerden, Wis1 MAPKK ve Spc1/Sty1 MAPK'den oluşur (Millar ve diğ., 1995; Shiozaki ve Russell, 1995; Degols ve diğ., 1996; Shiozaki ve Russell, 1996; Stettler ve diğ., 1996; Samejima ve diğ., 1997; Shiozaki ve diğ., 1997; Samejima ve diğ., 1998).

Özellikle, fisyon mayasında bulunan bu üç MAPK kaskadından biri olan stresle aktive olan protein kinaz (SAPK) yolağı, strese karşı genel hücrel tepkinin oluşmasında kritik bir işlev görmektedir. Bu yolağın merkezi elemanı, birçok stres koşuluna yanıt olarak aktive edilen MAPK Sty1'dir (Pérez ve Cansado, 2010). SAPK yolağının ana hedefi, stres sırasında Sty1 ile fosforile edilen transkripsiyon faktörleri Atf1 ve Pap1'dir. (Wilkinson ve diğ., 1996). Aktifleştirilmiş Atf1, ürünleri adaptif hücre yanıtına katılan Çevresel Stres Temel Yanıtının (CESR) bir parçasını oluşturan bir grup genin anlatımını teşvik eder (Chen ve diğ., 2003). Ayrıca, glukoneogenez için önemli olan fruktoz-1,6-bifosfataz (Fbp1) enziminin gen anlatımı da Atf1 tarafından kuvvetli bir şekilde indüklenir.

Fisyon mayasında stres sonucu indüklenen mitokondriyel solunum nedeniyle ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin indirgenmesi için kritik rol oynayan süperoksit dismutaz (Sod1) ve katalaz (Ctt1) gibi genlerin de anlatımı indüklenir (Lee ve diğ., 2002; Madrid ve diğ., 2004).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA VE BESİYERLERİ

Çalışma için Bioneer'den temin edilmiş olan tüm genom mutant koleksiyonundan seçilen *Schizosaccharomyces pombe* EDD666 parental ve *swi6Δ* ırkları kullanıldı (Tablo 3.1).

Çalışma boyunca *S. pombe*'nin ırk seçiminde, üretiminde ve aspartam etkisinin saptanmasında kullanılan besiyerleri ve metabolitler Ek-A'da, elektroforetik analizlerde kullanılan tampon ve çözeltiler ile aspartam stok solüsyonunun içeriği Ek-B'de verildi. Hazırlanan tüm besiyerleri ve metabolitler 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika otoklavlanarak steril edildi.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ırklarının genotipleri.

İrk	Genotip
EDD666 Parental	h^+ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32
EDD666 <i>swi6Δ</i>	h^+ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 <i>swi6::KANMX4</i>

3.2. ORGANİZMANIN ÜRETİMİ, GENOTİP TAYİNİ VE SAKLANMASI

S. pombe parental ve *swi6Δ* ırkları, -80°C stoktan çıkarılarak 5 mL YEL besiyeri içeren cam tüplerde 30°C çalkalamalı etüvde canlandırıldıktan sonra YEA petrilere yayma ekimi yapılarak tek koloni düşürüldü ve 3 gün boyunca 30°C etüvde inkübe edildi. Oluşan kolonilerden ırkların genotip tayini, genetisin (200 mg/L) ve oksotrofi “marker”ları (adenin, urasil, lösin) içeren minimal besiyeri MMA'da gerçekleştirildi. Seçilen tek bir koloni eğri YEA besiyerine ekildikten sonra 3 gün boyunca 30°C etüvde inkübasyona bırakıldı ve çalışma boyunca kullanılmak üzere, her ay tazelenerek, 4°C'de saklandı.

Ayrıca delesyonun istenilen gene ait olduğunun kontrolü, Tablo 3.2'de verilen bileşenler ile Tablo 3.3'te verilen koşullar ve seleksiyon “marker”ı olan KANMX4 geni ile *swi6* geninin komşu bölgelerinden seçilen dizilere uygun olarak sentez edilen primerler (Tablo 3.4)

kullanılarak PZR tekniği ile yapıldı. Ürünlerin kontrolü Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı gibi gerçekleştirildi ve “marker” olarak “GeneRuler 1 kb DNA Ladder” kullanıldı (Şekil 3.1).

Tablo 2.2: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR tekniğinin bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µL)
dH ₂ O	10.6
10x Buffer	4
MgCl ₂	1
DMSO	0.6
dNTP (2.5 mM)	1.6
İleri primer	0.5
Geri primer	0.5
Kalıp	1
Enzim	0.2

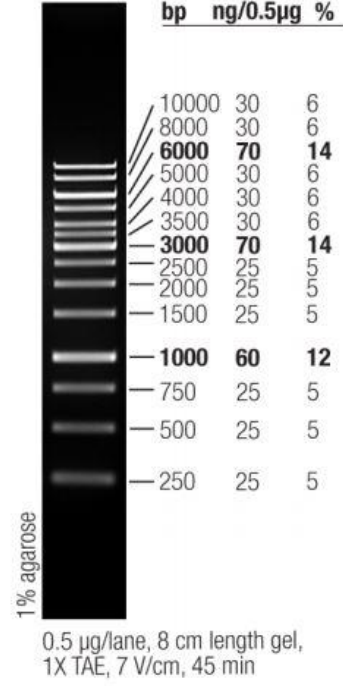
Tablo 3.3: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR tekniğinin koşulları.

Reaksiyon Aşaması	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	98	30 sn
Denatürasyon	30	98	10 sn
Primer Bağlanma		58	30 sn
Uzama		72	1 dk
Son Uzama	1	72	10 dk

Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan *S. pombe* ırklarının genotip tayini için kullanılan primerler.

Primer	Dizi
KANMX4F	5' TGATTTTGATGACGAGCGTAAT 3'
KANMX4R	5' CGTCTGTGAGGGGAGCGTTT 3'
Swi6UpF	5' GCGAGACTCGAACTCGCAACC 3'
Swi6DwR	5' TGGAACAGAAGAAACGGAGAAGGC 3'

GeneRuler 1 kb DNA Ladder



Şekil 3.1: Elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde kullanılan “DNA Ladder”.

3.3. ASPARTAM DOZUNUN BELİRLENMESİ

YEL besiyerinde 30°C’de bir gece çalkalayıcı etüvde çoğaltılan hücreler, Malassez lamında (0.0025 mm², Superior, Marienfield) sayılıp (Denklem 3.1) farklı aspartam konsantrasyonları içeren (0.05, 0.25, 1, 2, 3 mg/mL) 1 mL’lik YEL’de 10⁶ hücre/mL başlatılarak 24 saat boyunca üretildikten sonra 10’ar katlık sulandırma serisi hazırlanıp YEA besiyerinde her spota 5 µL hücre süspansiyonu koyulacak şekilde ekildi ve 3 gün 30°C’de inkübe edildi.

$$Hücre/mL = Ortalama hücre sayısı \times Sulandırma faktörü \times 10^5 \quad (3.1)$$

3.4. ORGANİZMANIN ASPARTAM İÇEREN BESİYERİNDE ÜREME SÜRECİNİN GÖZLENMESİ

YEL’de 30°C’de bir gece canlandırılan hücreler, deneylerin gerçekleştirileceği hacim olan 20 mL YEL ve YEL+APM besiyerlerinde 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekildi ve 180 devir/dakika

30°C’de çalkalayıcı etüvde (Sartorius stedium, Certomat® IS) üremeye bırakıldı (Tablo 3.5). Kültürlerden 34 saat boyunca her iki saatte bir 200 µL’lık örneklerin 96’lık mikrolakada OD₆₀₀ değeri spektrofotometrik olarak ölçüldü (EON, Biotek Instruments Inc.). Elde edilen OD değerlerinden, hücre/mL standart grafiği yardımıyla hücre sayısını belirten hücre üreme grafiği çizildi. Standart grafik oluşturmak için, hücre/mL miktarı bilinen sulandırım serisi hazırlandı ve bu serinin absorbansı 600 nm dalga boyunda ölçüldü.

Tablo 3.5: Çalışma süresince uygulanan kültür dizaynı.

Kültür	Besiyeri (20 mL)	Koşul
Kontrol (P, S)	YEL	30°C, 180 devir/dakika çalkalamalı etüvde 24 saat inkübasyon
Deney (PA, SA)	YEL+APM (1 mg/mL)	

3.5. HÜCRE CANLILIĞI BELİRLENMESİ (“COLONY FORMING UNITS” YÖNTEMİ)

Aspartamın üreme üzerine inhibe edici konsantrasyonunu belirlemek için YEL besiyerinde 30°C’de bir gece çalkalamalı etüvde çoğaltılan hücreler, 10⁶ hücre/mL olacak şekilde kontrol grubu YEL ve deney grubu YEL+APM besiyerine ekilip 24 saat boyunca üretildi. 10⁴ kat sulandırımı gerçekleştirilen bu kültürlerin YEA petrilere yayma ekimi yapıldı ve 3 gün boyunca 30°C’de etüvde inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon sürecinden sonra besiyerinde üremiş olan kolonilerin sayımı yapıldı ve canlılık yüzdeleri hesaplandı (Denklem 3.2).

$$\% \text{ Canlılık} = \frac{\text{Aspartam uygulanmış kolonilerin sayısı}}{\text{Kontrol kolonilerin sayısı}} \times 100 \quad (3.2)$$

3.6. GLUKOZ TÜKETİM TESTİ

Deney ve kontrol grubu kültürlerinden 4 saat boyunca her 30 dakikada bir 500 µL örnek alınarak 4700 xg’de 10 dakika santrifüj edildi (Thermo Scientific MicroCL 17 Microcentrifuge)

ve üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Glukoz tüketimi testi, “Cayman Chemicals Colorimetric Glucose Assay Kit” yönergelerine uygun olarak gerçekleştirildi. İlk önce, kit tarafından sağlanan “Glucose Standart” ile 8 farklı konsantrasyonda glukoz standardı hazırlandı ve bu standartların 520 nm dalga boyunda absorbanşı ölçüldü. Daha sonra bu absorbanş değerleri karşılık geldikleri glukoz konsantrasyonları ile eşleştirilerek standart grafik çıkarıldı.

Deney ve kontrol örneklerinden 15 μ L ve sulandırılmış “Assay Buffer”dan 85 μ L replikalarıyla birlikte 96’lık mikropłaka kuyularına bölüştürüldü. Üzerine 100 μ L glukoz oksidaz enzim karışımı eklendi. Plaka kapağı kapatıldı ve 37°C’de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbanş değeri spektrofotometre cihazında 520 nm’de ölçüldü. Ardından standart grafikten yararlanılarak zamana bağılı glukoz tüketim grafiğı çizildi.

3.7. MİKROSKOPİK İNCELEME

Deney ve kontrol grubu kültürlerinden alınan 1 mL örneğın hücreleri distile su ile toplandı (4700 xg, 10 dakika). Çöktürölen hücreler 1 ml soğuk %70 etanol ile muamele edildi ve -20°C’de 15 dakika bekletildi. Ardından distile su ile yıkanarak alkol uzaklaştırıldı. Tekrar 4700 xg’de 10 dakika santrifüj edilen hücreler, 200 μ L soğutulmuş %70 etanolde süspanse edilerek son konsantrasyon 1 μ g/mL olacak şekilde DAPI eklendi ve 37°C’de 2 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Alkol ile temizlenmiş lam ve lamel ile hazırlanan preparatlarda 15 μ L maya kültürü floresan mikroskopunda görüntölendi (Olympus BX53 mikroskop, UNA floresan filtre ve DP73 dijital kamera).

3.8. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON

Deney ve kontrol grubu kültürlerinden alınan ve eşit sayıda hücre içeren örnekler 2400 xg’de 5 dakika boyunca çöktürüldü ve 1 mL taze besiyerinde çözdürüldü. Boyanın çalkalamalı etüvde daha iyi emilmesi için örnekler mikrosantrifüj tüplerden 24’lük mikropłakaya aktararak üzerine 5.2 μ L DCFH-DA (10 μ M) eklendi ve 30°C’de 1 saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası örnekler yeniden mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve 2400 xg’de 5 dakika boyunca çöktürölüp edilip suyla yıkandı. Ardından örnekler 400 μ L 1x PBS’te

Total RNA izolasyonu “Pure Link® RNA Mini Kit (Ambion by Life Technologies)” ile firma yönergeleri optimize edilerek gerçekleştirildi. Kontrol ve deney gruplarından alınan 10 mL örnek 4400 xg’de 10 dakika santrifüj edildi (Eppendorf 5810R Rotor F-34-6-38). Üst sıvı atıldı ve pellet üzerine 500 µL lizis tamponu (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, %10 gliserol, 1 mM PMSF, 1 mM DTT), 5 µL β-merkaptoetanol ve 0.3 g asitle yıkanmış cam boncuk (0.45 – 0.55 mm) eklendi. Dismembratör cihazında 1 dakika arayla 3 kere 5 dakikalık mekanik homojenizasyon gerçekleştirildi. Tüpler spinlenerek lizat yeni tüpe alındıktan sonra hücre kalıntılarını elimine etmek üzere 2600 xg’de 5 dakika santrifüj sonrası üst sıvı alındı. Üzerine 1:1 oranında %70’lik EtOH eklendi ve kolonlara alınarak 12000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. 700 µL “Wash Buffer I” eklendi ve 12000 xg 1 dakika santrifüj edildi. 500 µL “Wash Buffer II” eklendi ve 12000 xg’de 1 dakika santrifüj edildi. Sonrasında 12000 xg’de 2 dakika boş santrifüj edildi. Kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp üzerine 60 µL “RNase-free” dH₂O eklendi ve 12000 xg’de 2 dakika santrifüj edildi. RNA’lar -80°C’de saklandı.

İzolatu kontrolü agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. %1'lik jel hazırlamak için, 0.4 g agaroz tartıldıktan sonra 40 mL 1xTAE ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında ~1 dk eritildi. Uygun miktarda soğutulduktan sonra üzerine 3 µL EtBr (0.5 µg/mL) eklendi. Jel karışımı, hazırlanan kasete dökülerek polimerizasyona bırakıldı. Jel polimerize olduktan sonra kaset, içi 1xTAE dolu olan elektroforez tankına yerleştirildi. Örneklerden 5 µL alınarak 1 µL 6x Yükleme Tamponu ile karıştırıldı ve jel kuyularına yüklendi. Jel 70 V'ta 30 dakika boyunca yürütüldü ve UV ışıktaki gözlemlendi.

3.9.2. Kantitatif Analiz

RNA konsantrasyonu “NanoDrop 2000c” ile ölçüldü. İlk olarak örneklerin çözündürülmüş olduğu saf su 1.5 µL hacimde ölçülerek “blank” olarak kullanıldı. Daha sonra örnekler de aynı hacimde ölçüldü.

3.10. cDNA SENTEZİ

Elde edilen RNA’dan cDNA sentezi “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher)” tarafından sağlanan yönergelerle uygun olarak gerçekleştirildi. Reaksiyon karışım konsantrasyonu 2 µg olacak şekilde eklenen total RNA örneklerinin, kit tarafından sağlanan “random primerler” ile cDNA sentezi yapıldı. Ultra saf su kullanılarak karışımın son hacmi 20 µl’ye tamamlandı. “Bio-RAD T100 Thermal Cycler” cihazında Tablo 3.6’da miktarları ile verilen karışım bileşenleri ve Tablo 3.7’de verilen reaksiyon aşamaları ile RNA örneklerinden cDNA sentezlendi. Sentezlenen cDNA’ların analizi agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi (70V, 30 dakika). Örnekler -20°C’de saklandı.

Tablo 3.6: cDNA sentez bileşenleri.

2xRT mix	P (µL)	PA (µL)	S (µL)	SA (µL)
10x RT Buffer	2	2	2	2
25x dNTP Mix	0.8	0.8	0.8	0.8
10x RT Random Primer	2	2	2	2
MultiScribe Reverse Transkriptaz	1	1	1	1
RNA (2 µg)	2.36	3.35	1.3	3.32
dH ₂ O	11.84	10.85	12.3	10.88
Toplam	20	20	20	20

Tablo 3.7: cDNA sentez koşulları.

	1. Aşama	2. Aşama	3. Aşama	4. Aşama
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Zaman (dakika)	10	12	5	∞

3.11. GERÇEK ZAMANLI PZR İLE GEN ANLATIMI ANALİZİ

Zincir reaksiyonu için kullanılan ve ticari olarak sentezlenmiş primerler; aspartam ve Swi6 ilişkisinin incelenmesi için seçilen hedef genlere ve standart olarak seçilen gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz 3 (*gpd3*) genine ait dizi bilgileri NCBI veri tabanından elde edilerek Primer 3 programı ile tasarlandı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8: GZ-PZR tekniğinde kullanılan primerler ve dizileri.

Gen adı	Primerin adı	Primer dizileri
<i>swi6</i>	<i>swi6</i> (ileri)	5'-TTTTTGGACTGGCTAAACCAT-3'
	<i>swi6</i> (geri)	5'-GCCGAGAGGGGACTGATGTC-3'
<i>hvk2</i>	<i>hvk2</i> (ileri)	5'-CAACAAGGACTTTGCCCAAT-3'
	<i>hvk2</i> (geri)	5'-AAGGTGTCGCTCTCCTTTGA-3'
<i>fbp1</i>	<i>fbp1</i> (ileri)	5'-GTATGGTGCTTCGGCTCATT-3'
	<i>fbp1</i> (geri)	5'-TTCATGTTTCGATGGGTCAA-3'
<i>tup11</i>	<i>tup11</i> (ileri)	5'- AAATCCTCAATTGCCTGGTG -3'
	<i>tup11</i> (geri)	5'- CCGAAGGAGTTGCTTTGGTA-3'
<i>atf1</i>	<i>atf1</i> (ileri)	5'-ACCCCTACTGGAGCTGGATT-3'
	<i>atf1</i> (geri)	5'-ACCATCCCTTGGGGTAAAAC-3'
<i>cox4</i>	<i>cox4</i> (ileri)	5'-AAGAGCAGCGGTCAGGAGTA-3'
	<i>cox4</i> (geri)	5'-GCGTTGGCTAATTCTTGAGC-3'
<i>ctt1</i>	<i>ctt1</i> (ileri)	5'-ATCCTCAATCCGACCACTTG-3'
	<i>ctt1</i> (geri)	5'-AACGTCGGTAATTTCTGTCCA-3'
<i>sod1</i>	<i>sod1</i> (ileri)	5'-ATTGGCCGTACCATTGTCAT-3'
	<i>sod1</i> (geri)	5'-GACACCACAAGCGTTACGTG-3'
<i>cyr1</i>	<i>cyr1</i> (ileri)	5'-CCGCTATACTGCATGGGTTT-3'
	<i>cyr1</i> (geri)	5'-TCGATACGCAAAGTCAGACG-3'
<i>gpd3</i>	<i>gpd3</i> (ileri)	5'-GGTGACAACCACTCCTCCAT-3'
	<i>gpd3</i> (geri)	5'-TCAACAACACGGTGGGAGTA-3'

Reaksiyonda floresan boya içeren “Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher)” kit kullanılarak mikrosantrifuj tüpünde Tablo 3.9’da belirtilen bileşenler ile reaksiyon karışımı hazırlandı. “LightCycler 480 Multiwell Plate” plakının kuyularına her bir örnek için bu karışımdan 19 µL dağıtıldı ve sentezlenen cDNA örneklerinden kalıp olarak 1 µL (100 ng) eklendi. Dağıtma işleminin ardından “LightCycler 480 Multiwell Plate” plakının üzeri “LightCycler 480 Multiwell Sealing Foil” ile kapatıldı ve 1500 xg’de 1 dakika santrifüj edilip

“Roche LightCycler 480” cihazına yerleştirildi. Reaksiyon Tablo 3.10’da belirtilen koşullar ile gerçekleştirildi. Kontrol grubu cDNA’ları gen anlatımı değişikliklerinin hesaplanabilmesi için 1, 1/5, 1/25 ve 1/125 kat sulandırılıp standart olarak kullanıldı. Negatif kontrol (NTC) olarak kalıp içermeyen saf su kullanıldı.

Tablo 3.9: GZ-PZR tekniğinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar (Her bir örnek için) (µL)	Son Konsantrasyon
SYBR Green Master Mix (2X)	10	1X
İleri primer	0.5	50-300 nM
Geri primer	0.5	50-300 nM
Kalıp	1	1-100 ng
dH ₂ O	8	-

Tablo 3.10: GZ-PZR tekniğinde kullanılan reaksiyon koşulları.

Reaksiyon Aşaması	Döngü sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	10 dk
Denatürasyon	40	95	15 sn
Primer Bağlanma		57	1 dk
Uzama		72	30 sn
Erime Eğrisi (Sıcaklık, 0.2°C. Veri toplama modu sürekli)	1	95 65 97	5 sn 1 dk ∞
Soğuma	1	40	10 sn

3.11.1. Verilerin Değerlendirilmesi

Eşik çevrim (C_t) değerlerinin normalizasyonu Pfaffl eşitliği (Denklem 3.3) kullanılarak hesaplandı (Pfaffl, 2001). Eşitliğe göre gen anlatımındaki değişim (R), hedef gene ait çevrim sayısının, referans gene ait çevrim sayısına, reaksiyon verimine (E) bağlı olarak, oranıdır.

$$R = \frac{(E_{hedef\ gen})^{\Delta C_{thedef\ gen(kontrol-deney)}}}{(E_{referans\ gen})^{\Delta C_{referans\ gen(kontrol-deney)}}} \quad (3.3)$$

3.12. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

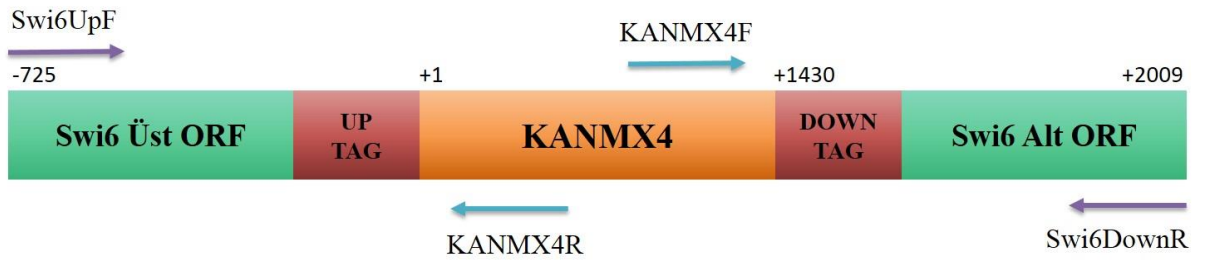
Aspartam ile Swi6 arasındaki ilişkiyi test etmek üzere CFU, hücre boyutu ve hücre içi oksidasyon deneylerinde iki yönlü varyans analizi ("Two-way ANOVA"), deney ile kontrol grupları arasındaki farkı tespit etmek üzere tek yönlü varyans analizi ("One-way ANOVA") kullanıldı. 3 tekrarlı olarak yapılan GZ-PZR tekniğinin istatistiksel analizi de yine tek yönlü varyans analizi ("One-way ANOVA") ile gerçekleştirildi. Gruplar arası ortalama varyansının, grup içi dağılım varyansına oranı $P < 0.05$ olarak hesaplandığında veriler anlamlı olarak kabul edildi. Analizler "GraphPad Prism 6" yazılımında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. GENOTİP TAYİNİ

S.pombe tüm genom kitaplığından sağlanan *S. pombe swi6Δ* mutantının genotip kontrolü, *swi6* genine ait komşu dizilerden ve KANMX4 geninin içinden seçilen ileri ve geri primerlerle gerçekleştirilen polimeraz zincir reaksiyonu ile yapıldı (Şekil 4.1; Şekil 4.2). Buna göre *swi6* geninin üst bölgesinden seçilen bir ileri (Swi6UpF) ve KANMX4 geninin içinden seçilen bir geri primer (KANMX4R) ile, *swi6* geninin alt bölgesinden seçilen bir geri (Swi6DownR) ve KANMX4 geninin içinden seçilen bir ileri primer (KANMX4F) ile yapılan PZR sonucunda *swi6Δ* ırkından her iki reaksiyonda da beklenen ürün elde edilirken, parental ırkta hiçbir bant elde edilemedi. *swi6* gen bölgesinde *swi6Δ*'nın KANMX4 genini içerdiği ve parentalinin ise içermediği Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

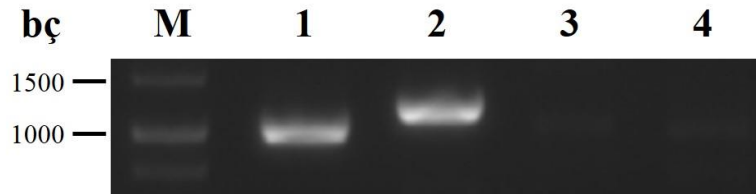
1. ve 2. kuyuda *swi6Δ* genomik DNA'sından çoğaltılan ve *swi6* genine ait sırasıyla üst ve alt komşu dizilerin KANMX4 genine sınırda bulunduğu bölgeleri içeren 972 bç ve 1180 bç bantlar gösterildi. Buna karşın aynı koşullarda gerçekleştirilen ve kalıp olarak parental ırk DNA'sının kullanıldığı 3. ve 4. kuyuda *swi6* genine ait sırasıyla üst ve alt komşu dizilere ait bantlar çoğaltılamadı.



Şekil 4.1: *swi6Δ* ırkının *swi6* gen bölgesi gösteren şema.

GCAGAGACTCGAACTCGCAACCTTCTGATTACCATCATAAGAGTCAGACGCTCTAAACCGATTGAGCCACTCGGGAC
 TTCGTTGACGACTTAAGTTATTCAGTGTAATATGTAGTGCAAAAAGAATCCTCATAAGAATATATATTTTGTGT
 TGACGATGATTGCCTACGAAATTTAAAAGGTGGAATTGTTTTCTAGTTAAGATTGTTTATCAATCTTGAGAGACTC
 AGCATTGCTTTAGAAAACAAATCAGCATGCCAACCGTAACAGCCAAATATCTTGTTACTCGCAGCATTACTTAAAA
 TGTTAATTTTATTTCTAACGGTAATATTTGTTCAATATTTTCGTATTTTCGCATTAAGTAAATCACTAGGAAATTGA
 GATGCTTTTGAATAATGATTATTACTGATAGTGATCTAAGCAAAATTAGGCGTCGTTAATCAACTTTTAGACAAC
 GATTAATACAGTACTTCTATGCAATATTTTAATAAACGAACCTCTATGTGATGCTAGCCATTCTGTACACCATGAAA
 AGCAAGCCAAACATGTCTCGCTAAACGAGCAACAACCTGTAAAGACCAACGCGAAATTGATGTTTAGTACTTTTT
 AAAATATTCTGAAATCTCGTTTATTTTCATATTAAGACAAGTGAAAA (**UPTAG**) AGCTTGCTCGTCCCGCCGGG
 TCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAGAATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGCATGATGT
 GACTGTGCGCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGG
 CGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCTCAGAGACGCGTTGAATTG
 TCCCCACGCCGCGCCCCCTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTGGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCT
 TTTAAAATCTTGCTAGGATACAGTTCCTCACATCACATCCGAACATAAACAACCATGGGTAAGGAAAAGACTCACGT
 TTCGAGGCCGCGATTAAATTCCAACATGGATGCTGATTTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATAATGTGCGGC
 TCAGGTGCGACAATCTATCGATTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCG
 TTGCCAATGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCA
 TTTTATCCGTACTCCTGATGATGCATGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGGCAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAA
 GAATATCCTGATTACAGGTGAAAAATTGTTGATGCGCTGGCAGTGTTCTGCGCCGGTTGCATTGATTCCTGTTT
 GTAATTGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGTCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAATAACGGTTTGGTTGA
 TGCGAGTGATTTTGATGACGACGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAAGAAATGCATAAGCTTTTGCCA
 TTCTCACCGGATTACGTCGTCACCTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAG
 GTTGATTGATGTTGGACGAGTCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGA
 GTTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATATGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATTGCAGTTT
 CATTGATGCTCGATGAGTTTCTAATCAGTACTGACAATAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAACCTGTCATTGT
 ATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATCAAATGTTAGCGTGATTATATTTTTTTTCGCTCGACATC
 ATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATAC
 TGCTGTGATTCGATACTAACGCCGCCATCCAGTGTCGA (**DOWNTAG**) TTTTTTGTGTTCTTTAAAAAATCCTT
 TTTCTTTTGTATAAATTAGATTTTCGCTTTTTTCTGACGTTATTGCTTTTATCAAGTCCCGTGTGCTAGTATGAG
 TTCTTGTTCTTACTCGAAAAATGCATCTAACATTATACCTTATACAAATTTTTGTTAGGCGCTTAACATCACATT
 CTAGTTTATGAACGCCCTTTGTTTTCTTTCACATTGAATTGATTACGAGTGACTTGAGAAATGTAAAAATACCTTTTG
 TCGTTATGGTTTGACATTTCAAATAACCTAAGGTTTGACATTCTAGATAACCTAATTTCTTTAATTTTACCATTTA
 TTAATTTAGCATGCACTGCTCTTCATGCATTCAAAATCGTGTCTAATAATAACGTAATTTTACTCGTTAAATAAAG
 AATTTATGCATGCAAAATCGTTACTCATAAACCTCAGCAGATAAATTTGTTAACAAAATGAGGGTGCATGAATAT
 CTGCCTTCTCGTTTTCTTCTGTTCCA

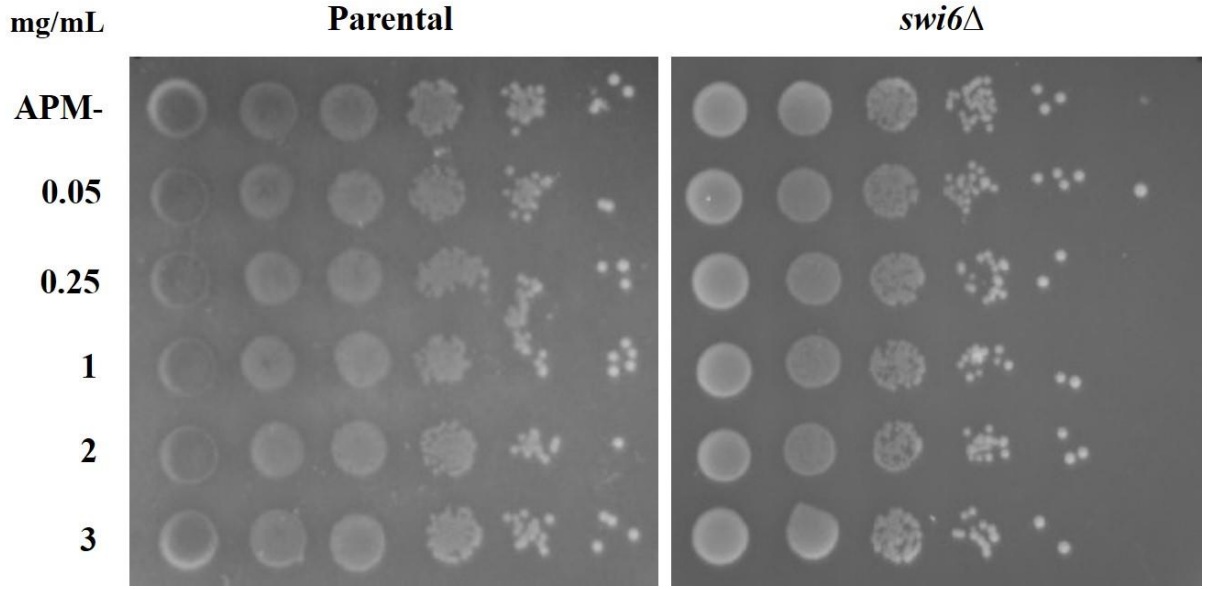
Şekil 4.2: *swi6Δ* ırkının KANMX4 içeren *swi6* gen bölgesinin ve PZR’de kullanmak üzere seçilen primerlerin DNA dizisi.



Şekil 4.3: Genotip tayini için gerçekleştirilen PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi. (M) Marker, (1) *swi6Δ*’da üst bölgeden Swi6UpF ve KANMX4R ile çoğaltılan 972 bp’lik bant, (2) *swi6Δ*’da alt bölgeden KANMX4F ve Swi6DownR ile çoğaltılan 1180 bp’lik bant, (3) Parental’de *swi6* genine ait üst bölge, (4) Parental’de *swi6* genine ait alt bölge.

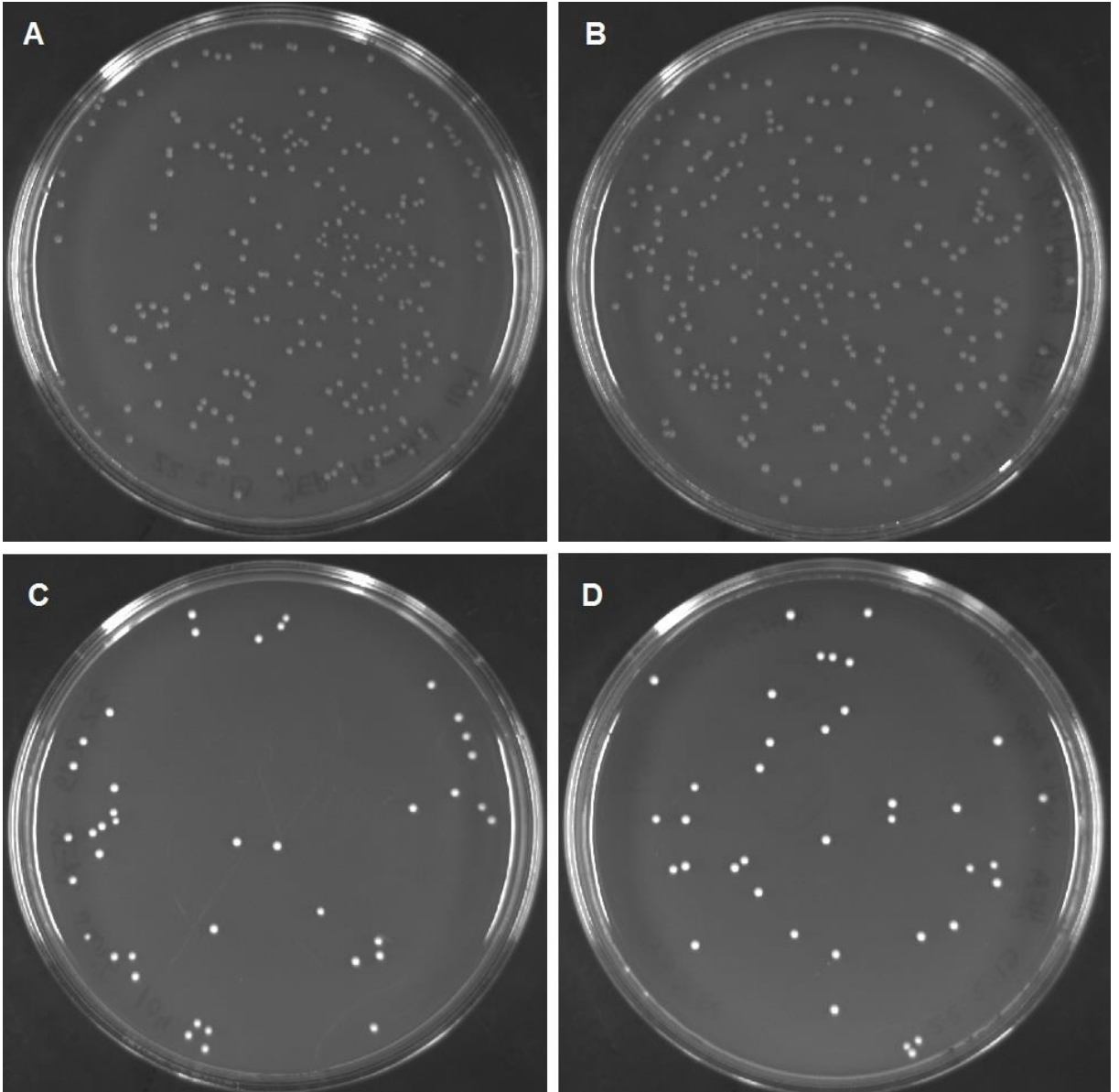
4.2. ASPARTAMIN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ

Aspartamın hücre canlılığı üzerine etkisini anlamak ve çalışma boyunca uygulanacak uygun dozu belirlemek üzere öncelikle 0.05, 0.25, 0.5, 1, 2 ve 3 mg/mL aspartam içeren besiyerinde 24 saat boyunca kültüre edilen *S. pombe* parental ve *swi6Δ* hücrelerinin YEA besiyerine spot ekimi yapıldı. Şekil 4.4’de görüldüğü gibi hücrelerin canlılığında aspartama bağlı anlamlı bir değişim görülmedi.



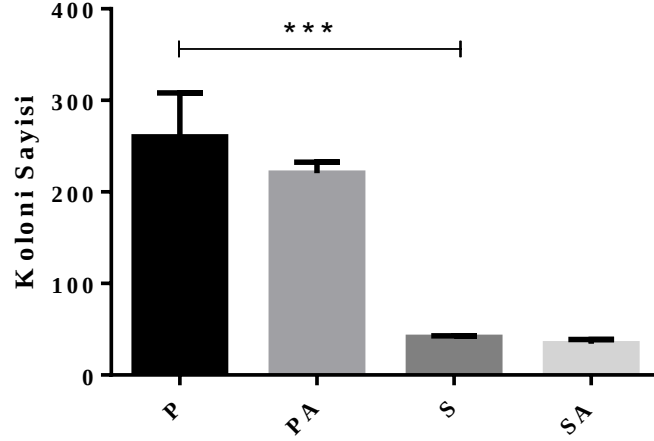
Şekil 4.4: Farklı aspartam konsantrasyonları uygulanması sonucu gerçekleştirilen spot ekimler.

Bunun üzerine çalışmanın sürdürülebilmesi adına aspartamın hücre canlılığı üzerinde %20 inhibe edici etkisi olan konsantrasyonu belirlemek için Bölüm 3.5’te anlatıldığı gibi “Colony Forming Units” yöntemi uygulandı. Yönteme göre parental ve *swi6Δ* hücrelerinin aspartam içeren ve içermeyen koşullarda 24 saat üretimi yapıldıktan sonra YEA petrisine ekimi yapıldı ve Şekil 4.5’te verildiği gibi kolonilerin oluşumu gözlemlendi. Yaklaşık %80 canlılığı sağlayan 1 mg/mL aspartam konsantrasyonu seçilerek deneylere devam edildi.



Şekil 4.5: Aspartam uygulanması sonucu oluşan koloniler. (A) Parental (B) Parental + APM (C) *swi6Δ* (D) *swi6Δ* + APM.

Buna göre, aspartamın parental hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi %84.81 iken, *swi6Δ* hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi % 83.66 olarak yöntemlerde verilen Denklem 3.2'ye göre hesaplandı. Sonuçların değerlendirildiği istatistik yazılımı “Graphpad Prism 6”da çıkarılan grafiğe göre *swi6Δ*'nın parentale göre daha yavaş ürediği tespit edildi (Şekil 4.6).

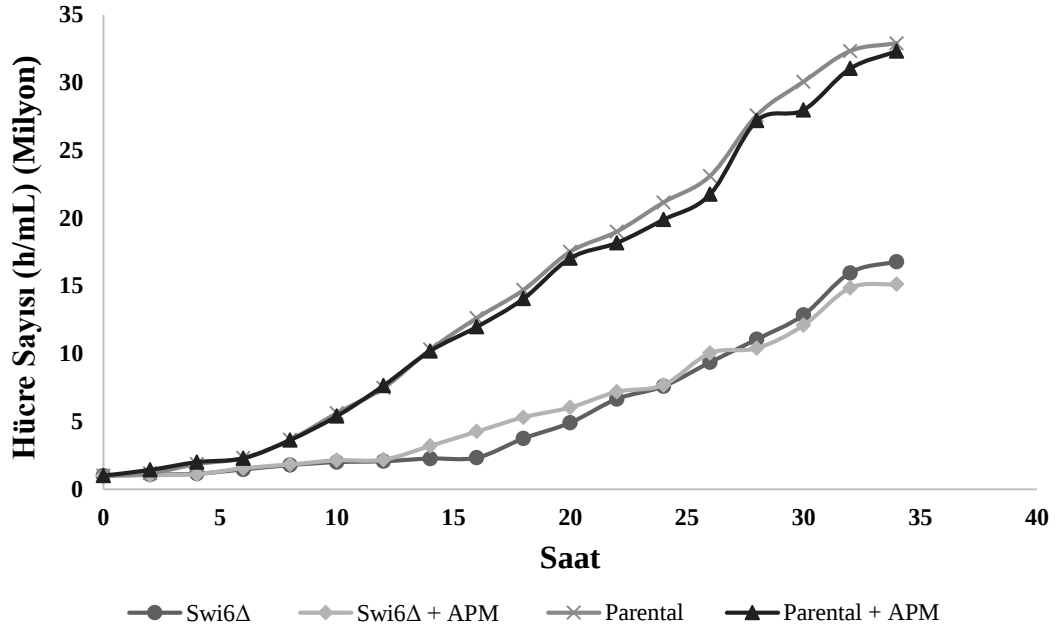


Şekil 4.6: CFU analizi, P (260±48.08), PA (220.5±12.02), S (41±1.73), SA (34.33±4.62), N=3.

Aspartam ile Swi6 arasındaki ilişkiyi test etmek üzere “Two-way ANOVA” analizi yapıldı ve sonuç anlamlı bulunamadı. Deney ve kontrol grupları arasındaki koloni sayısı farklılığı “One-way ANOVA” ile analiz edildi ve farklılık $P < 0.0001$ (****) ile istatistiki olarak anlamlı bulundu. Ancak gruplar arasındaki standart sapmalar birbirine eşit olmadığından, bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Holm-Sidak testi yapıldı ve P ile S arasında $P < 0.0001$ (***) değerinde fark olduğu belirlendi.

4.3. ASPARTAMIN ÜREME SÜRECİNE ETKİSİ

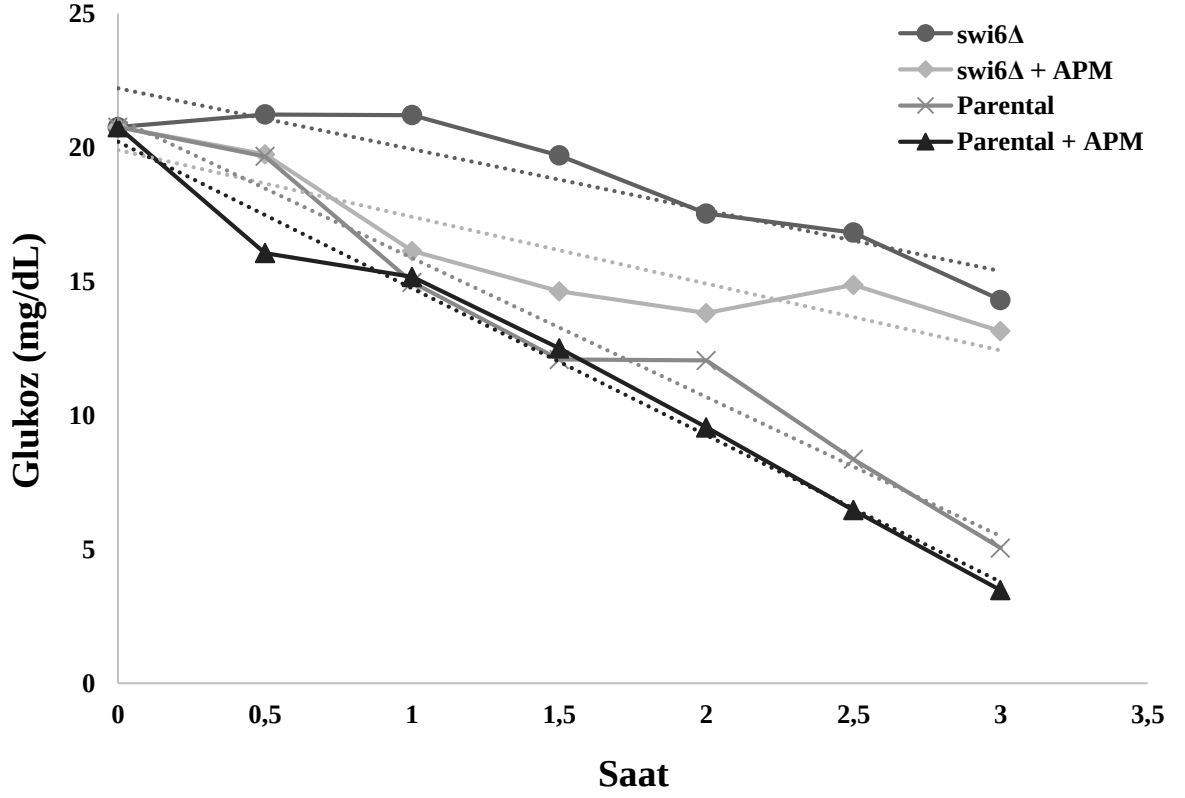
Aspartamın hem *S. pombe* hücrelerinin üreme hızlarına etkisini belirlemek hem de bu kültürlerin üreme profillerini çıkarmak için *S. pombe* parental ve *swi6Δ* ırkları 1 mg/mL aspartam içeren ve içermeyen zengin besiyerinde 34 saat boyunca izlendi. Bu amaçla her iki saatte bir alınan örnekler Bölüm 3.4’te belirtildiği gibi OD₆₀₀’de ölçüldü ve standart grafikten yararlanılarak kültürün zamana bağlı üreme eğrisi çıkarıldı. *S. pombe*’nin parental ve *swi6Δ* ırklarında aspartam içeren zengin besiyerinin üreme profiline bir etkisinin bulunmadığı Şekil 4.7’de görülmektedir. Buna göre, kültürün mid-log evresi olan 24. saat her iki ırk için de analizleri gerçekleştirileceği saat olarak seçilmiştir.



Şekil 4.7: Hücre üreme eğrisi.

4.5. ASPARTAMIN GLUKOZ TÜKETİMİNE ETKİSİ

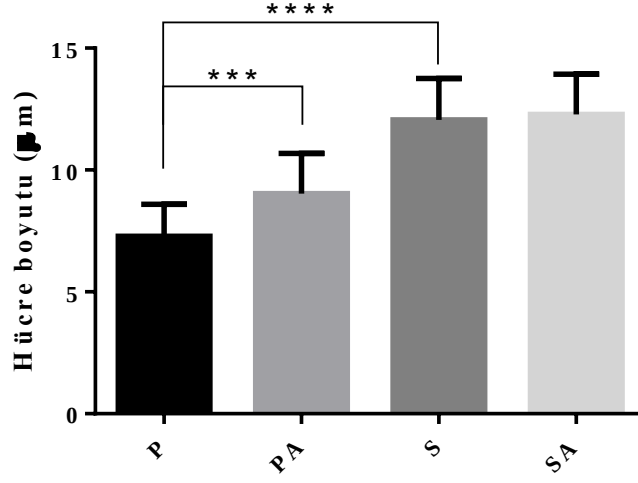
S. pombe parental ve *swi6Δ* ırklarında aspartamın glukoz tüketimine bir etkisinin olup olmadığını anlamak için Bölüm 3.6’da anlatıldığı biçimde glukoz tüketimi ölçüldü. Şekil 4.8’de görüldüğü gibi hem deney hem kontrol gruplarında *swi6Δ* ırkının glukozu tüketme hızının parentale göre düşük olduğu gözlemlendi. Ayrıca, aspartamın glukozu tüketme hızı üzerine her iki ırkta da bir etkisi olmadığı tespit edildi. P, PA, S ve SA gruplarında glukoz tüketimi sırasıyla 15.72, 17.29, 6.45 ve 7.62 mg/dL olarak hesaplandı.



Şekil 4.8: Aspartam uygulanması sonucu gözlenen glukoz tüketim hızı grafiği.

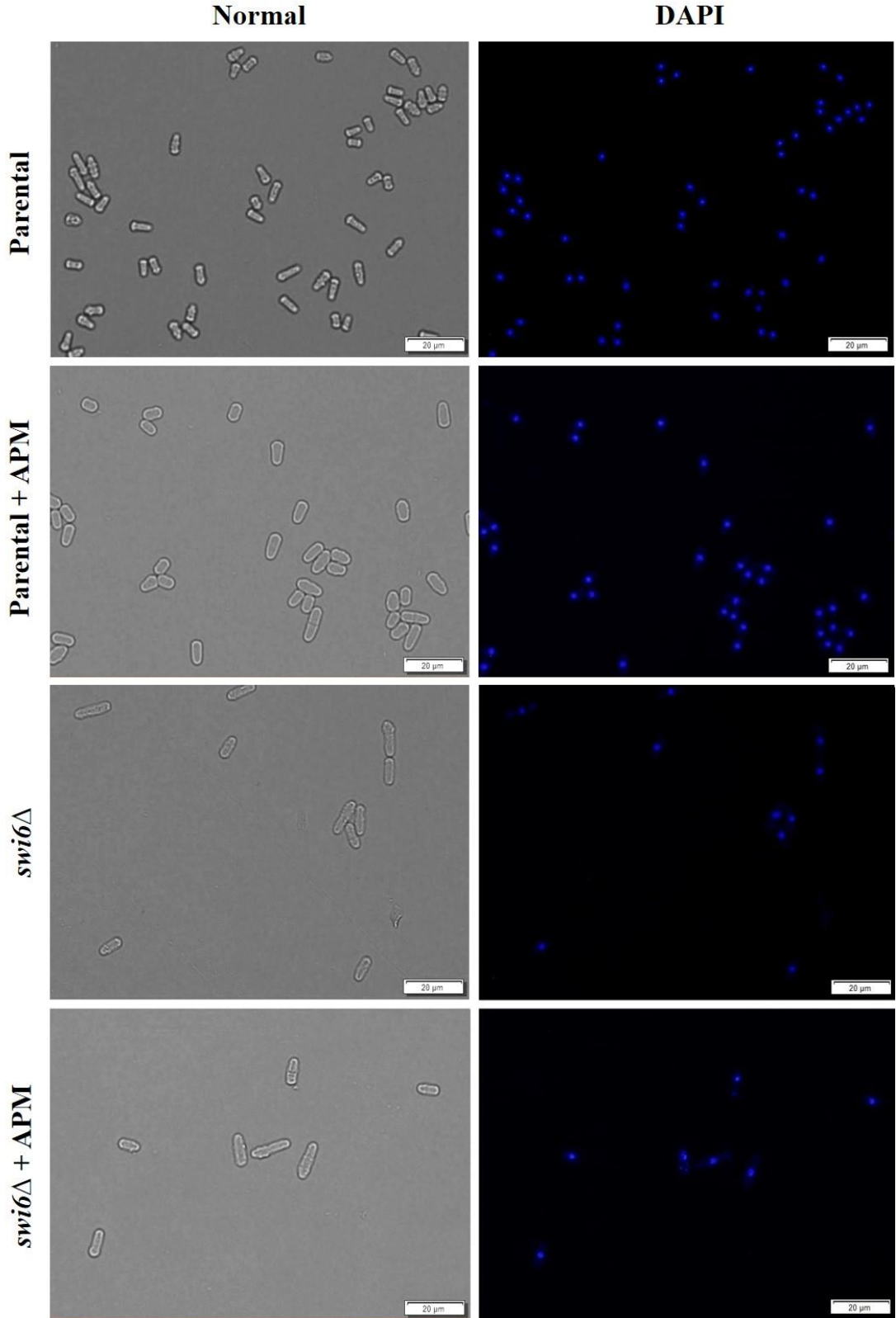
4.6. ASPARTAMIN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİ

Aspartamın *S. pombe* hücre morfolojisini ve nuklear yapısını etkileyip etkilemediği görünür ışıkla ve Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi hücrelerin DAPI ile boyanmasıyla floresan mikroskopunda analiz edildi. Görünür ışık görüntülerinden ölçülen hücre boyutlarının analizine göre aspartam uygulaması *swi6Δ* ırkında fark yaratmazken, parental ırkın hücre boyutunda artmaya yol açtı. Buna ek olarak *swi6Δ* ırkının hücre boyutu, parentale göre daha uzun olarak hesaplandı (Şekil 4.9). Ayrıca, floresan görüntüleme sonucu aspartamın iki ırkta da nuklear bütünlük açısından bir etki göstermediği tespit edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.9: Hücre boyut analizi. P (7.28±1.3), PA (9.03±1.65), S (12.05±1.70), S (12.28±1.65), N=30.

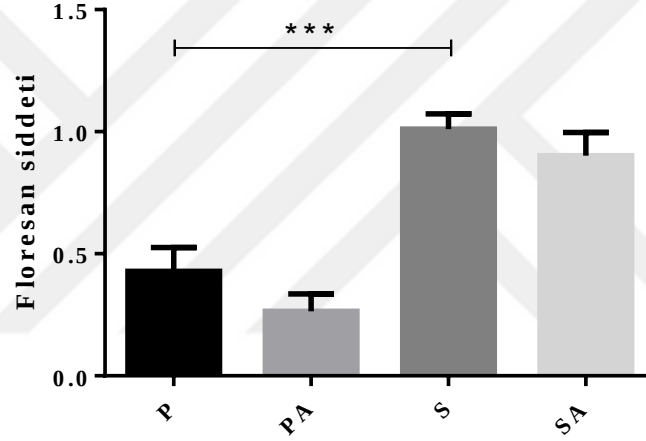
Aspartam ile *swiΔ* arasındaki ilişkiyi test etmek üzere “Two-way ANOVA” analizi yapıldı ve sonuç $P = 0.0151$ (*) değeriyle anlamlı bulundu. Deney ve kontrol grupları arasındaki hücre boyut farkı “One-way ANOVA” ile analiz edildi ve farklılık $P < 0.0001$ ile istatistiki olarak anlamlı bulundu. Bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi yapıldı. P ile S arasında $P < 0.0001$ (****) değerinde ve P ile PA arasında $P = 0.0002$ (***) değerinde fark olduğu belirlendi.



Şekil 4.10: Parental ve aspartam uygulanmış parental ile *swi6Δ* ve aspartam uygulanmış *swi6Δ* hücrelerinin görünür ışık ve floresan mikroskobu görüntüleri.

4.7. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON

Aspartamın *S. pombe* parental ve *swi6Δ* ırklarının reaktif oksijen türü oluşumuna etki edip etmediğini belirlemek için Bölüm 3.8’de anlatıldığı biçimde hücre içi oksidasyon düzeyi ölçüldü. Şekil 4.11’de görüldüğü gibi aspartam uygulaması deney ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark oluşturmadı, ancak *swi6Δ* ile parental kıyaslandığında hücre içinde daha yüksek oranda reaktif oksijen türü bulunduğu tespit edildi. Hesaplanan floresan şiddeti her 10^6 hücre için ifade edilmiştir.



Şekil 4.11: Hücre içi oksidasyon analizi. P (0.428 ± 0.097), PA (0.264 ± 0.072), S (1.010 ± 0.062), SA (0.903 ± 0.095), N=3.

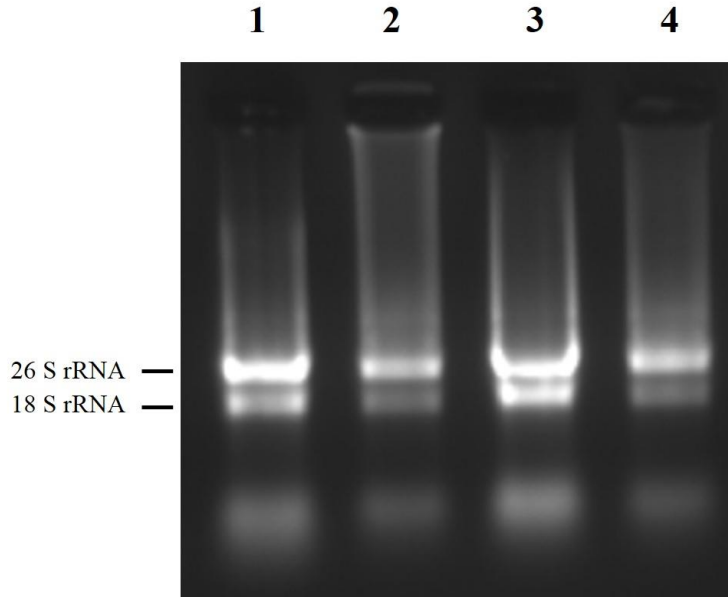
Aspartam ile *swi6Δ* arasındaki ilişkiyi test etmek üzere “Two-way ANOVA” analizi yapıldı ve sonuç anlamlı bulunamadı. Deney ve kontrol grupları arasındaki floresan şiddeti “One-way ANOVA” ile analiz edildi ve farklılık $P < 0.0001$ (****) ile istatistiki olarak anlamlı bulundu. Bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Tukey testi yapıldı ve P ile S arasında $P = 0.0001$ (***) değerinde fark olduğu belirlendi.

4.8. RNA İZOLASYONU VE cDNA SENTEZİ

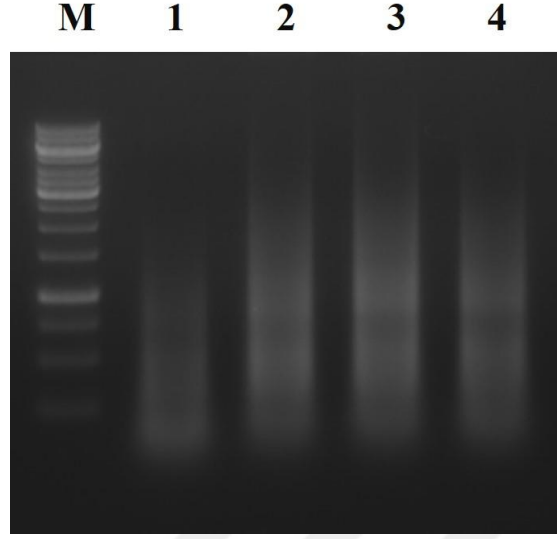
Bölüm 3.9’da verildiği şekilde izole edilen *S. pombe* hücrelerinden RNA izolasyonu, hem spektrofotometrik olarak (Tablo 4.1) hem de agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 4.12). Şekilde görülen 18S ve 26S rRNA’ya ait iki bandın varlığı, izolasyonun RNA’lar kırılmadan gerçekleştirildiğini doğruladı. Bu durumda elde edilen RNA’ların cDNA sentezi için kullanıma hazır olduğu gösterildi. İzole edilmiş RNA’lardan Bölüm 3.10’da anlatıldığı şekilde sentezlenen cDNA’ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü Şekil 4.13’te verildi. (Tabloda cDNA sentezi için kullanılan RNA’ların 1. deney setinde izole edilen RNA örneklerine ait olan miktarları verilmiştir.)

Tablo 4.1: İzolasyon sonucu elde edilen RNA miktarları.

Kültür	RNA Miktarı (ng/μL)
P	846.5
PA	596.6
S	1527.9
SA	601.7



Şekil 4.12: RNA jel görüntüsü (1) P, (2) PA, (3) S, (4) SA.

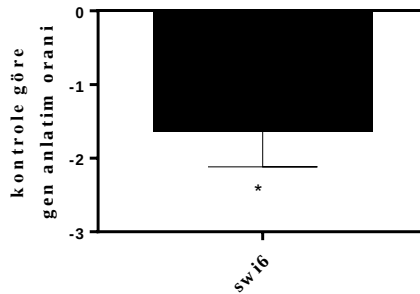


Şekil 4.13: cDNA jel görüntüsü, (M) Marker, (2) P, (3) PA, (4) S, (5) SA.

4.9. ASPARTAMIN ÇEŞİTLİ HÜCRESEL SÜREÇLER ÜZERİNE ETKİSİ

4.9.1. Aspartamın kromatin yapısı üzerine etkisi

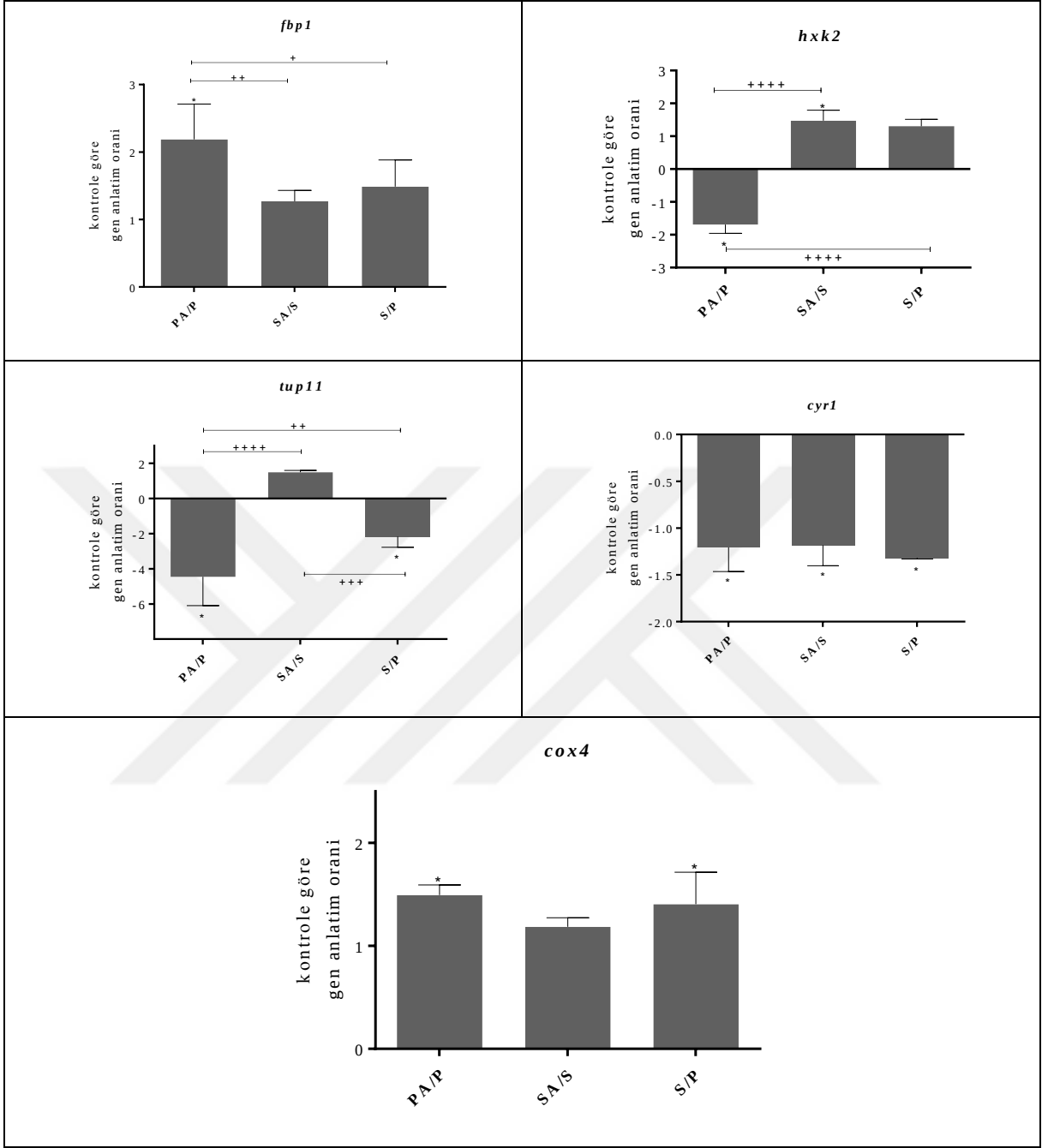
Aspartamın kromatin yapısı üzerine etkilerini anlamak için aspartam içeren ve içermeyen zengin besiyerinde 24 saat boyunca mid-log evreye kadar üretilen *S. pombe* parental ırkının *swi6* gen anlatım profili deney grubu kontrol grubuna oranlararak karşılaştırıldı (Şekil 4.14). Kromatin yapının düzenlenmesinden sorumlu *swi6* geninin 1 mg/mL aspartam uygulanan koşulda anlatımının yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.14: Aspartamın *swi6* gen anlatımına etkisi.

4.9.2. Aspartamın enerji metabolizmasına etkisi

Aspartamın enerji metabolizmasına etkilerini anlamak için 1 mg/mL aspartam içeren ve içermeyen zengin besiyerinde 24 saat boyunca mid-log evreye kadar üretilen *S. pombe* parental ve *swi6Δ* ırklarının *fbp1*, *hvk2*, *tup11*, *cyr1* ve *cox4* gen anlatım profilleri PA/P, SA/S ve S/P olmak üzere 3 şekilde karşılaştırıldı (Şekil 4.15). Glukoneogenezde görevli olan *fbp1* geninin anlatımının, S/P ve SA/S oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, PA/P oranında yaklaşık 2 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. Glikolizde rol alan *hvk2* geninin anlatımının, S/P oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, SA/S oranında yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir artış ve PA/P oranında ise yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği tespit edildi. Transkripsiyonel korepresör aktiviteden sorumlu *tup11* geninin anlatımının, SA/S oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, S/P oranında yaklaşık 2 kat ile ve PA/P oranında ise yaklaşık 4 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği saptandı. cAMP/PKA sinyal yolağında adenilat siklaz enzimi olarak iş gören *cyr1* geninin anlatımının, S/P, SA/S ve PA/P oranında yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir azalma gösterdiği belirlendi. Mitokondrinin elektron transport sisteminde sitokrom-c oksidaz aktivitesi gösteren Cox4'ü şifreleyen *cox4* geninin anlatımının, SA/S oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, S/P ve PA/P oranında yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edildi.

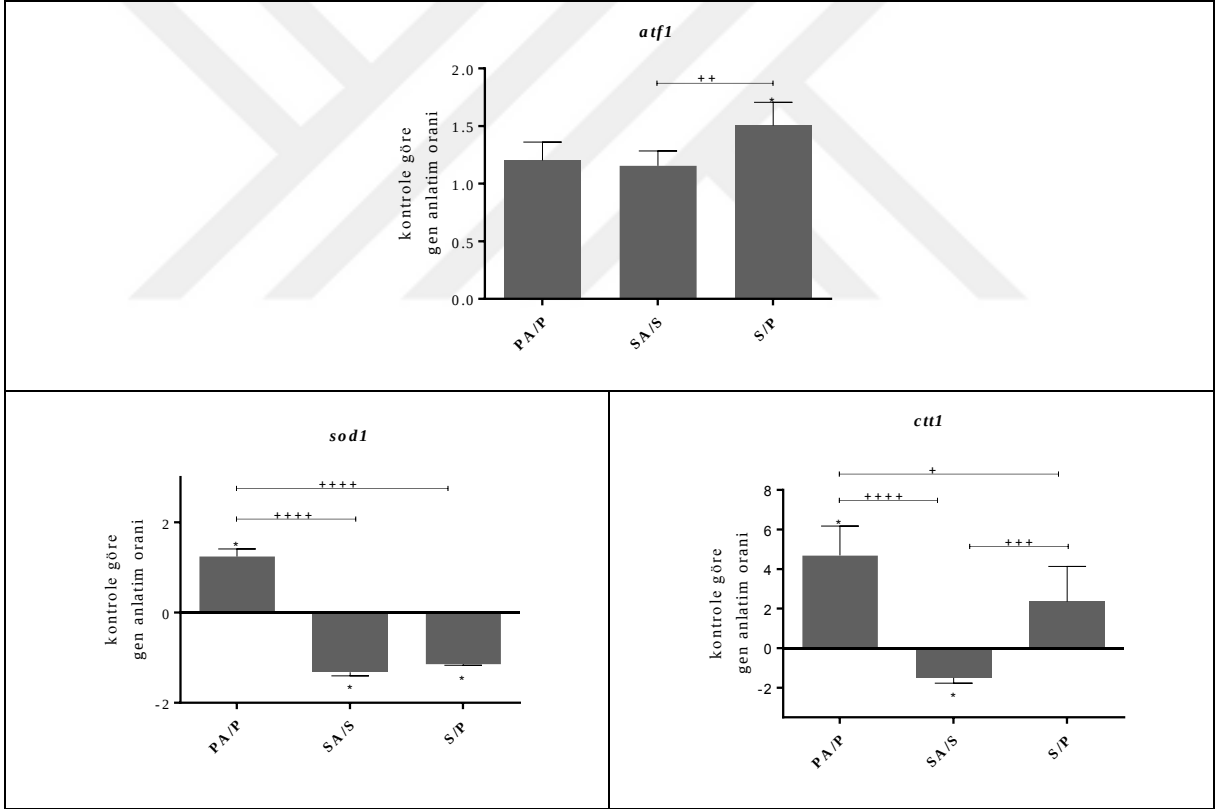


Şekil 4.15: Aspartam uygulamasının parental ve *swi6Δ* ırklarında *fbp1*, *hxk2*, *tup11*, *cyr1* ve *cox4* gen anlatımına etkisinde SA/S ve PA/P oranları arasında, *fbp1* geni için $P < 0.01$ (**) değerinde ve *hxk2* ile *tup11* genleri için $P < 0.0001$ (****) değerinde fark mevcuttur; *cyr1* ve *cox4* genleri için fark anlamlı değildir.

4.9.3. Aspartamın stres yanıtına etkisi

Aspartamın stres yanıtına etkilerini anlamak için 1 mg/mL aspartam içeren ve içermeyen zengin besiyerinde 24 saat boyunca mid-log evreye kadar üretilen *S. pombe* parental ve *swi6Δ*

ırklarının *atf1*, *sod1* ve *ctt1* gen anlatım profilleri PA/P, SA/S ve S/P olmak üzere 3 şekilde karşılaştırıldı (Şekil 4.16). Genel transkripsiyon faktörü *atf1* geninin anlatımının, SA/S ve PA/P oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, S/P oranında yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği saptandı. Süperoksit dismutaz aktivitesi gösteren *sod1* geninin anlatımının, yaklaşık 1.5 kat ile SA/S ve S/P oranında istatistiki olarak anlamlı bir azalma, PA/P oranında ise istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi. Katalaz enzimini şifreleyen *ctt1* geninin anlatımının, S/P oranında anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, SA/S oranında yaklaşık 1.5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir azalma ve PA/P oranında yaklaşık 5 kat ile istatistiki olarak anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi.



Şekil 4.16: Aspartam uygulamasının parental ve *swi6Δ* ırklarında *atf1*, *sod1* ve *ctt1* gen anlatımına etkisinde SA/S ve PA/P oranları arasında, *sod1* ve *ctt1* genleri için $P < 0.0001$ (****) değerinde fark mevcuttur, *atf1* geni için fark anlamlı değildir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aspartam, karsinogenik etkileri birçok model organizmada test edilen ancak hem pozitif hem negatif sonuçlar veren yapay bir tatlandırıcıdır (Shephard ve diğ., 1991; Gebara ve diğ., 2003; Gombos ve diğ., 2007; Schernhammer ve diğ., 2012). Kansereleşme süreci, çeşitli genlerde meydana gelen anlatım değişiklikleri sebebiyle genetik olduğu kadar epigenetiktir. Çevresel streslere karşı hücresel yanıtların oluşmasında rol oynayan bu epigenetik düzeydeki transkripsiyonel kontrol kromatinin dinamik yapısıyla ilişkilidir. Bu dinamikliği sağlayan kromatin ile ilişkili proteinler, yapının sıkı paketlenmesini (heterokromatin) ya da gen anlatımına izin verecek şekilde gevşemesini (ökromatin) sağlayabilirler. Heterokromatin yapı düzenlenmesi ile ilişkili olan HP1 proteinin yüksek derecede metastatik MDA-MB-231 meme kansinoma hücre hattında gen anlatımının düşmüş olması ve HP1 genini içeren ekspresyon vektörünün hücreye transformasyonu sonrasında metastatik özelliğın azaldığının görülmesi, heterokromatin yapının kanser gelişimindeki epigenetik etkisini destekler niteliktedir (Kirschmann ve diğ., 2000). Yapılan başka bir çalışmada da öne sürülen modelde olduğu gibi HP1 proteini invazyon ve metastaz için gereken genlerin anlatımını heterokromatin yapı oluşturarak sessizleştirmektedir (Norwood ve diğ., 2004).

S. pombe'deki insan HP1 ortologu olan Swi6, organizmanın sentromer, telomer ve eşleşme tipi lokusunda heterokromatin yapı oluşumunu düzenlemektedir (Cam ve diğ., 2005). Özellikle sentromerik bölgenin stabilizasyonu için önemli olan Swi6'nin yokluğunda mitoz esnasında kromozomal dağılım sorunlarının geliştiğı gözlemlenmiştir (Ekwall ve diğ., 1995). Buna bağılı olarak, kromozom sayı farklılığı olan anöploidinin neoplazik hücrelerde görüldüğü bilinmektedir (Yona ve diğ., 2012). Swi6, perisentromerik bölgede Cdc18 ile preRC kompleksi yapısına katılarak replikasyon başlangıcında görev alır ve preRC'de Swi6'nın yokluğunu replikasyonu geciktirmektedir (Li ve diğ., 2011). Bu gecikme, replikasyon tamamlanmadan hücre döngüsünün sonraki fazlarına geçmeyi engelleyen S fazı kontrol noktası proteinleri Rad3 ve Cds1 tarafından sağlanmaktadır (Enoch ve diğ., 1992; Murakami ve Okayama, 1995; Martinho ve diğ., 1998). Fisyon mayasında yapılan bir çalışmada replikasyon başlangıcından sorumlu bazı genlerde bulunan mutasyonların kendi başına değil, ancak replikasyon çatalını sekteye uğratan hidroksiüre (HU) uygulamasının ardından ROT artışına sebebiyet verdiği tespit edilmiştir (Burhans ve diğ., 2003). Çalışmamızda HU uygulaması yapılmamış olmasına rağmen takviyesiz zengin besiyerinin (YEL) kullanılması, adenin ve urasil oksotrofluğu bulunan swi6Δ

hücrelerine bir replikasyon stresi oluşturarak ROT artışına yol açtığını düşündürmektedir. Çünkü takviye metabolitleri içeren besiyerinde (YES) üretilen *swi6Δ* hücrelerinin çoğalmasında bir sorun görülmemiştir.

Yapılan çalışmada, karsinogenik etkileri tartışmalı olan yapay tatlandırıcı aspartamın *S. pombe* hücrelerine uygulandığında *swi6* anlatımında anlamlı bir düşüşe yol açtığı bulunmuştur (Şekil 4.14). GZ-PZR analizlerine göre hücreler aynı zamanda glukoz baskılayıcı koşullara rağmen glukoneogenetik bir enzim olan Fbp1'in anlatımını arttırmış ve glikolizde rol oynayan bir enzimi şifreleyen *hxx2* geninin anlatımını azaltmıştır (Walker, 1998). Bununla beraber *fbp1* geninin anlatımının indükleyicisi olan transkripsiyon faktörü Atf1'in anlatımı anlamlı düzeyde artmamış olsa da, baskılayıcısı olan Tup11'in anlatımının düşmüş olması bu bulguyu desteklemektedir (Asada ve diğ., 2015). Bu koşullar altında fermentasyon yerine solunumun tercih edildiği, mitokondrinin elektron transport sisteminde yer alan elemanlardan biri olan Cox4'ün anlatımının artmış olmasıyla ve artan oksidatif fosforilasyon sebebiyle ROT oluşumunu giden Sod1 ve Ctt1 enzimlerini şifreleyen genlerin de anlatımlarının artmış olmasıyla anlaşılmaktadır (Şekil 4.16) (Plakunov ve Shelemekh, 2009). Ek olarak, yüksek glukoz değerlerinde hücre içi sinyal yolağında görevli cAMP katalizini sağlayan adenilat siklaz enzimini şifreleyen *cyr1* geninin de anlatımı düşmüştür (Hoffman ve Winston, 1991). Böylelikle hücreler Neely ve Hoffman'ın (2000) da açıkladığı gibi, stres yolağını aktifleştirerek aspartamın etkilerine karşı transkripsiyonel düzeyde bir düzenleme gerçekleştirmiş ve strese adapte olmayı başarabilmiştir. Üreme eğrisi, spot ekim ve CFU bulgularının da gösterdiği gibi canlılık düzeyinin ve üreme hızının değişmemesi bu durumu desteklemektedir. Aspartamın glukoz tüketim düzeyinde de anlamlı bir farka yol açmamış olması, stres yolağının indüklediği mitokondriyel solunum nedeniyle hücre içine alınan glukozun az miktarının enerji metabolizmasında yüksek verimle kullanıldığını ve geri kalanın da stres yanıtında kullanılmak üzere çeşitli moleküllerin oluşturulması için tüketildiğini düşündürmektedir (Weeks ve diğ., 2006).

Deneylerde kontrol olarak kullanılan *swi6Δ* hücreleri, replikasyon stresi yaratabilen takviyesiz zengin besiyerinde parentaline göre anlamlı derecede letalite göstermiştir. Hücre boyutunun parentale göre uzun olması hücre döngüsü sürecinde bir duraklama olduğuna işaret etmektedir (Bonatti ve diğ., 1972). Glukozu tüketme ve çoğalma hızının da düşük olması bu fenotipi desteklemektedir (Auth ve diğ., 2006). Buna ek olarak, bir hücre ölümü göstergesi olan hücre

içi ROT üretiminin artmış olması (Munoz ve diğ., 2012), *swi6Δ* hücrelerinde de tespit edilmiştir (Şekil 4.11). GZ-PZR verileri incelendiğinde *sod1* gen anlatımının da düşmüş olması bu bulguyla uyumludur. Ayrıca, floresan mikroskop görüntülerine göre seyrek de olsa nükleer yapıda anormallikler de bulunmaktadır. Öte yandan *swi6Δ* hücrelerine aspartam uygulandığında transkripsiyonel düzeyde anlamlı sonuçlar elde edilememiştir. Bu durum, ya hücreler ölmekte olduğundan etki yanıtının perdelendiğine ya da aspartama karşı stres yanıtının Swi6 bağımlı olduğuna işaret etmektedir. Ek olarak, hücre boyutu açısından yapılan istatistiki analizlere göre aspartam ile Swi6 arasında bir ilişki olduğu da saptanmıştır.

Tüm veriler bir araya getirildiğinde *S. pombe* için Swi6 yokluğunun ciddi sonuçlara yol açtığı görülmektedir. Fakat parental ırka aspartam uygulandığında meydana gelen *swi6* anlatımı düşüşü, yukarıda belirtilen ciddi sonuçları doğuracak kadar etkili olamamıştır. Böylece uygulanan koşullar altında aspartam etkisinin kanser oluşumuna katkı sağlayabileceği, ancak oluşumda tek başına yeterli olamayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd-Elfatah, A.A.M., Ghaly, I.S., Hanafy, S.M., 2012, Cytotoxic effects of aspartame (diet sweet) on the histological and genetic structures of female albino rats and their offspring, *Pak J Biol Sci*, 15, 904-918.
- Albert, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson J.D., 1994, *Molecular Biology of the Cell*, 3rd ed., Garland Publishing, New York, USA.
- Allis, C.D., Jenuwein, T., 2016, The molecular hallmarks of epigenetic control, *Nat. Rev. Genet*, 17, 487–500.
- Allshire, R.C., Nimmo, E.R., Ekwall, K., Cranston, G., 1995, Mutations derepressing silent domains within fission yeast centromeres disrupt chromosome segregation, *Genes Dev*, 9, 218– 233.
- Andreatta, M.M., Munoz, S.E., Lantieri, M.J., Eynard, A.R., Navarro, A., 2008, Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in Cordoba, Argentina, *Prev Med*, 47, 136-139.
- Asada, R., Takemata, N., Hoffman, C.S., Ohta, K., Hirota, K., 2015, Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor, *Mol Cell Biol*, 35 (5), 847-855.
- Auth, T, Kunkel, E., Grummt, F., 2016, Interaction between HP1 α and replication proteins in mammalian cells, *Experimental Cell Research*, 312, 3349-3359.
- Bandyopadhyay, A., Ghosha, S., Mukherjee, A., 2008, Genotoxic testing of low-calorie sweeteners: aspartame, acesulfam-K, and saccharin, *Drug Chem Toxicol*, 31, 447-457.
- Barnett, J.A., 2007, A history of research on yeasts 10: foundations of yeast genetics, *Yeast*, 24, 799–845.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F., Cullin, C., 1993, A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, 21 (14), 3329-3330.
- Beebe, S.J., Corbin, J.D., 1986, *Cyclic nucleotide protein kinases*, The enzymes, In: Boyer, P.D. ed.), 17, Academic Press, New York, USA, 43-111.
- Bertram, J.S., 2001, The molecular biology of cancer, *Molecular Aspects of Medicine*, 21, 167-223.
- Bonatti, S., Simili, M., Abbondandola, A., 1972, Isolation of temperature sensitive mutants of *Schizosaccharomyces pombe*, *J. Bact*, 109, 484-491.
- Borthwick, A.D., 2012, Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medical chemistry, and bioactive natural products, *Chemical Reviews*, 112 (7), 3641-3716.

- Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., Allis, C.D., 1996, Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation, *Cell*, 84, 843–851
- Budavari, S., 1989, *Aspartame*, The Merck Index, In: Rahway, N.J. (ed.), 861, Merck & Co, New Jersey, USA, 859.
- Burhans, W.C., Weinberger, M., Marchetti, M.A., Ramachandran, L., D'Urso, G., Huberman, J.A. 2003, Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mut. Res*, 532, 227-243.
- Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I., Wursch, P., 1974, The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe* *Journal of General Microbiology*, 81, 199–206.
- Butchko, H.H., Stargel, W.W., Comer, C.P., Mayhew, D.A., Benninger, C., Blackburn, G.L., 2002, Precilical safety evaluation of aspartame, *Regul Toxicol Pharmacol*, 35, 7-12.
- Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., Fitzgerald, P.C., Grewal, S.I., 2005, Comprehensive analysis of heterochromatin and RNA, mediated epigenetic control of the fission yeast genome, *Nat Genet*, 37 (8), 809-819.
- Chandel, N.S., 2015, Evolution of mitochondria as signaling organelles. *Cell Metab*, 22, 204–206.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., Bahler, J., 2003, Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*, 14, 214–229.
- Chen, E.S., Zhang, K., Nicolas, E., Cam, H.P., Zofall, M., Grewal, S.I., 2008, Cell cycle control of centromeric repeat transcription and heterochromatin assembly, *Nature*, 451, 734-737.
- Cheutin, T.I., Gorski, S.A., May, K.M., Singh, P.B., Mitseli, T., 2014, In vivo Dynamics of swi6 in yeast: evidence for a stochastic model of heterochromatin, *Molecular and Cellular Biology*, 24 (8), 3157-3167.
- Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G.D., Bonnefoy, N., 2007, Studying mitochondria in an attractive model: *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods Mol Biol*, 372, 91–105.
- Degols, G., Shiozaki, K., Russell, P., 1996, Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*, *Mol. Cell. Biol*, 16, 2870–2877.
- Dialynas, G.K., Vitalini, M.W., Wallrath, L.L., 2008, Linking heterochromatin protein 1 (HP1) to cancer progression, *Mutat Res*, 647 (1-2), 13-20.
- Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G., 1987, Protein serine/threonine kinases. *Annu. Rev. Biochem*, 56, 567-613.
- Eissenberg, J.C., Elgin, S.C., 2000, The HP1 protein family: getting a grip on chromatin, *Curr Opin Genet Dev*, 15, 407-410.

- Ekwall, K., Javerzat, J.P., Lorentz, A., Schmidt, H., Cranston, G., Allshire, R., 1995, The Chromodomain Protein Swi6: A Key Component at Fission Yeast Centromeres, *Science*, 269, 1429-1431.
- Enoch, T., Carr, A.M., Nurse, P., 1992, Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication, *Genes & Dev*, 6, 2035-2046.
- Esteller, M., 2008, Epigenetics in cancer, *N. Engl. J. Med*, 358, 1148–1159.
- Feinberg, A.P., Koldobskiy, M.A., Göndör, A., 2016, Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression, *Nat. Rev. Genet*, 17, 284–299.
- Flores, C.L., Rodriguez, C., Petit, T., Gancedo, C., 2000, Carbohydrate and energyyielding metabolism in non-conventional yeasts, *FEMS Microbiol Rev*, 24, 507–529.
- Forsburg, S.L., 2005, The yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*: models for cell biology research, *Gravit Space Biol*, 18 (2), 3–10.
- Garrett, C.T., 1986, Oncogenes, *Clinica Chimica Acta*, 156 (1), 1–40.
- Gebara, J.S., Querol, C.B., Gebara, M., Castro-Prado M., 2003, Mitotic segregation induced by edulcorant l-aspartyl-l-phenylalanine-metyl-ester (aspartame) in diploid cells of *Aspergillus nidulans*, *Biol Sci*, 25, 203-206.
- Gilman, A.G., 1984, G proteins and dual control of adenylate cyclase, *Cell*, 36, 577-579.
- Goldberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E., 2007, Epigenetics: A Landscape Takes Shape, *Cell*, 128 (4), 635-638.
- Gombos, K., Varjas, T., Orsos, Z., Polyak, E., Peredi, J., Varga, Z., Nowrasteh, G., Tettinger, A., Mucsi, G., Ember, I., 2007, The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions, *in vivo*, 21, 89-92.
- Gutz, H., Doe, F.J., 1973, Two different h⁺ mating types in *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics*, 74, 563–569.
- Herman, J.G., Baylin, S.B., 2003, Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, *N. Engl. J. Med*, 349, 2042–2054.
- Heslot, H., Goffeau, A., Louis, C., 1970, Respiratory metabolism of a "petite negative" yeast *Schizosaccharomyces pombe* 972 h, *J Bacteriol*, 104, 473–481.
- Higuchi, T., Watanabe, Y., Yamamoto, M., 2002, Protein kinase A regulates sexual development and gluconeogenesis through phosphorylation of the Zn finger transcriptional activator Rst2p in fission yeast, *Mol Cell Biol* 2002, 22, 1–11.
- Hoffman C.S., Winston, F., 1991, Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* fbpl gene occurs by a cAMP signaling pathway, *Genes & Development*, 5, 561-571.

- Huang, Z., Cai, L., Tu, B.P., 2015 Dietary control of chromatin. *Curr Opin Cell Biol*, 34, 69–74.
- Idiris, A., Bi, K., Tohda, H., Kumagai, H., Giga-Hama Y., 2006, Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins, *Yeast*, 23, 83–99.
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T., Yamamoto, M., 1992, Characterization of a fission yeast gene, *gpa2*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition, *Genes Dev*, 6, 2455–2462.
- Kamath, S., Vijaynarayana, K., Prashanth-Shetty, D., Shetty, P., 2010, Evaluation of genotoxic potential of aspartame, *Pharmacologyonline*, 1, 753-769.
- Kashanian, S., Khodaei, M.M., Kheiridoosh, F., 2013, In vitro DNA binding studies of aspartame, an artificial sweetener, *J Photochem Photobiol B Biol*, 120, 104-110.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A., Beach, D., 1988, Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast, *EMBO J*, 7 (5), 1537–1547.
- Kim, E.K., Choi, E.J., 2010 Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases, *Biochim Biophys Acta*, 1802, 396–405.
- Kirkland, D., Gatehouse, D., 2015, Aspartame: A review of genotoxicity data, *Food and Chemical Toxicology*, 84, 161-168.
- Kirschmann D.A., Lininger, R.A., Gardner, L.M.G., Seftor, E.A., Odero, V.A., Ainsztein, A.M., Earnshaw, W.C., Wallrath, L.L., Hendrix, M.J.C., 2000, Down-regulation of HP1Hs α expression is associated with the metastatic phenotype in breast cancer, *Cancer Res*, 60 (13), 3359-3363.
- Klein, T., Heinzle, E., Schneider, K., 2013, Metabolic fluxes in *Schizosaccharomyces pombe* grown on glucose and mixtures of glycerol and acetate, *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 5013–5026.
- Kloc, A., Zaratiegui, M., Nora, E., Martienssen, R., 2008, RNA interference guides histone modification during the S phase of chromosomal replication, *Curr Biol*, 18, 490-495.
- Kornberg, R.D., 1974, Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184, 868–871.
- Landry, S., Hoffman, C.S., 2001, The *git5* G β and *git11* G γ form an atypical G $\beta\gamma$ dimer acting in the fission yeast glucose/cAMP pathway, *Genetics*, 157, 1159–1168.
- Landry, S., Pettit, M.T., Apolinario, E., Hoffman, C.S., 2000, The fission yeast *git5* gene encodes a G β subunit required for glucose-triggered adenylate cyclase activation, *Genetics*, 154, 1463–1471.
- Langston, L.D., Symington, L.S., 2004, Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions, *PNAS*, 101 (43), 15392-15397.

- Lawrence, M.S., Stojanov, P., Mermel, C.H., Robinson, J.T., Garraway L.A., Golub, T.R., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Lander, E.S., Getz, G., 2014, Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types, *Nature*, 505, 495–501.
- Leupold, U., 1950, Die Verebung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*, *CR Lab Carlsberg Ser Physiol*, 24, 381–475.
- Levine, A.J., 1993, The tumor suppressor genes, *Annual Review of Biochemistry*, 62, 623-651.
- Levitzki, A., 1988, From epinephrine to cyclic AMP. *Science*, 241, 800-806.
- Li, P.C., Chretien, L., Cote, J., Kelly, T.J., Forsburg, S.L., 2011, *S. pombe* replicarion proteinc cdc18 (cdc6) interacts with swi6 (HP1) heterochromatin protein, *Cell Cycle*, 10 (2), 323-336.
- Liesivuori, J., Savolainen, H., 1991, Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms, *Pharm and toxic*, 69, 157-163.
- Lock, A., Rutherford, K., Harris, M.A., Hayles, J., Oliver, S.G., Bähler, J., Wood, V., 2018, PomBase 2018: user-driven reimplementaion of the fission yeast database provides rapid and intuitive access to diverse, interconnected information, *Nucleic Acids Res*, (Database issue): gky961 Epub.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997, Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251–260.
- Luger, K., Richmond, T.J., 1998, The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 140–146.
- Lukasova, E., Koristek, Z., Falk, M., Kozubek, S., Grigoryev, S., Kozubek, M., Ondrej, V., Kroupova, I., 2005, Methylation of histones in myeloid leukemias as a potential marker of granulocyte abnormalities, *J Leukoc Biol*, 77, 100-111.
- Lunt, S.Y., Vander Heiden, M.G., 2011, Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 27, 441–464.
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., Cansado, J., 2004, A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Biol Chem*, 279, 41594–41602.
- Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R., Williams, G.M., 2007, Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations and toxicological and epidemiological studies, *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 629 – 727.
- Malecki, M., Bitton, D.A., Rodríguez-López, M., Rallis, C., Calavia, N.G., Smith, G.C., Bähler, J., 2016, Functional and regulatory profiling of energy metabolism in fission yeast, *Genome Biol*, 17 (1), 240.

- Maloney, A., Clarke, P.A., Naaby-Hansen, S., Stein, R., Koopman J.O., Akpan, A., Yang, A., Zvelebil, M., Cramer, R., Stimson, L., Aherne, W., Banerji, U., Judson, I., Sharp, S., Powers, M., Debilly, E., Salmons, J., Walton, M., Burlingame, A., Waterfield, M., Workmann, P., 2007, Gene and protein expression profiling of human ovarian cancer cells treated with the heat shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, *Cancer Res*, 67, 3239-3253.
- Margueron, R., Reinberg, D., 2010, Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information, *Nat. Rev. Genet*, 11, 285-296.
- Martinho, R.G., Lindsay, H.D., Flaggs, G., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Carr, A.M., Bentley, N.J., 1998, Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses, *The EMBO Journal*, 17 (24), 7239-7249.
- McDowall, M.D., Harris, M.A., Lock, A., Rutherford, K., Staines, D.M., Bähler, J., Kersey, P.J., Oliver, S.G., Wood, V., 2015, PomBase 2015: updates to the fission yeast database. *Nucleic Acids Res*, 43 (Database issue), D656-D661.
- Millar, J.B., Buck, V., Wilkinson, M.G., 1995, Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast, *Genes Dev*, 9, 2117-2130.
- Molenaar, D., van Berlo, R., de Ridder, D., Teusink, B., 2009, Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics, *Mol Syst Biol*, 5, 323.
- Molinary, S., 1978, *SC-18862 Aspartame: An evaluation of mutagenic potential employing the ames/salmonella microsome assay*. Safety Assessment Project No: 1377. Department of Product Safety Assessment. Searle Laboratories, Illinois, USA.
- Monte, W., 1984, Aspartame: Methanol and public health, *J Appl Nutr*, 36, 42-54.
- Motamedi, M.R., Hong, E.E., Li, X., Gerber, S., Denison, C., Gygi, S., Moazed, D., 2008, HP1 proteins form distinct complexes and mediate heterochromatic gene silencing by nonoverlapping mechanisms, *Molecular Cell*, 32 (6), 778-790.
- Munoz, A.J., Wanichthanarak, K., Meza, E., Petranovic, D., 2012, Systems biology of yeast cell death, *FEMS Yeast Res* 12, 249-265.
- Murakami, H., Okayama, H., 1995, A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase, *Nature*, 374 (6525), 817-9.
- Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., Grewal, S.I., 2001, Role of histone H3 lysine methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly, *Science*, 292, 110-113.
- Neely, L.A., Hoffman, C.S., 2000, Protein kinase A and mitogen-activated protein kinase pathways antagonistically regulate fission yeast *fbp1* transcription by employing different modes of action at two upstream activation sites, *Mol Cell Biol*, 20 (17), 6426-6434.

- Nielsen, A.L., Sanchez, C., Ichinose, H., Cervino, M., Lerouge, T., Chambon, P., Losson, R., 2002, Selective interaction between the chromatin-remodeling factor BRG1 and the heterochromatin-associated protein HP1 α , *EMBO J*, 21, 5797-5806.
- Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I., Watanabe, Y., 2001, Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by swi6/HP1 in fission yeast, *Nature Cell Biology*, 4, 89-93.
- Norwood, L.E., Gradea, S.K., Cryderman, D.E., Hines, K.A., Furiasea, N., Toroa, R., Lia, Y., Dhasarathy, A., Kladde, M.P., Hendrix, M.J.C., Kirschmann, D.A., Wallrath L.L., 2004, Conserved properties of HP1Hsa, *Gene*, 336, 37-46.
- Nurse, P., Thuriaux, P., Nasmyth, K., 1976 Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Molecular and General Genetics*, 146, 167-178.
- Olney, J.W., Farber, N.B., Spitznagel, E., Robins, L.N., 1996, Increasing brain tumor rates: is there a link to aspartame?, *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 1115-1153.
- Pandurangan, M., Enkhtaivan, G., Mistry, B., Chandrasekaran, M., Noorzai, R., Kim, D.H., 2015, Investigation of role of aspartame on apoptosis process in HeLa cells, *Saudi Journal of Biological Sciences*, doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.001.
- Pérez, P., Cansado, J., 2010, Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast, *Curr Protein Pept Sci*, 11, 680-692.
- Pidoux, A.L., Uzawa, S., Perry, P.E., Cande, W.Z., Allshire R.C., 2000, Live analysis of lagging chromosomes during anaphase and their effect on spindle elongation rate in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 113, 4177-4191.
- Plakunov, V.K., Shelemekh, O.V., 2009, Mechanisms of Oxygen Regulation in Microorganisms, *Microbiology*, 78 (5), 535-546.
- Pomeroy, S.L., Tamayo, P., Gaasenbeek, M., Sturla, L.M., Angelo, M., McLaughlin, M.E., Kim, J.Y., Goumnerova, L.C., Black, P.M., Lau, C., Allen, J.C., Zagzag, D., Olson, J.M., Curran, T., Wetmore, C., Biegel J.A., Poggio, T., Mukherjee, S., Rifkin, R., Califano, A., Stolovitzky, G., Louis D.N., Mesirov, J.P., Lander, E.S., Golub, T.R., 2002, Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression, *Nature*, 415, 436-442.
- Popova, E.Y., Calxton, D.F., Lukasova, E., Bird, P.I., Grigoryev, S.A., 2006, Epigenetic heterochromatin markers distinguish terminally differentiated leukocytes from incompletely differentiated leukemia cells in human blood, *Exp Hematol*, 34, 453-462.
- Ranney, R.E., Opperman, J.A., Maldoon, E., McMahon, F.G., 1976, Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans, *Toxicol Environ Health*, 2, 441-451.
- Rencuzogulları, E., Tuylu, B.A., Topaktas, M., İla, H.B., Kayraldız, A., Arslan, M., Budak-Diler, S., 2004, Genotoxicity of aspartame, *Drug Chem Toxicol*, 27, 257-268.

- Reno, F.E., Bowles, C.A., 1972, *SC-19192: An evaluation of mutagenic potential employing the in vivo cytogenetics method in the rat*, Hazelton Laboratories Inc, Vienna, VA.
- Richmond, T.J., Finch, J.T., Rushton, B., Rhodes, D., Klug, A., 1984, Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, 311, 532–537.
- Robinow, C.F., 1977, The number of chromosomes in *S. pombe*: light microscopy of stained preparations. *Genetics*, 87, 491–497.
- Rodriguez, C., Borgel, J., Court, F., Cathala, G., Forné, T., Piette, J., 2010, CTCF is a DNA methylationsensitive positive regulator of the INK/ARF locus, *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 392, 129–134.
- Roesler, W.J., Vandenbark, G.R., Hanson, R.W., 1988, Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription, *J. Biol. Chem*, 263, 9063-9066.
- Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M., 2001, Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells, *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (5), 310-317.
- Rothstein, R.J., One-step gene disruption in yeast, 1983, *Methods in Enzymology*, 101, 202-211.
- Roux, A.E., Leroux, A., Alaamery, M.A., Hoffman, C.S., Chartrand, P., Ferbeyre, G., Rokeach, L.A., 2009, Pro-aging effects of glucose signaling through a G protein-coupled glucose receptor in fission yeast, *PLoS Genet*, e1000408.
- Ruginis, T., Taglia, L., Matusiak, D., Lee, B.S., Benya, R.V., 2006, Consequence of gastrin-releasing peptide receptor activation in human colon cancer cell line: a proteomic approach, *J Proteome Res*, 5, 1460-1468.
- Samejima, I., Mackie, S., Fantes, P.A., 1997, Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J*, 16, 6162–6170.
- Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R., Fantes, P.A., 1998, The fission yeast mitotic regulator win11 encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates Wis1 MAP kinase kinase in response to high osmolarity, *Mol. Biol. Cell*, 9, 2325–2335.
- Sargentini, N.J., Smith K.C., 1986, Mutagenesis by normal metabolites in *Escherichia coli*: phenylalanine mutagenesis is dependent on error-prone DNA repair, *Mutat Res*, 161, 113-118.
- Saxonov, S., Berg, P., Brutlag, D.L., 2006, A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters, *PNAS*, 103, 1412–1417.
- Schernhammer, E.S., Bertrand, K.A., Birmann, B.M., Sampson, L., Willett, W.C., Feskanich, D., 2012, Consumption of artificial sweetener and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women, *Am J Clin Nutr*, 96, 1419-1428.

- Shephard, S., Meier, I., Lutz, W., 1991, *Alkylating potency of nitrosated amino-acids and peptides*, Relevance to Human Cancer of N-nitroso Compounds: Tobacco Smoke and Mycotoxins, In: O'Neill, I.K., Chen, J., Bartsch, H., (ed.), IARC Scientific Publications, Lyon, France, ISBN: 978-92-832-2105-0, 383-397.
- Shephard, S., Wakabayashi, K., Nagao, M., 1993, Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation, *Food Chem Toxicol*, 31, 323-329.
- Shiozaki, K., Russell, P., 1995, Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast, *Nature*, 378, 739–743.
- Shiozaki, K., Russell, P., 1996, Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast, *Genes Dev*, 10, 2276–2288.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., Russell, P., 1997, Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade, *Mol Biol Cell*, 8, 409–419.
- Siragusa, R.J., Cerda, J.J., Baig, M.M., Burgin, C.W., Robbins, F.L., 1988, Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria, *Am J Clin Nutr*, 47, 848-851.
- Soffritti, M., Belpoggi, F., Degli-Esposti, D., Lambertini, L., Tibaldi, E., Rigano, A., 2006, First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats, *Environ Health Perspect*, 114, 379-385.
- Soffritti, M., Padovani, M., Tibaldi, E., Falcioni, L., Manservigi, F., Belboggi, F., 2014, The carcinogenic effects of aspartame: The urgent need for regulatory re-evaluation, *American Journal of Industrial Medicine*, 57, 383-397.
- Steger, D.J., Workman, J.L., 1996, Remodeling chromatin structures for transcription: What happens to the histones?, *BioEssays*, 18, 875–884.
- Stettler, S., Warbrick, E., Prochnik, S., Mackie, S., Fantes, P., 1996, The wis1 signal transduction pathway is required for expression of cAMP-repressed genes in fission yeast, *J. Cell Sci*, 109, 1927–1935.
- Suvà, M.L., Riggi, N., Bernstein, B.E., 2013, Epigenetic reprogramming in cancer. *Science*, 339, 1567–1570.
- Takeda, K., Starzynski, C., Mori, A., Yanagida, M., 2015, The critical glucose concentration for respiration-independent proliferation of fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe. Mitochondrion*, 22, 91–95.
- Talbot, J.M., Fisher, K.D., 1978, The need for special foods and sugar substitutes by individuals with diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 1, 231-240.

- Trefz, F., Sonnevile, L., Matthis, P., Benninger, C., Lanz-Englert, B., Bickel, H., 1994, Neuropsychological biochemical investigations in heterozygotes for phenylketonuria during ingestion of high dose aspartame (a sweetener containing phenylalanine), *Human Genetics*, 93 (4), 369-374.
- Van Dijken, J.P., Weusthuis, R.A., Peonk, J.T., 1993, Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts, *Antonie van Leeuwenhoek*, 63, 343–352.
- Walker, G., 1998, *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons, UK.
- Wallace, D.C., Fan, W., 2010, Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, 10, 12–31.
- Wang, G., Ma, A., Chow, C.M., Horsley, D., Brown, N.R., Cowell, I.G., Singh, P.B., 2000, Conservation of heterochromatin protein 1 function, *Mol Cell Biol*, 20, 6970-6983.
- Wasenius, V.M., Hemmer, S., Kettunen, E., Knuutila, S., Franssila, K., Joensuu, H., 2003, Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study, *Clin Cancer Res*, 9, 68-75.
- Weeks, M.E., Sinclair, J., Butt, A., Chung, Y.L., Worthington, J.L., Wilkinson, C.R.M., Griffiths, J., Jones, N., Waterfield, M.D., Timms, J.F., 2006, A parallel proteomic and metabolomic analysis of the hydrogen peroxide and Sty1p-dependent stress response in *Schizosaccharomyces pombe*, *Proteomics*, 6 (9), 2772–2796.
- Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Shieh, J.C., Toda, T., Millar, J.B., Jones, N., 1996, The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast, *Genes Dev*, 10, 2289–2301.
- Wixon, J., 2002, Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, the fission yeast. *Comp Funct Genom*, 3, 194–204.
- Yanagida, M., 2009, Cellular quiescence: are controlling genes conserved?, *Trends Cell Biol*, 19, 705–715.
- Yona, A.H., Manor, Y.S., Herbst, R.H., Romano, G.H., Mitchell, A., Kupiec, M., Pilpel, Y., Dahan, O., 2012, Chromosomal duplication is a transient evolutionary solution to stress, *PNAS* 109 (51), 21010-21015.
- Zuin, A., Gabrielli, N., Calvo, I.A., Garcia-Santamarina, S., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Hayles, J., Ayte, J., Hidalgo, E., 2008, Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast, *PLoS One*, 3 (7), e2842.

EKLER

EK-A. BESİYERLERİ

A1		A2	
H ₃ BO ₃	500 mg	KH ₂ PO ₄	10 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	40 mg	MgSO ₄ .7H ₂ O	5 g
KI	100 mg	NaCl	1 g
FeCl ₃ .6H ₂ O	200 mg	CaCl ₂ .6H ₂ O	1.5 g
MnSO ₄ .4H ₂ O	530 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄	50 g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	195 mg	A1	100 mL
ZnSO ₄ .7H ₂ O	400 mg	dH ₂ O	1000 mL
dH ₂ O	1000 mL		

3a		3b	
Kalsiyum Pantotenat	100 mg	Biotin	1 mg
Nikotinik Asit	1 g	%50 etil alkol	100 mL
Mezoinositol	1 g		
dH ₂ O	100 mL		

Maddeler yazım sırasına göre suya eklenip çözülür ve üzeri alüminyum folyo ile sarılarak +4°C’de saklanır.

MMA (<i>S. pombe</i> ırk seçimi)	
A2	100 mL
3a	1 mL
3b	1 mL
Glukoz	10 g
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1 g
dH ₂ O	900 mL

Metabolitler (10 mg/mL)

Adenin, Urasil veya Lösin	200 mg
dH ₂ O	20 mL

121°C, 1 atm'de 15 dk boyunca sterilizasyondan sonra her bir metabolit için son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde MMA'ya uygun kombinasyonlarda (MMA+A, MMA+U, MMA+L, MMA+A+U, MMA+A+L, MMA+A+U+L) eklenir ve petrilere dökülür.

S. pombe* üretimi*YEL**

Maya Özütü	5 g
Glukoz	30 g
dH ₂ O	1000 mL

Aspartamlı koşullarda *S. pombe* üretimi**YEL+APM**

YEL besiyeri ile aynıdır. Sadece sterilizasyondan sonra son konsantrasyon 1 mg/ml olacak şekilde aspartam stok solüsyonundan eklenir.

Spot Ekim ve CFU yöntemleri**YEA**

YEL besiyeri ile aynıdır. Sadece 20 g agar ilave edilir.

EK-B. ÇÖZELTİLER**Elektroforez**

10xTAE (pH:8.0)		Agaroz Jel (%1)	
Tris	400 mM	Agaroz Tip II	0.4 g
Glasiyel Asetik Asit	%1.2	10x TAE	40 mL
EDTA	10 mM	EtBr (0.3 µg/mL)	3 µl

6X Yükleme Tamponu

Tris-HCl (pH:7.6)	10 mM
Bromofenol Mavisi	% 0,03
Ksilen Siyanol FF	% 0,03
Gliserol	% 60
EDTA	60 mM

Aspartam Solüsyonu (10 mg/mL)

Aspartam (TCI)	100 mg
dH ₂ O	10 mL

Distile suda çözdürüldükten sonra “MF-Millipore” filtreden (0.22 µm) geçirilerek steril edilir ve oda sıcaklığında saklanır.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Beste BAYRAK
Doğum Yeri	İzmit
Doğum Tarihi	09.08.1994
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0 540 043 07 76
E-Posta Adresi	bayrakbst@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	23.05.2016

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

Doktora	
Üniversite	
Enstitü Adı	
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	