



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



DOKTORA TEZİ

**SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE'NİN ALZHEİMER
HASTALIĞI İÇİN MODEL ORGANİZMA OLARAK
GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILMAZER

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER**

Temmuz, 2021

İSTANBUL

Bu alışma, 1.07.2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegöl TOPAL SARIKAYA
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Cenk KİĞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

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 abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2017-24911 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

Yilmazer, M., Uzuner, S.K., 2020, Heterologous expression of tau protein in fission yeast as a disease model, *Fresenius Environmental Bulletin*, 29(10), 9218-9225.

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım esnasında bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan çok değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER'e en içten dileklerimle teşekkür ederim. Tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Bedia PALABIYIK'a çok teşekkür ederim. Eğitim hayatımda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün tüm değerli Öğretim Üyelerine ve Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Western Blot çalışmalarım sırasında bilgi ve yardımlarıyla bana katkıda bulunan, başta Prof. Dr. Evren ÖNAY UÇAR olmak üzere doktora öğrencileri Aslıhan Şengelen ve Yunus AKSÜT'e teşekkür ederim.

Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Araştırma Laboratuvarı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak tüm yaşamım boyunca her zaman yanımda olan ve beni destekleyen, sevgilerini her daim hissettiğim aileme sonsuz teşekkürler.

Temmuz 2021

Merve YILMAZER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	ix
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xvi
ÖZET	xx
SUMMARY	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR	3
2.1.1. Alzheimer Hastalığı.....	3
2.2. MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİNLER.....	4
2.2.1. Maya Türü Organizmalarda Mikrotübül İlişkili Proteinler	5
2.3. MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİN TAU	5
2.4. HÜCRELERDE PROTEİN YIKIMI	9
2.5. MAYALARIN NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA MODEL OLARAK KULLANILMASI.....	10
2.5.1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	12
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	14
3.1. ORGANİZMA	14
3.2. KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER	14
3.3. <i>S. POMBE</i> HÜCRELERİNİN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI.....	20
3.4. <i>S. POMBE</i> HÜCRELERİNİN GENOTİPİNİN KONTROL EDİLMESİ	21
3.4.1. <i>S. pombe</i> 'den Genomik DNA İzolasyonu	21
3.4.2. <i>Gua1ura4h</i> Mutant Irkının Genomik Düzeyde Kontrolü	21
3.5. <i>S.POMBE</i> HÜCRELERİNDE ÜREMENİN İZLENMESİ	22
3.6. <i>PSGP572</i> PLAZMİDİNİN <i>E. COLİ</i> 'DE ÇOĞALTILMASI.....	22
3.6.1. Süper Yeterli Hücre Eldesi	23
3.6.2. <i>pSGP572</i> Plazmidinin <i>E.coli</i> 'ye Transformasyonu.....	23
3.7. <i>E. COLİ</i> 'DEN <i>PSGP572</i> PLAZMİDİNİN İZOLASYONU VE KONTROLÜ	23

3.7.1. <i>pSGP572</i> Plazmidi İçeren <i>E. coli DH5α</i> Hücrelerinin Üretilmesi ve İzolasyonu.....	23
İÇİNDEKİLER	
3.7.2. <i>pSGP572</i> Plazmidinin Miktar ve Saflık Belirlenmesi.....	24
3.7.3. <i>pSGP572</i> Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi.....	24
3.7.4. <i>pSGP572</i> Plazmidinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi.....	25
3.8. İNSAN MAPT GEN DİZİLERİNİN ÇOĞALTILMASI	26
3.8.1. İnsan MAPT Genine Uygun Primerlerin Tasarlanması	26
3.8.2. İnsan MAPT Genini İçeren <i>pcDNA3.1*/C-(K)DYK</i> Plazmidinin Çoğaltılması	26
3.8.3. İnsan MAPT Gen Dizisinin PCR ile Çoğaltılması	26
3.9. İNSAN MAPT GENİ İÇEREN <i>PSGP572</i> PLAZMİDİNİN HAZIRLANMASI	27
3.9.1. MAPT Geninin <i>pSGP572</i> Plazmidine Ligasyonu	27
3.9.2. Transformant <i>E.coli</i> Kolonilerinin PCR ile Kontrol Edilmesi	29
3.9.3. Rekombinant Plazmidin Çoğaltılması ve İzolasyonu.....	29
3.9.4. Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kontrol Edilmesi	29
3.9.5. MAPT Geni İçeren <i>pSGP572</i> Plazmidinin Dizileme ile Kontrol Edilmesi	30
3.10. <i>S. POMBE</i> 'YE <i>PSGP572</i> + <i>MAPT</i> PLAZMİDİNİN TRANSFORMASYONU.....	30
3.10.1. <i>pSGP572</i> + <i>mapt</i> Plazmidlerinin Lityum Asetat Yöntemi ile Transformasyonu	30
3.10.2. Pozitif Transformantların Seçici Besiyerlerinde Kontrol Edilmesi.....	31
3.10.2.1. <i>S. pombe</i> Transformantların Koloni PCR ile Kontrolü	31
3.10.3. Tiamin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	31
3.10.4. Transformantlardan Plazmid Geri İzolasyonu.....	31
3.11. TRANSFORMANT HÜCRELERİN FLORESAN MİKROSKOPTA GÖRÜNTÜLENMESİ	32
3.11.1. Hücrelerin Fiksasyonu.....	32
3.11.2. Hücrelerin Floresan Mikroskopta İncelenmesi.....	33
3.12. ELDE EDİLEN TRANSFORMANTLARIN FARKLI GLUKOZ KOŞULLARINDA ÜRETİLMESİ.....	33
3.13. FARKLI KOŞULLARDA ÜRETİLEN HÜCRELERİN GEN ANLATIM DÜZEYİNDE ANALİZLERİ	33
3.13.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	33
3.13.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	35
3.13.2.1. <i>GZ-PCR</i> Primer Tasarımı.....	35
3.13.2.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
3.14. BİYOKİMYASAL ANALİZLER.....	37

İÇİNDEKİLER

3.14.1. İmmünolojik Saptama	37
3.14.1.1 Protein İzolasyonu	37
3.14.1.2 Protein Miktar Tayini	37
3.14.1.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
3.14.1.4. Proteinlerin Membrana Aktarımı, “Western Blot” Analizi.....	38
3.14.2. 20S Proteozomal Aktivitenin Ölçülmesi	39
3.14.2.1. “Lowry” Yöntemi ile Protein Miktar Tayini.....	39
3.14.3. Glukoz Tüketiminin Belirlenmesi	40
3.14.4. Hücre İçi Oksidasyonun Belirlenmesi.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. S. POMBE HÜCRELERİNİN GENOTİP KONTROLÜ.....	41
4.1.1. <i>Gua1ura4h⁻</i> Mutant Irkının PCR ile Kontrol Edilmesi	41
4.2. S.POMBE HÜCRELERİNDE ÜREMENİN İZLENMESİ	42
4.3. E. COLİ’DEN PSGP572 PLAZMİDİ İZOLASYONU VE KONTROLÜ	43
4.3.1. pSGP572 Plazmidinin E.coli’de Çoğaltılması	43
4.3.2. pSGP572 Plazmidinin E.coli’den İzolasyonu	44
4.3.3. pSGP572 Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi.....	44
4.4. MAPT GENİ İÇEREN PSGP572 PLAZMİDİNİN ELDE EDİLMESİ	45
4.4.1. MAPT Geninin Çoğaltılması.....	45
4.4.2. MAPT Geninin pSGP572 Plazmidine Ligasyonu	45
4.4.3. Ligasyon Ürünlerinin E.coli DH5α’ya Transformasyonu	46
4.4.4. MAPT Geni İçeren pSGP572 Plazmidinde Hedef Bölgenin Dizileme ile Kontrol Edilmesi.....	48
4.5. PSGP572+MAPT PLAZMİDİNİN S. POMBE HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU	48
4.5.1. Transformant Hücrelerin Seçici Besiyerinde Saptanması	49
4.5.1.1. Elde Edilen Transformantların Koloni PCR ile Kontrolü	49
4.5.2. Tiamin Konsantrasyonunun Belirlenmesi	51
4.5.3. Transformant S. pombe Hücrelerinden Plazmid Geri İzolasyonu	51
4.5.4. S. pombe Hücrelerinin Floresan Mikroskopta İncelenmesi.....	52
4.6. GEN ANLATIMI DÜZEYİNDE ANALİZLER	54
4.6.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi.....	54
4.6.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PCR) Analizi.....	55
4.7. BİYOKİMYASAL VE PROTEİN DÜZEYİNDE ANALİZLER	70
4.7.1. Protein İzolasyonu ve SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi	70

4.7.2. “Western Blot” Analiz Sonuçları	70
4.7.3. 20S Proteozomal Aktivitenin Ölçümü.....	72
İÇİNDEKİLER 4.7.5. Glukoz Tüketimi.....	74
4.7.6. Hücre İçi Oksidasyon Düzeyinin Belirlenmesi	75
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	78
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ	106



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Tau proteininin mikrotübül ile ilişkisi (Kolarova ve diğ., 2012).....	5
Şekil 2.2: Tau proteinine ait 6 izoform (Wang ve Mandelkow, 2016).	6
Şekil 2.3: a. Nöronların dendrit ve aksonlarındaki tau proteini anlatım seviyeleri; b. tau proteini yapısı (Scholz ve Mandelkov, 2014).....	7
Şekil 3.1: <i>pSGP572</i> plazmidinin restriksiyon haritası.	14
Şekil 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA markerı.	25
Şekil 4.1: Seçici besiyerinde <i>gua1ura4h⁻</i> mutant ırkının genotip kontrolü (MMA, MMA+Guanin, MMA+Urasil ve MMA+Urasil+Guanin besiyerinde <i>gua1ura4h⁻</i> hücrelerinin üremesi).....	41
Şekil 4.2: Konak ırkın <i>ura4</i> geni bakımından PCR ile genomik DNA kullanılmasıyla kontrolü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: <i>gua1ura4h⁻</i> genomik DNA'sı; 2: <i>972h⁻</i> genomik DNA'sı; 3: negatif kontrol).....	42
Şekil 4.3: Konak ırkın MAPT geni bakımından PCR ile genomik DNA kullanılmasıyla kontrolü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: <i>gua1ura4h⁻</i> genomik DNA'sı; 2: <i>972h⁻</i> genomik DNA'sı; 3: pozitif kontrol; 4: negatif kontrol).	42
Şekil 4.4: <i>gua1ura4h⁻</i> konak ırkı, <i>gua1ura4⁺mapt</i> ve <i>gua1ura4⁺pSGP572</i> transformant ırklarının EMM besiyerinde üreme grafiği (<i>gua1ura4h⁻</i> ırkının EMM+G+U; transformantların EMM+G besiyerinde üremesi).	43
Şekil 4.5: <i>pSGP572</i> plazmidinin süper yeterli <i>E.coli DH5α</i> hücrelerine transformasyonu sonrası ampisilin içeren LB besiyerinde üreyen transformant koloniler	44
Şekil 4.6: <i>pSGP572</i> plazmidinin restriksiyon endonükleazları ile kesiminin agaroz jel görüntüsü (M: 1 kb'lık DNA Ladder; a. <i>EcoRI</i> ; b. <i>EcoRI</i> + <i>NotI</i> ; c. <i>EcoRI</i> + <i>SalI</i> ; d. <i>EcoRI</i> + <i>BglII</i> ; e. <i>PstI</i> + <i>XhoI</i> ; f. <i>PstI</i> + <i>NotI</i> enzimiyle kesim).....	44
Şekil 4.7: İnsan MAPT geni PCR ürününün saflaştırma sonrası agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: PCR ürünü jelden geri kazanım örneği).	45
Şekil 4.8: Ligasyon öncesi geri kazanılan <i>SalI</i> ve <i>BamHI</i> restriksiyon endonükleazları ile kesilen MAPT geni PCR ürünü ve <i>XhoI</i> ve <i>BglII</i> ile kesilen <i>pSGP572</i> plazmidinin agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: MAPT geni PCR ürünü; b: <i>pSGP572</i> plazmidi).	46
Şekil 4.9: Ligasyon ürününün <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu sonrasında ampisilinli LB besiyerinde üreyen 18 koloninin kalıp olarak kullanıldığı, MAPT genine özgü	

primerlerle gerçekleştirilen koloni PCR agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: 1.,2.,3. koloniler; 2: 4., 5., 6. koloniler; 3: 7., 8., 9. koloniler; 4: 10., 11., 12. koloniler; 5: 13., 14., 15. koloniler; 6: 16., 17., 18. koloniler; +: pozitif kontrol).	46
Şekil 4.10: <i>pSGP572+mapt</i> plazmidinin PCR ile doğrulanması (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pozitif kontrol; 2: <i>pSGP572+mapt</i> plazmidi; 3: negatif kontrol).....	47
Şekil 4.11: <i>pSGP572+mapt</i> plazmidinin <i>HindIII</i> ve <i>EcoRI</i> restriksiyon endonükleazıyla kesimi (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: <i>HindIII</i> ile; 2: <i>EcoRI</i> ile kesim).	47
Şekil 4.12: İleri primer ile dizileme sonrası elde edilen dizinin hedef dizi ile karşılaştırmasının BLAST analizi sonucu.	48
Şekil 4.13: Geri primer ile dizileme sonrası elde edilen dizinin hedef dizi ile karşılaştırmasının BLAST analizi sonucu.	48
Şekil 4.14: <i>pSGP572+mapt</i> plazmidi taşıyan <i>gua1ura4h⁻</i> transformantlarının sırasıyla MMA, MMA+G+U ve MMA+G seçici besiyerlerinde ekim sonuçları.	49
Şekil 4.15: <i>pSGP572</i> plazmidi içeren <i>gua1ura4h⁻</i> transformantlarının sırasıyla MMA+GU, MMA+G ve MMA seçici besiyerlerinde ekim sonuçları.	49
Şekil 4.16: Seçici besiyerinde seçilen kolonilerin MAPT genine uygun primerlerle gerçekleştirilen koloni PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: <i>gua1ura4h⁻</i> ; b: pMS-mapt kolonisi; c: pMS kolonisi; d: negatif kontrol; e: pozitif kontrol).....	50
Şekil 4.17: maptF/gfpR ve nmtF/maptR primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: <i>gua1ura4h⁻</i> ; 2: pMS-mapt; 3: <i>pSGP572+mapt</i> , pozitif kontrol; 4: nmtF/maptR primerlerle kalıpsız PCR sonucu, negatif kontrol; 5: <i>gua1ura4h⁻</i> ; 6: pMS-mapt; 7: <i>pSGP572+mapt</i> , pozitif kontrol; 8: maptF/gfpR primerlerle kalıpsız PCR sonucu, negatif kontrol).	50
Şekil 4.18: <i>pSGP572</i> ve <i>pSGP572+mapt</i> plazmidlerinin nmtF-gfpR primerleriyle PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: <i>pSGP572</i> ; 2: <i>pSGP572+mapt</i>).	50
Şekil 4.19: Transformant hücrelerin farklı konsantrasyonlarda tiamin içeren seçici besiyerine spot ekimi sonuçları (a: doğrudan ekim; b: 10 kat sulandırım; c: 10 ² kat sulandırım; d: 10 ³ kat sulandırım; e: 10 ⁴ kat sulandırım; f: 10 ⁵ kat sulandırım).	51
Şekil 4.20: Transformant pMS ve pMS-mapt <i>S. pombe</i> hücrelerinden plazmid geri izolasyonu sonrası <i>HindIII</i> restriksiyon endonükleazı ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pMS+ <i>HindIII</i> ; 2: pMS-mapt+ <i>HindIII</i>).	52
Şekil 4.21: Transformant pMS-mapt ve pMS <i>S. pombe</i> hücrelerinden plazmid geri izolasyonu sonrası MAPT genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1: Geri izole edilen	

<i>pSGP572</i> plazmid; 2: Geri izole edilen <i>pSGP572+mapt</i> plazmid; 3: pozitif kontrol; 4: Kalıpsız negatif kontrol).	52
Şekil 4.22: <i>Gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin 40X objektif kullanılarak floresan mikroskop altındaki görüntüleri (Bar boyutu: 20 µm).	53
Şekil 4.23: pMS-mapt hücrelerinin 100X objektif kullanılarak floresan mikroskobu altındaki ayrıntılı büyütülmüş görüntüsü (Bar boyutu: 5µm).	54
Şekil 4.24: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üretilmiş örneklerden RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (1,2,3: %0,5; 4,5,6: %3; 7,8,9: %5 konsantrasyonda glukoz içeren MML besiyerinde üretilmiş sırasıyla <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS).	54
Şekil 4.25: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üretilmiş örneklerle ait cDNA'ların agaroz jel görüntüsü (1,2,3: %0,5; 4,5,6: %3; 7,8,9: %5 konsantrasyonda glukoz içeren MML besiyerinde üretilmiş sırasıyla <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS).	55
Şekil 4.26: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre transformant ırklardaki <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,000***; 0,0024**; 0,0155*).	55
Şekil 4.27: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0013, 0,0032**)	56
Şekil 4.28: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0161*)	56
Şekil 4.29: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen <i>gua1ura4h⁻</i> hücrelerinin <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.	57
Şekil 4.30: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value: 0,0020**/0,0181*).	57
Şekil 4.31: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin <i>sod1</i> ve <i>ctt1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0005***; 0,0067**; 0,0329*).	58
Şekil 4.32: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre transformant ırklardaki <i>hvk2</i> ve <i>fbp1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.	58
Şekil 4.33: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>hvk2</i> ve <i>fbp1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0005***).	59
Şekil 4.34: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>hvk2</i> ve <i>fbp1</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0192*; <0,0001****)	59

Şekil 4.35: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen <i>gua1ura4h⁻</i> hücrelerinin <i>hxx2</i> ve <i>fbp1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value:0,0412*).	60
Şekil 4.36: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin <i>hxx2</i> ve <i>fbp1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0082**; 0,0210*).	60
Şekil 4.37: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin <i>hxx2</i> ve <i>fbp1</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0212*).	61
Şekil 4.38: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre transformant ırklardaki <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.	62
Şekil 4.39: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.	62
Şekil 4.40: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.	62
Şekil 4.41: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen <i>gua1ura4h⁻</i> hücrelerinin <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.	63
Şekil 4.42: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value<0,0001****).	64
Şekil 4.43: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin <i>ire1</i> ve <i>atg14</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value: 0,0072**; 0,0243*).	64
Şekil 4.44: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre transformant ırklardaki <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value:0,0011**; 0,0326*).	65
Şekil 4.45: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value:0,0001****; 0,0376*).	65
Şekil 4.46: <i>Gua1ura4h⁻</i> konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0248*).	66
Şekil 4.47: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen <i>gua1ura4h⁻</i> hücrelerinin <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.	67
Şekil 4.48: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.	68
Şekil 4.49: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin <i>gsk3</i> , <i>dis2</i> ve <i>ppa2</i> genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.	68

Şekil 4.50: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinde MAPT geninin anlatımı (P value:0,0008***).	69
Şekil 4.51: Farklı glukoz konsantrasyonlarında pMS-mapt transformantında pMS kontrol grubuna göre <i>gfp</i> gen anlatım düzeyi.	70
Şekil 4.52: Western blot sonuçları (A: <i>gua1ura4h⁻</i> ; 2: pMS-mapt; 3: pMS örneklerinden izole edilmiş protein örnekleri, S: Standart protein: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa).	71
Şekil 4.53: Farklı glukoz koşullarında üretilmiş pMS-mapt hücrelerinde tau proteini anlatımını gösteren Western blot analiz sonucu membran görüntüsü (I: %0,5, II: %3, III: %5 konsantrasyonunda glukoz içeren koşullarda üretilmiş pMS-mapt hücreleri).	71
Şekil 4.54: Lowry yöntemi sonucu BSA ile hazırlanmış konsantrasyonu bilinen örnekler kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği.	72
Şekil 4.55: %0,5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).	73
Şekil 4.56: %3 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0003 **).	73
Şekil 4.57: %5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0131*).	74
Şekil 4.58: Cayman Glucose Colorimetric Assay Kit standart grafiği.	74
Şekil 4.59: <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt, pMS ırklarının glukoz tüketimi.	75
Şekil 4.60: %0,5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0489*).	76
Şekil 4.61: %3 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).	76
Şekil 4.62: %5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş <i>gua1ura4h⁻</i> , pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).	77

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: İnsan hastalıkları ile ilişkili maya çalışmalarındaki temel gelişmeler (Porzoor ve Macreadie, 2013).	11
Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan organizmaların özellikleri.	14
Tablo 3.2: “Luria Bertani (LB)” besiyeri içeriği.	15
Tablo 3.3: “Super Optimal Broth (SOB)” besiyeri içeriği.	15
Tablo 3.4: “Yeast Extract Agar (YEA)” besiyeri içeriği.	16
Tablo 3.5: “Minimal Medium Agar (MMA)” besiyeri içeriği.	16
Tablo 3.6: “Yeast Nitrogen Base (YNB)” besiyeri içeriği.	17
Tablo 3.7: Tris-EDTA tamponu bileşenleri.	17
Tablo 3.8: TB bileşenleri.	17
Tablo 3.9: DNA parçalama tamponu bileşenleri.	17
Tablo 3.10: LiAc/EDTA tamponu bileşenleri.	18
Tablo 3.11: LiAc-PEG tamponu bileşenleri.	18
Tablo 3.12: PBS çözeltisi bileşenleri.	18
Tablo 3.13: Protein izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu bileşenleri.	18
Tablo 3.14: Lizis Tamponu bileşenleri.	18
Tablo 3.15: Alkali SDS solüsyonu bileşenleri.	18
Tablo 3.16: SDS-PAGE ayırma jeli ve yükleme jeli bileşenleri.	19
Tablo 3.17: Örnek uygulama tamponu bileşenleri.	19
Tablo 3.18: SDS-PAGE’de kullanılan tank tamponu bileşenleri.	19
Tablo 3.19: Proteinlerin membrana aktarımında kullanılan aktarım tamponu bileşenleri.	19
Tablo 3.20: 20S Proteozomal aktivite ölçümünde kullanılan parçalama solüsyonu bileşenleri.	20

Tablo 3.21: “Assay Buffer” bileşenleri.....	20
Tablo 3.22: <i>Ura4</i> genine ait primer dizileri.....	21
Tablo 3.23: <i>Ura4</i> geni çoğaltımında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.	22
Tablo 3.24: <i>Ura4</i> geni çoğaltımında kullanılan PCR döngüsü.....	22
Tablo 3.25: Restriksiyon endonükleazıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.	24
Tablo 3.26: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon içerikleri.	25
Tablo 3.27: MAPT genine ait primer dizileri.	26
Tablo 3.28: İnsan MAPT geni çoğaltımında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.....	27
Tablo 3.29: İnsan MAPT geni çoğaltımında PCR döngüsü.	27
Tablo 3.30: <i>pSGP572</i> plazmidi ve MAPT geni PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.	28
Tablo 3.31: Ligasyon reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.	29
Tablo 3.32: Restriksiyon endonükleazıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.	29
Tablo 3.33: <i>Gfp</i> genine ait geri ve <i>nmt</i> genine ait ileri primer dizileri.	31
Tablo 3.34: Kapama solüsyonu içeriği.	33
Tablo 3.35: RNA örneklerini cDNA’ya çevirirken kullanılan reaksiyon bileşenleri.	34
Tablo 3.36: RNA örneklerini cDNA’ya çevirirken kullanılan reaksiyon bileşenleri.	35
Tablo 3.37: GZ-PCR reaksiyonunda kullanılan primerlere ait diziler ve özellikleri.....	35
Tablo 3.38: GZ-PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.	36
Tablo 3.39: GZ-PCR koşulları.....	36

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
A	: Absorbans
Atm	: Atmosfer
bç	: Baz çifti
Ca²⁺	: Kalsiyum
dak	: Dakika
g	: g kuvveti
G	: Gram
h/mL	: Mililitredeki hücre sayısı
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
kb	: Kilobaz
kDa	: Kilodalton
L	: Litre
Log	: Logaritma
M	: Molar
Mbp	: Milyon baz çift
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: Normal
n	: Generasyon sayısı
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pmol	: Pikomol
rpm	: “revolutions per minutes”
S	: Svedberg katsayısı
sn	: Saniye
S_t	: Generasyon süresi
T₁	: Logaritmik üremenin başlama zamanı
T₂	: Logaritmik üremenin bitiş zamanı
U	: Ünite

V/cm	: Volt/santimetre
w/v	: K�t�le/hacim
�L	: Mikrolitre
�m	: Mikrometre
�g	: Mikrogram
�C	: Santigrad derece
%	: Yüzde
�	: Delesyon

Kısaltmalar	Açıklama
--------------------	-----------------

AD	: Alzheimer hastalığı (“Alzheimer’s Disease”)
Ade	: Adenin
ALS	: Otofaji-lizozom sistemi
AMC	: Amino-4-met�lkumarin
AMP	: Adenozin monofosfat
APP	: Amiloid prekürsör protein
ATG	: Otofaji-ilifkili gen
ATP	: Adenozin 3' -trifosfat
A�	: Amiloid � peptidi
BLAST	: “Basic Local Alignment Search Tool”
CaMK-II	: Kalsiyum / kalmodulin-bağımlı kinaz II
CBR	: Kortikobazal dejenerasyonda
cDNA	: Komplementer DNA
Cdk	: Siklin bağımlı kinaz
CMA	: �aperon aracılı otofaji
CTE	: Kronik travmatik ensefalopati
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DHCF-DA	: Dichlorofluorescein diacetate
DMSO	: Dimetils�lfitoksit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EMM	: Edinburgh minimal besiyeri
ER	: Endoplazmik retikulum

ERK1/2	: Hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar
FAD	: Alzheimer hastalığı formları
FTD	: Frontotemporal demans
GFP	: Yeşil floresan protein (“green flourescent protein”)
Gsk3	: Glikojen sentaz kinaz 3
GTP	: Guanozin 3'-trifosfat
Gua	: Guanin
G418	: Geneticin antibiyotiği
HD	: Huntington hastalığı
Hsp	: Isı şoku proteinleri
IBM	: “Inclusion body myositis”
JNK	: Jun N-terminal kinaz
LB	: Luria Bertani besiyeri
LBA	: Luria Bertani agarlı besiyeri
Leu	: Lösin
LiOAc	: Lityum asetat
LINE	: Uzun serpiştirilmiş nükleer elementler
LTR	: Uzun uç tekrarlı transpozabl elementler
Lys	: Lizin
MAPK	: mitojenle aktive protein kinazlar
MAP	: Mikrotübül ilişkili protein
Mapt	: Mikrotübül ilişkili protein tau
MMA	: Minimal medium agar- Minimal katı besiyeri
MML	: Minimal medium liquid- Minimal sıvı besiyeri
mRNA	: Mesajcı RNA
OD	: Optik yoğunluk
OKA	: Okadoik asit
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat buffer salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PD	: Parkinson hastalığı
PDPK	: Proline yönelik protein kinaz
PEG	: Polietilen glikol
PHF	: Eşleştirilmiş helikal filament

PiD	: Pick hastalığı
PKA	: cAMP-bağımlı protein kinaz
PKC	: Protein kinaz C
PP1/2A	: Protein fosfataz 1/2A
PSEN1/2	: Presenilin1/2
PSA	: Puromisin-duyarlı aminopeptidaz
PSP	: İlerleyici supranükleer palsi
PTP	: Protein tirozin fosfataz
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
Rpm	: Dakika/devir sayısı
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
Ser	: Serin
Ser/Thr	: Serin/treonin kinaz
SINE	: Kısa serpiştirilmiş nükleer elementler
SOB	: Super optimal broth
TAE	: Trisasetat EDTA
Tau	: Tübülün ilişkili birim
TB	: Transformasyon Buffer- Transformasyon tamponu
TBI	: Travmatik beyin hasarları
TE	: Tris-EDTA tamponu
Thi	: Tiamin
Tm	: Erime sıcaklığı
TPK	: Tirozin protein kinaz
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
UPS	: Ubiquitin-proteozom sistemi
Ura	: Urasil
YEA	: “Yeast extract agar”-Zengin katı besiyeri
YEL	: “Yeast extract liquid”-Zengin sıvı besiyeri
YES	: “Yeast extract with Supplements”
YNB	: “Yeast nitrogen base”

ÖZET

DOKTORA TEZİ

***SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*'NİN ALZHEİMER HASTALIĞI İÇİN MODEL ORGANİZMA OLARAK GELİŞTİRİLMESİ**

Merve YILMAZER

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

Alzheimer hastalığı çok yaygın görülen, yaşlanma ile ilişkili nörodejeneratif bir hastalıktır. Nöronal hücrelerin ölümü sinaps kaybıyla meydana gelmektedir. Hastalığın patolojik bulguları hücre dışı amiloid- β ($A\beta$) plakları ve tau proteinlerinin hücre içinde meydana getirdiği nörofibriller düğümlerdir. İnsan hastalıkları için maya model sistemleri, hastalıkla ilişkili moleküler süreçleri aydınlatmak ve yeni tıbbi bileşikleri tanımlamak için değerli araçlardır. Maya modelleri, memeli modellerine kıyasla nispeten daha az karmaşık ve iyi karakterize edilmiş biyolojisi ile çok sayıda avantaj sunmaktadır. Nörodejeneratif hastalıklar gibi (Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Amiyotrofik Lateral Sklerozis) kompleks insan hastalıklarının moleküler temelini araştırmada sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada insan MAPT geninin heterolog anlatımıyla *Schizosaccharomyces pombe*'de Alzheimer hastalık modeli oluşturulması amacıyla insan MAPT geni varyant II sentetik olarak sentezlettirilmiş ve çoğaltılmıştır. *pSGP572* plazmidine ligasyonun ardından elde edilen rekombinant plazmid *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant ırkına transforme edilmiştir. Transformasyon sonrası 11 tane transformant koloni saptanmıştır. Transformant hücrelerde MAPT geninin varlığı fenotipik olarak ve PCR ile kanıtlanmıştır.

Transformant hücre, hücre içinde nörofibriller düğüm oluşumuna neden olan mikrotübül ilişkili protein tau'nun çeşitli hücresel süreçlerle ilişkisi (stres yanıtı, proteozomal aktivite, glukoz tüketimi, enerji metabolizması) ve değişen glukoz konsantrasyon koşullarının tau proteini

üzerine etkisi bakımından biyokimyasal analizlerle ve moleküler genetik yöntemlerle gen anlatımı düzeyinde incelenmiştir.

Temmuz 2021, 130 sayfa.

Anahtar kelimeler: MAPT geni, *Schizosaccharomyces pombe*, heterolog gen anlatımı, tau proteini, Alzheimer hastalık modeli.



SUMMARY

Ph.D. THESIS

IMPROVING OF *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE* AS MODEL ORGANISMS FOR ALZHEIMER'S DISEASE

Merve YILMAZER

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Semian KARAER UZUNER

Alzheimer's disease is a very common, aging-related neurodegenerative disorder. Death of neuronal cells occurs with loss of synapses. Pathological indications of the disease are extracellular amyloid- β ($A\beta$) plaques and neurofibrillary tangles formed by intracellular tau proteins. Yeast model systems for human diseases are valuable tools to understand disease-related molecular processes and identify new medicinal compounds. Yeast models offer numerous advantages with relatively less complex and well-characterized biology compared to mammalian models. They are frequently used in researching the molecular basis of complex human diseases such as neurodegenerative disorders (Parkinson's Disease, Huntington's Disease, Amyotrophic Lateral Sclerosis).

In this study, the human MAPT gene variant II was synthetically synthesized and reproduced in order to create an Alzheimer's disease model in *Schizosaccharomyces pombe* by heterologous expression of the human MAPT gene. Following MAPT gene ligation to plasmid *pSGP572*, the recombinant plasmid was transformed into *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant strain. After transformation, 11 transformant colonies were obtained. The presence of the MAPT gene in transformant cells was proved by PCR and phenotypically.

Transformant cells were examined by biochemical analysis and gene expression level in terms of the relationship of microtubule-associated protein tau, which causes neurofibrillary tangles

formation in the cell, with various cellular processes (stress response, proteasomal activity, glucose consumption, energy metabolism) and the effect of different glucose concentration conditions on tau protein expression.

July 2021, 130 pages.

Keywords: MAPT gene, *Schizosaccharomyces pombe*, heterolog gene expression, protein tau, Alzheimer's disease model.



1. GİRİŞ

Alzheimer hastalığı (AD, “Alzheimers Disease”) çok yaygın görülen yaşlanma ile ilişkili nörodejeneratif hastalıktır. Özellikle ilerleyen zihinsel fonksiyon kaybıyla karakterize edilen bir rahatsızlıktır. Alzheimer hastalığının en belirgin özelliği, hastalıktan etkilenen bireylerin beyinlerinde hücre dışı plakların görülmesidir. Hipokampus ve korteks gibi etkilenen beyin bölgelerinde sinaptik kayıp ve nöronal azalma gözlenebilmektedir (Querfurth ve Laferla, 2010). Bu plakların başlıca bileşeni amiloid β peptididir ($A\beta$). Bir diğer belirgin özelliği ise tau proteini (mapt) birikimiyle meydana gelen hücre içi nörofibriller düğümlerin varlığıdır (Breitenbach ve diğ., 2013).

Nörofibriller düğümlerin oluşum nedeni, tau proteininin hiperfosforile olması sonucu hücre içinde birikimidir. Tau proteininin fosforilasyonu, tau proteini ilişkili kinaz ve fosfataz aktivitesi arasındaki denge tarafından düzenlenmektedir. Bu dengenin bozulması anormal tau proteini fosforilasyonuna neden olur ve böylece tau proteini agregasyonu meydana gelir (Martin ve diğ., 2013b). Tau proteininin anormal fosforile formu sonucu meydana gelen nörotoksisite, AD-benzeri patolojiye neden olmaktadır (Kamat ve diğ., 2013a; 2013b).

Son yıllarda, hastalığa neden olan endojen veya heterolog proteinleri araştırmak için geliştirilen maya modelleri, nörodejeneratif hastalıklar gibi kompleks insan hastalıklarının moleküler temelini araştırmada sıklıkla kullanılmaktadır (Khurana ve Lindquist, 2010; Pereira ve diğ., 2012; Ruotolo ve diğ., 2020). Birçok durumda nörodejenerasyona neden olan proteini kodlayan insan geninin ortoloğu mayada bulunmamaktadır. Alzheimer hastalığında rol oynayan iki temel proteini (tau ve $A\beta$) kodlayan genlerin de ortoloğu mayada yoktur. Ancak bu proteinlerin heterolog olarak mayada anlatımının gerçekleştirildiği araştırmalar bulunmaktadır (Brandis ve diğ., 2006; Porzoor ve Macreadie, 2013).

İnsan MAPT geni 17. kromozomda (17q21) yer almakta ve tau proteinini kodlamaktadır (Neve ve diğ., 1986). Bu protein başlıca merkezi sinir sistemi aksonlarında bulunur ve alternatif kırılma aracılığıyla 6 izoform meydana gelir (Goedert ve diğ., 1989). Tau proteini, mikrotübülleri stabilize eden ve beyinde aksonal taşımayı düzenleyen mikrotübül ilişkili bir proteindir (Lee ve diğ., 2001). Tau proteininin fosforillenmesi, mikrotübüllere bağlanmasını

düzenlerken, hiperfosforilasyonu hastalık patogenezi için neden olmaktadır (Bharadwaj ve diğ., 2010).

Nöronlarda Ser/Thr, MAPK, ERK, PKA, JNK, PKC, CaMKII, Calpain ve GSK3 β gibi başlıca kinazların aktivasyonu AD patolojisi ile ilişkilidir. Tau proteininin anormal hiperfosforilasyonu ile ilişkili olan bu kinazlar, AD patogenezi oluşumunda rol oynar. Serin/treonin protein fosfataz aktivitesi kanser, inflamatuvar hastalıklar ve nörodejenerasyon gibi çoğu hastalığa karşı yeni terapötik yaklaşımlar için potansiyel hedef oluşturmaktadır. Tau proteini hiperfosforilasyonu; mikrotübül dağılması, nörofibriller düğüm oluşumu ve nöronal hücre ölümü nörotoksosite ile sonuçlanır (Kamat ve diğ., 2014).

Glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) organizmalar arasında yüksek derecede korunmuş, glikojen metabolizması, gen anlatımı, apoptoz ve mikrotübül stabilitesini içeren çeşitli hücresel süreçlerde rol oynayan proline yönlendirilmiş serin/treonin kinazdır. İlk olarak fosforilasyondan sorumlu ve glikojen sentezini inaktive eden bir kinaz olarak keşfedilmiştir. GSK3, Alzheimer hastalığının hem sporadik hem de ailesel formunun patogenezi için önemli ve merkezi bir role sahiptir (Hooper ve diğ., 2008).

AD'de tau proteini agregasyonunu engellemek ve tau proteini agregasyonu oluşumuna neden olan olası nedenleri araştırmak amacıyla tau proteininin defosforilasyonuna yüksek ilgi gösterilmektedir. Tau proteinini *in vitro* ve *in vivo* defosforile edebilen iki serin/treonin fosfataz, protein fosfataz 1 (PP1) ve protein fosfataz 2A (PP2A), tanımlanmıştır (Kamat ve diğ., 2014). AD'li hastalarla yapılan çalışmalarda PP2A'nın Alzheimer hastalığı ile ilişkili tau proteini defosforilasyonunda önemli role sahip olduğu görülmüştür (Martin ve diğ., 2013a).

Bu çalışmada insan MAPT geninin heterolog anlatımıyla *Schizosaccharomyces pombe*'de Alzheimer hastalık modeli oluşturularak, hücre içinde nörofibriller düğüm oluşumuna neden olan tau proteininin çeşitli hücresel süreçlerle (stres yanıtı, proteozomal aktivite gibi) ve bu süreçlerin glukoz metabolizmasıyla ilişkisi aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. NÖRODEJENERATİF HASTALIKLAR

Çoğu yaşlanma ilişkili nörodejeneratif hastalıkta sinir sistemi hücreleri içerisinde ya da hücreler arasında özgün proteinlerin anormal birikimi gözlenmektedir. Bu hastalıklar Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı, Amiyotrofik lateral sklerosis, Frontotemporal demans ve diğer birçok nörodejeneratif hastalığı içermektedir. Nörodejeneratif hastalıkların kronik rahatsızlıklar olması nedeniyle belirtiler genellikle dejeneratif gelişimden sonra belirginleşmektedir. Çeşitli nörodejeneratif hastalıklar protein agregasyonu ile başlar ve agregatların çoğalmasıyla ilerler (Walker ve diğ., 2013; Schaffert ve Carter, 2020).

Yaşam süresinin uzamasıyla birlikte Alzheimer, Parkinson, Huntington hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar, toplumda hızlı bir şekilde tedavilerine ihtiyaç duyulan önemli sağlık problemleri haline gelmiştir (Forman ve diğ., 2004).

2.1.1. Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı, günümüzde geri dönüşü olmayan, ilerleyici özellikte hafıza, zihin, kavrama ve öğrenme kapasitesinde gerileme ile karakterize edilen, çoğunlukla ilerleyen yaş ile ortaya çıkan nörodejeneratif epidemik bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı oranı 80 yaşındaki insanlar arasında %25'tir (World Health Organisation, 2012). 2010'da dünya genelinde 35.6 milyon insanın demanslı olduğu ve demanslı hastaların sayısının 2030'a kadar 65 milyon, 2050'ye kadar ise 131.5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Ginhoux ve diğ., 2010; Prince ve diğ., 2013; Webers ve diğ., 2020). Alzheimer hastalığı için günümüzde etkili bir tedavi yöntemi bulunmadığından (Kontsekova ve diğ., 2014) bu hastalık gün geçtikçe dünya genelinde en büyük sosyal sıkıntılardan biri haline gelmektedir (Porzoor ve Macreadie, 2013).

İnsanda bağlantı analizleri ve dizi karşılaştırmaları kullanılarak ailesel otozomal dominant AD genleri keşfedilmiştir. Bu genler APP (Goate ve diğ., 1991), PSEN1 (Sherrington ve diğ., 1995) ve PSEN2 (Levy-Lahad ve diğ., 1995) genleridir. Ancak Alzheimer hastalığı büyük oranda (%95) yaşla ilgili olarak ileri yaşlarda görülmekte ve Mendel kalıtımı göstermemektedir (Bharadwaj ve diğ., 2010).

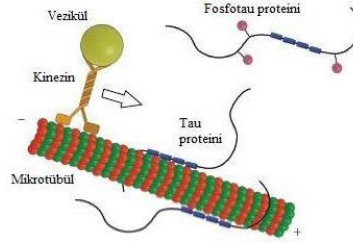
Alzheimer hastalığı nöronal hücrelerin ölümü ve sinaps kaybıyla meydana gelmektedir. Hücre dışı amiloid- β ($A\beta$) plakları ve tau proteinlerinin hücre içinde meydana getirdiği nörofibriller düğümler hastalığın patolojik bulgularıdır (Kamenetz ve diğ., 2003; Irie ve diğ., 2005). $A\beta$ peptidi ve tau proteini toksisite seviyeleri arasındaki güçlü ilişki, $A\beta$ plakları ile nörofibriller düğümlerin Alzheimer hastalığı gelişimine neden olduğunu göstermektedir (Porzoor ve Macreadie, 2013).

Amiloid- β bozuklukları, sadece en çok tanınan Alzheimer hastalığında değil aynı zamanda Down sendromu, serebral amiloid anjiyopati gibi çeşitli ilerleyici nörodejeneratif hastalıklarda da görülmektedir (Goedert ve Spillantini, 2006). Nörofibriller düğümler de, $A\beta$ plakları gibi nöronal hücrelerde hücre sinyali ve besin taşınımını bozmaları (Vega ve diğ., 2008) nedeniyle Alzheimer hastalığının gelişimiyle ilişkilidir (Zabrocki ve diğ., 2005).

Şimdiye kadar Alzheimer hastalığı ile ilişkili araştırmalarda $A\beta$ peptidine odaklanıldığından var olan tedavi yöntemleri doğrudan amiloid oligomerizasyonu ve birikimini önlemeye yöneliktir (Karran ve diğ., 2011). Alzheimer hastalığında tau proteininin sinaptik ve nöronal hasarda önemli ve gerekli olduğu çeşitli çalışmalarla kanıtlanmıştır (Cardenas ve diğ., 2012). Yapılan çalışmalar, Alzheimer hastalığında sinaptik disfonksiyonun, kavrama bozukluğu ve nörodejenerasyona neden olabileceğini düşündürmektedir (Kimura, 2016).

2.2. MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİNLER

Mikrotübüller, hücre şekli stabilizasyonu, motor proteinler aracılığıyla hücre içi taşıma ve mitoz gibi çeşitli hücresel süreçlerdeki görevleriyle hücre iskeletinin protein polimerleridir (Mandelkow ve Mandelkow, 2012). Mikrotübüller, $\alpha\beta$ tübülün dimerlerinin kuyruk polimerizasyonu ile oluşan protofilamentlerin lateral birleşmesiyle meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Mikrotübüle bağlanan proteinler genel olarak mikrotübül ilişkili protein (veya MAP) olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 2.1: Tau proteininin mikrotübül ile ilişkisi (Kolarova ve diğ., 2012).

2.2.1. Maya Türü Organizmalarda Mikrotübül İlişkili Proteinler

Diğer tüm ökaryotlarda olduğu gibi fisyon mayası mikrotübülleri de α ve β tübülün polimerlerinden oluşmaktadır. Mikrotübül ilişkili bir molekül olan γ -tübülün, mikrotübüllerin polimerizasyonunda görev alan mikrotübül organizasyon merkezinde bulunmaktadır (Pereira ve Schiebel, 1997; Hagan, 1998). Fisyon mayasında MAP'ler, hücre döngüsünde ve mitozda önemli bir rol oynamaktadır. Ancak, memeli hücrelerinden farklı olarak, motor proteini ve MAP'lerin sayısı daha azdır (Fu ve diğ., 2009; Syrovatkina ve diğ., 2013).

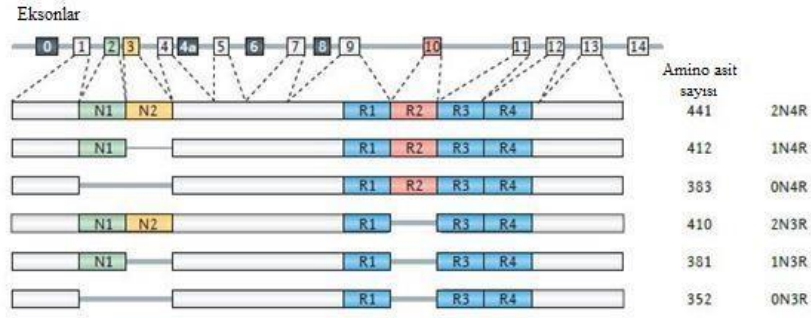
En iyi karakterizasyonu yapılmış fisyon mayası MAP'ları Dis1 ve Alp14/Mtc1 proteinleridir. Dis1 ve Alp14/Mtc1'de C-terminal bölgesi doğrudan mikrotübüllerle ilişkilidir (Nakaseko ve diğ., 2001; Nakaseko ve diğ., 1996).

2.3. MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ PROTEİN TAU

İnsan MAPT geni, 17. kromozomda (17q21) yer almakta ve 16 ekson içermektedir. Ekson 1 promotörün bir parçasıdır ve transkribe olur ancak translasyonu gerçekleşmez. Ekson 1, 4, 5, 7, 9, 11, 12 ve 13 konstitütif eksonlardır. Ekson 2, 3 ve 10'da alternatif kırılma gerçekleşmekte ve yetişkin bireylerin beyinde bu durum açıkça görülmektedir. Ekson 2 tek olarak görülebilmesine rağmen ekson 3, ekson 2'den bağımsız şekilde gözlenmemektedir. Merkezi sinir sisteminde ekson 2, 3 ve 10'un alternatif kırılmasıyla beyin gelişimi esnasında anlatımı yapılan tau proteini 6 izoform şeklinde bulunmaktadır (Sergeant ve diğ., 2005; Kolarova ve diğ., 2012).

Tau proteininin altı izoformu, tau proteini molekülünün N-terminalinde yer alan 29 amino asitlik bir diziyi bir (1N) tekrar, iki (2N) tekrar olarak içermesi ya da hiç içermemesine ve C-

terminalinde yer alan 31 veya 32 amino asitlik bir diziyi üç (3R) ya da dört (4R) tekrarlı tübülün bağlanma domaini içermesine göre farklılık göstermektedir. Bu izoformların boyutu, 2, 3 ve 10. eksonlar tarafından kodlanan dizilerin varlığı ya da yokluğu ile ilişkili olarak 352'den 441 amino aside kadar değişmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Tau proteinine ait 6 izoform (Wang ve Mandelkow, 2016).

Alzheimer hastalıklı ve hasta olmayan beyinlerde 4R ile 3R arasında anlamlı bir fark olduğu gözlenmiştir. Sağlıklı beyinlerin mikrotübül bağlayıcı tekrarlarında, 4R ve 3R oranları yaklaşık olarak birbirlerine eşitken (1:1), AD ve tau patolojisi gösteren hastalıklı durumlarda bu oran 2:1 şeklindedir (Pradeepkiran ve diğ., 2019).

Her bir tekrar domaini, serin bakiyesinin fosforillenmesiyle nöronal iskeletin destabilizasyonuna neden olan, korunmuş bir KXGS motifi (Lizin-X-Glisin-Serin) içermektedir (Drewes ve diğ., 1995; Sengupta ve diğ., 1998). Tau proteininin 85 fosforilasyon bölgesinden 28'i AD'li beyinlerde, 16'sı hem AD'li hem de kontrol grubu beyinlerde, 31'i fizyolojik koşullarda ve 10'u ise olası tau proteini fosforilasyon bölgesinde yer almaktadır (Martin ve diğ., 2013b).

Tau (tübülün ilişkili birim) proteini 55 kDa molekül ağırlıklı bir proteindir (Guo ve diğ., 2017) ve ilk olarak Weingarten ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Weingarten ve diğ., 1975). Yüksek ökaryotlarda anlatımı yapılmakta ve hem nöronal hem de nöronal olmayan hücrelerde bulunmaktadır. Ancak anlatımları nöronlarda baskın şekilde gözlenmektedir (Rossi ve diğ., 2008). Mikrotübül yapılanması ve stabilitesindeki yaygın olarak bilinen rolünün yanı sıra, tau proteininin aksonal taşıma ve sinyal iletimi için bağlantı sağlama gibi pek çok fonksiyonunun olduğu bilinmektedir (Ittner ve diğ., 2010; Martin ve diğ., 2011). Hücresel süreçlerde nükleusun

Schizosaccharomyces pombe'de GSK3 ortologları *gsk3* geni (SPAC1687.15) ve *gsk31* geni (SPBC8D2.01) tarafından kodlanmaktadır. *Gsk3* geninin delesyonu, ısı şoku ve sporulasyonda

kusura neden olmaktadır (Plyte ve diğ erleri, 1996). *S. pombe*'deki *gsk31* geninin fonksiyonları henüz incelenmemiştir (Qingyun ve diğ ., 2016).

Tau proteininin yüksek oranda fosforilasyonunun proteazlara karşı direnç kazandırdığı bilinmektedir (Dickey ve diğ ., 2006). Bu durum, tau proteininin bozunmasını yavaşlatmakta ve nöron gelişiminde veya hibernasyona yatan hayvanlarda uyanık evrelerde mikrotübül stabilizasyonu için gerekli olan defosforilasyona karşı korumaktadır (Tepper ve diğ ., 2014).

Tau proteini defosforilasyonunun düzenlenme mekanizmasının anlaşılması, tau proteini agregatlarını oluşturan muhtemel nedenlerin saptanması ve Alzheimer hastalığındaki bu lezyonlarla başa çıkmada koruma stratejilerinin geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır. Tau proteini fosforilasyonunu tersine  eviren muhtemel ve nispeten spesifik müdahaleler arasında belirli tau fosfatazların uyarılması bulunmaktadır (Martin ve diğ ., 2013a).

Taupatiler, tau proteini agregasyonu ile ilişkili nörodejeneratif hastalıklar sınıfını tanımlamaktadır (Spillantini ve Goedert, 2013). Tau proteininin anormal metabolizması, protein birikimi ve nörofibriler düğümlerin gelişmesine yol açmaktadır (Crowther ve diğ ., 1989). Progresif supranükleer palsi (PSP), kortikobazal dejenerasyon (CBD), birincil yaşa bağlı taupati ve kronik travmatik ensefalopati (CTE) tau proteini agregasyonu ile ayırt edilen ve birincil taupatiler olarak sınıflandırılan nörodejeneratif hastalıklar içerisinde yer almaktadır (Josephs, 2017). Tau proteini birikimi, Alzheimer hastalığı (AD) ve frontotemporal dejenerasyon (FTD) gibi nörodejeneratif hastalıklarda da tanımlanmıştır. Bu hastalıklarda yanlış katlanmış tau proteini sıklıkla diğ er protein anomalilikleriyle birlikte bulunmaktadır (Altimus ve diğ ., 2019). Örneğin tau proteini agregasyonu, enflamatuvar bir kas hastalığı olan “inclusion body myositis (IBM)” taşıyan hastalarda gösterilmiştir (Askanas ve diğ ., 1994; Maurage ve diğ ., 2004). Ayrıca tau proteini anlatımının, meme (Pusztai ve diğ ., 2009; Matrone ve diğ ., 2010), prostat (Souter ve Lee, 2009; Cirak ve diğ ., 2013), yumurtalık (Fekete ve diğ ., 2012; Smoter ve diğ ., 2013), mesane (Wosnitzer ve diğ ., 2011) ve mide kanseri gibi çeşitli dokuları etkileyen bazı kanser türlerinde bir öneme sahip olabileceği belirtilmiştir.

Genellikle, tau proteini hiperfosforilasyonunun, proteinin aksondan dendritlere geçişiyle nöronal fonksiyon bozukluğuyla sonuçlanan, kritik basamak olduğu düşünülmektedir. (Sydow ve diğ ., 2011). Protein birikimiyle bağlantılı olarak sinapsların ve nöronların kaybı meydana gelmektedir (Kimura ve diğ ., 2007; 2010).

2.4. HÜCRELERDE PROTEİN YIKIMI

Yanlış katlanmış, agregasyon oluşturmuş ya da fazla miktarda olan proteinler, ubiquitin-proteozom sistemi, otofaji ve veziküler taşınımın dahil olduğu, farklı yollar aracılığıyla verimli bir şekilde yıkılmaktadır (Braun, 2015). Protein homeostazisindeki bozulmanın, yaşla ilişkili nörodejeneratif hastalıklarda rol oynadığı düşünülmektedir. Beyindeki protein agregatlarının varlığı, Parkinson (PD), Alzheimer (AD) ve Huntington hastalığı (HD) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda ortak olarak bulunan bir özelliktir (Soto, 2003; Knowles ve diğ., 2014).

Anormal bir protein, moleküler şaperonlar tarafından kendi doğal formuna geri katlanamadığı durumda, iki proteolitik sistem (proteazomal yıkım ve otofaji) ile ortadan kaldırılmaktadır. Endoplazmik retikulum (ER) ilişkili yıkım yolağı aracılı yıkımda ER, yanlış katlanmış proteinlerin yıkımı için tanımak, işaretlemek ve sitoplazmaya taşımak üzere ubiquitin-proteozom sistemi (UPS) ile işbirliği yapmaktadır (Vembar ve Brodsky, 2008; Guerriero ve Brodsky, 2012; Brodsky, 2012). Tau proteini yıkımı ve işlenmesi normalde hem kaspazlar hem de proteozom aracılığı ile olmaktadır (David ve diğ., 2002; Goldbaum ve diğ., 2003). Buna karşın hiperfosforile formda tau proteini, proteozom aracılı yıkıma karşı dirençli hale gelmektedir (Oddo ve diğ., 2004; Poppek ve diğ., 2006).

Mayalar, sitotoksikite ve programlanmış hücre ölümünü ölçmek ve apoptoz ile nekrozun korunmuş mekanizmalarını belirlemek için kullanılan modellerdir (Carmona-Gutierrez ve diğ., 2010). Artan proteozom kapasitesi, proteotoksik strese karşı daha dirençli olan maya hücrelerinin ömrünü ve uyumunu artırmaktadır (Kruegel ve diğ., 2011). Azalmış proteozom kapasitesi, amino asit homeostazında bozulmalara yol açmakta ve böylece hücre ölümü gerçekleşmektedir (Suraweera ve diğ., 2012; Braun, 2015).

Otofaji (“kendini yiyen”), sitozolik bileşenleri, organelleri, patojenik molekül ve organizmaları lizozomlar aracılığıyla ortadan kaldıran hücrel bir yıkım mekanizmasıdır (Huang ve Klionsky, 2007; Mizushima, 2012; Sin ve Nollen, 2015). Çeşitli veriler, otofaji yolağının fosforile tau proteininin yıkılmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Jo ve diğ., 2014).

Otofaji üç sınıfa ayrılır: makrotofaji, mikrotofaji ve şaperon aracılı otofaji (CMA). Makrotofajide, yeni oluşturulmuş bir çift membran vezikül, otofagozomu oluşturan sitozolik

materyali çevrelemektedir. Otofagozom daha sonra bir endozom veya lizozom ile birleşerek, hidrolitik enzimlerin etkisiyle parçalanmanın gerçekleştiği otolizozoma dönüşmektedir (Yang ve Klionsky, 2009). Otofagozomu çevreleyen çift membran ER, mitokondri ya da plazma zarından türemektedir (Ylä-Anttila ve diğ., 2014; Axe ve diğ., 2008). Mikrotofajide, sitoplazmada yer alan küçük moleküller, lizozomun kendi membranının içeri çökmesiyle lizozom içine alınmaktadır (Mizushima ve Komatsu, 2011). Mikrotofaji hakkında bilgiler daha azdır (Mijaljica ve diğ., 2014). CMA, zarın yeniden düzenlenmesini içermemesi bakımından diğer iki otofaji mekanizmasından farklıdır. KFERQ amino asit motifi taşıyan substratlar, bu substratları bağlayan ve lizozomda CMA reseptörüne gönderen bir sitozolik şaperon HSP70 tarafından tanınmaktadır (Chiang ve Dice, 1988; Koga ve diğ., 2011).

Otofaji proteozomun aksine tau proteinini fosforilasyondan bağımsız olarak yıkmaktadır. UPS ile yıkılmayan, tekrar domainlerinin KXGS motiflerinde fosforile edilmiş tau proteinleri, otofaji ile etkili bir şekilde yıkılmaktadır (Krüger ve diğ., 2012). Buna uygun olarak, otofajinin bozulması, insan tau proteininin aşırı anlatımını yapan bir hücre modelinde tau proteini agregasyonunu arttırmaktadır (Hamano ve diğ., 2008). Şaperon aracılı otofajinin, taupati hücre modelinde tau proteininin proteolitik işlenmesinde ve yıkımında rol oynadığı bulunmuştur (Wang ve diğ., 2009).

Mayalarda, otofaji, en az 37 otofaji-ilişkili (ATG) gene gereksinim duyan çok basamaklı bir süreçtir (Klionsky ve diğ., 2003; Nazarko ve diğ., 2014). ATG genlerinin büyük kısmının memelilerde de fonksiyonel olarak korunduğu gösterilmiştir (Xie ve Klionsky, 2007; Yang ve Klionsky, 2010).

2.5. MAYALARIN NÖRODEJENERATİF HASTALIKLARDA MODEL OLARAK KULLANILMASI

Model organizmalar ile ilgili temel araştırmalar canlılığın işleyişini ortaya koymaktadır. Bu araştırmalar canlılığın işleyişinde hatanın nerede olduğunu anlamamıza yardımcı olmaktadır. Çalışmalarda ortolog gen benzer şekilde kusurlu hale getirilerek, kusurlu bir genin neden olduğu insan hastalığı fenotipinin deneysel olarak izlenildiği bir model elde edilmektedir. Model organizmaların, bir hastalığın tedavisinin gelişimine katkıda bulunduğuna dair çok sayıda örnek bulunmaktadır (Wangler ve diğ., 2017; Johnston, 2020).

Metabolizma, hücre bölünmesi, transkripsiyon, translasyon, proteinlerin salgılanması ve otofaji gibi birçok temel hücresel süreç, basit ascomycetlerden insana kadar yüksek derecede korunmuştur ve bu organizmalar üzerine yapılan temel araştırmalar birçok medikal araştırma alanını geliştirmiştir (Breitenbach ve diğ., 2013).

Saccharomyces cerevisiae ve *Schizosaccharomyces pombe* moleküler genetik çalışmaları için sıklıkla kullanılan model organizmalardandır. İnsanlarda bulunan hastalık allelerini içeren insan genlerinin maya ortologlarının fonksiyonları çalışmaların temelini oluşturmaktadır (Breitenbach ve diğ., 2013).

Mayalar uzun yıllardan beri biyoteknolojide, insülin ve aşı gibi değerli yeni biyofarmasötiklerin üretilmesinde kullanılmaktadır. Aynı zamanda rekombinant proteinlerin anlatımı ile temel bilgiler sağlamakta ve çeşitli kimyasalların etkisini belirlemek için birincil basamağı oluşturmaktadır. Mayalar birçok hastalık çalışması için ilk hücre kültür sistemi olarak kullanılmaktadır. Bu gelişmelerden bazıları ve mayaların insan sağlığı ve hastalığı hakkında temel bilgilerimize nasıl katkıda bulunduğu Tablo 2.1’de özetlenmiştir (Porzoor ve Macreadie, 2013).

Tablo 2.1: İnsan hastalıkları ile ilişkili maya çalışmalarındaki temel gelişmeler (Porzoor ve Macreadie, 2013).

Maya Araştırma Sonuçları	İnsan Biyolojisi Üzerine Etkisi
İlk dizilenen ökaryotik genom olması (<i>S. cerevisiae</i>)	Mayalara benzer şekilde insan genlerinin tanımlanması
Gen delesyonu koleksiyonunun tamamlanması	İnsan genleriyle komplementasyon çalışmaları
Maya ikili hibrit sisteminin geliştirilmesi	İnsan proteini etkileşimlerinin çalışılması ve taranması için gen kütüphanelerinin oluşturulması
Maya üçlü hibrit sisteminin geliştirilmesi	İnsan hastalıklarıyla ilişkili RNA-protein (özellikle viral enfeksiyonlar) etkileşimlerinin çalışılması, , küçük ligand reseptörlerinin tanımlanması
Mayalarda gerçekleştirilen hücre döngüsü çalışmaları	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> çalışmalarının kanser araştırmaları için uygulanabilir modeller olarak tanınması (2001 Nobel Ödülü)

Mitokondriyal hasar, oksidatif stres, protein agregasyonu ve yıkılma gibi nörodejeneratif bozukluklara katılan süreçlerin çoğu maya hücrelerinde analiz edilebilir ve bunlar genellikle modern teknolojilerle birleştirilmektedir (Mager and Winderickx, 2005; Porzoor ve Macreadie, 2013).

Günümüzde, belirli bir hastalığın temelinde yatan endojen veya heterolog proteinleri incelemek üzere geliştirilmiş mühendislik ürünü maya modelleri, nörodejenerasyon gibi kompleks insan hastalıklarının moleküler temelini anlamak için kullanılmaktadır (Pereira ve diğ., 2012). Mayalar, insan hastalıklarıyla bağlantılı proteinlerin heterolog anlatımı ve bu proteinlerin ortologlarının anlatımı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Alzheimer hastalığında iki ana protein/peptidi kodlayan genin, tau proteini ve A β , mayada ortoloğu bulunmamaktadır. Ancak bu genlerin anlatımları mayada (*S. cerevisiae*) heterolog olarak gerçekleştirilmektedir (Porzoor ve Macreadie, 2013).

Son yıllarda, insan nörotoksik protein anlatımının maya hücresi sağkalımı üzerindeki etkisini analiz etmek için Parkinson hastalığı, Huntington hastalığı, Alzheimer hastalığı ve Amiyotrofik Lateral Sklerozis modellerinin de dahil olduğu birçok maya modeli oluşturulmuştur (Gitler, 2008; Miller-Fleming ve diğ., 2008; Winderickx ve diğ., 2008; Bharadwaj ve diğ., 2010; Braun ve diğ., 2010; Khurana ve Lindquist, 2010; Bastow ve diğ., 2011; Mason ve Giorgini, 2011; Pereira ve diğ., 2012; Breitenbach ve diğ., 2013; Braun, 2015; Seynnaeve ve diğ., 2018). AD hakkında daha fazla bilgi edinmek için yapılan çalışmalar öncelikle insan hücre hatlarını ve transgenik fare modellerini kullanır. Ancak maya hücre modelleri AD'nin temel hastalık mekanizmasını anlamada son yıllarda daha önemli bir rol oynamaktadır (Seynnaeve ve diğ., 2018).

2.5.1. *Schizosaccharomyces pombe*

Schizosaccharomyces pombe tek hücreli, ökaryotik, moleküler ve hücre biyoloji çalışmaları için önemli bir model organizmadır. *Saccharomyces cerevisiae* ile birlikte, *S. pombe* ile gerçekleştirilen çalışmalar transkripsiyon, translasyon, DNA replikasyonu, hücre döngüsü kontrolü ve sinyal transdüksiyonu gibi temel süreçlerde rol oynayan genlerin ve bazı süreçlerin keşfedilmesine katkı sağlamaktadır. İki tür yaklaşık 350 milyon yıl önce ayrılmıştır ve *S. pombe*'nin, *S. cerevisiae*'den daha yavaş bir şekilde evrimleştiği düşünülmektedir. *S. pombe* ortak antik maya atasına ait daha fazla özelliği koruyarak metazoan hücrelerle daha çok benzerlik göstermektedir.

Tek hücreli organizmalar olarak mayalar, ilgilenilen biyolojik süreçlerle ilişkili genlerin tanımlanmasında fazla sayıda hücreyle çalışmaya olanak sağlamaktadır. Ökaryotlar olarak mayalar, bakterilerde bulunmayan organel biyogenezi, hücre iskeleti organizasyonu ya da

bakterilerden önemli ölçüde farklılık gösteren ökaryotik transkripsiyon, translasyon ve DNA replikasyonu gibi insandan mayaya kadar korunan hücresel süreçleri incelemek için kullanılmaktadır.

Mayaların moleküler genetik çalışmalarında yararlanılan en önemli özelliklerinden biri, özelliklerini değiştirebilecek plazmidleri taşımalarıdır. Bu durum konakta istenen etkiyi sağlayan farklı DNA parçalarını içeren plazmidlerle gen klonlamasını kolaylaştırır (Hoffman ve diğ., 2015).

S. pombe, fasyon mayası olarak bilinen “ascomycetes” türü bir mayadır. Ascomycetes ve basidiomycetes, Fungi alemini oluşturmaktadır. *S. cerevisiae*, *S. pombe* ve memeliler arasında korunmuş olan 338 genini kaybetmiştir ve *S. pombe*'nin proteomik içeriği ortak atalarinkine daha yakındır. (Aravind ve diğ., 2000; Wood, 2006).

S. pombe, ilk olarak Doğu Afrika Darı birasından Linder tarafından 1893 yılında izole edilmiştir ve Leupold (1970) tarafından genetik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. *S. pombe* 972^h, 975^h (heterotallik) ve 968^{h90} (homotallik) olmak üzere farklı eşem tiplerine sahiptir (Gutz ve diğ., 1974; Egel, 2004). *S. pombe* genomu tamamen dizilenmiş 6. model organizmadır (Wood ve diğ., 2002). 3 adet kromozoma (5.7, 4.6 ve 3.5 Mbp) sahiptir ve genom boyutu 12,57 Mbp'dir. 5118 protein kodlayan gen içermektedir (Hoffman ve diğ., 2015; Pombase). Yaşam döngüsü vejetatif üreme ve eşeyli üreme evrelerinden oluşmaktadır, diploid veya haploid halde bulunabilirler. Baskın olarak vejetatif evrede haploid durumdadır (Egel, 2004).

Bu tez çalışmasında insan MAPT geninin *Schizosaccharomyces pombe*'de heterolog anlatımıyla Alzheimer hastalık modeli oluşturuldu. Ayrıca tau proteini anlatımı gerçekleştirilen *S. pombe* hücreleri farklı glukoz konsantrasyonu içeren koşullarda üretilerek glukoz metabolizması ve tau proteini arasındaki ilişki incelendi. Bu çalışma ile elde edilen model organizma, Alzheimer hastalığı ve diğer taupatiler ile ilgili yapılacak olan çalışmalarda, başlangıç hücre kültürleri olarak kullanılabilir. Alzheimer hastalığının moleküler mekanizmasının anlaşılması ve tedavisine katkı sağlayacak ilaç tasarımı yararlı olacaktır. Elde edilen bu model organizmaya birçok bileşik ve kimyasal madde uygulamasının gerçekleştirilebileceği ve bu uygulanan maddelerin çeşitli hücresel süreçler üzerindeki etkisinin moleküler düzeyde araştırılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

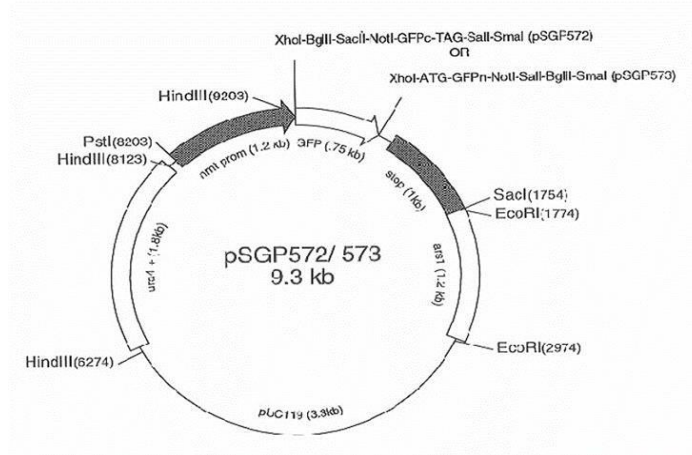
3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ORGANİZMA

Bu çalışmada Ascomycetes sınıfından tek hücreli ökaryotik bir organizma olan *Schizosaccharomyces pombe* *gua1ura4h⁻* ikili mutant ırk, plazmidlerin çoğaltılmasında ise *Escherichia coli* *DH5α* ırkı kullanıldı. Araştırmada kullanılan *S. pombe* mutant ırk ve *E.coli* *DH5α* suşu İ.Ü. Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Kültür Koleksiyonu'ndan sağlandı (Tablo 3.1). *pSGP572* plazmidini Yeast Genetic Resource Center (YGRC)-Japonya'dan temin edildi (Şekil 3.1).

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan organizmaların özellikleri.

İrklar	Özellikleri
<i>S.pombe</i> 972h-	Yabani ırk
<i>S. pombe</i> <i>gua1ura4-D18h⁻</i>	Orotidin-5-fosfat (OMP) dekarboksilaz geni delesyonlu, inozin monofosfat dehidrogenaz enzimi kusurlu
<i>E. coli</i> <i>DH5α</i>	F/endA1hsdR17(r-kmk+) ⁺ supE44thi- 1recA1 gyrA(nal ^r)relA1Δ(lacZYA-arg FU169deoR[ø80 dLacΔ(LacZ)M15]



Şekil 3.1: *pSGP572* plazmidinin restriksiyon haritası.

3.2. KULLANILAN BESİYERLERİ VE ÇÖZELTİLER

S. pombe hücrelerinin üretiminde Gutz ve arkadaşları (1974)'nın önerdiği şekilde zengin besiyeri ve farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren minimal besiyerleri kullanıldı. *E.coli* *DH5α*

hücrelerinin üretimi Luria Bertani (LB) besiyerinde, plazmid taşıyan *E.coli DH5α* hücrelerinin üretimi ise ampisilin içeren LB besiyerinde gerçekleştirildi. Çalışma boyunca kullanılan besiyerleri ve solüsyonların içeriği aşağıda yer almaktadır. Besiyerleri 121°C’de 1 atm basınçta 15 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Metabolit ilavesi besiyerlerine 0.22 µm çapında milipor filtre sterilizasyonu yapılarak eklendi.

E. coli DH5α hücreleri için kullanılan besiyerleri;

- “Luria Bertani (LB)” Besiyeri: LB besiyeri *E.coli* üretiminde kullanıldı. LB besiyeri bileşenleri (Tablo 3.2) distile suda çözdürüldü, pH’sı 1N NaOH ile 7.2’ye ayarlandı ve otoklavda steril edildi. Plazmid içeren *E. coli DH5α* hücrelerinin üretimi için son konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde ampisilin antibiyotiği besiyerine ilave edildi.

Tablo 3.2: “Luria Bertani (LB)” besiyeri içeriği.

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

“Super Optimal Broth (SOB)” Besiyeri: Bakteri transformasyonunda süper yeterli hücre eldesinde kullanılacak SOB besiyeri hazırlamak için Tablo 3.3’teki bileşenler bir araya getirildi. SOB besiyeri *E. coli* hücrelerini, süper yeterli hale getirmek amacıyla üretmek için kullanıldı.

Tablo 3.3: “Super Optimal Broth (SOB)” besiyeri içeriği.

SOB Besiyeri	
Bacto Tryptone	%2 w/v
Bacto Yeast Extract	%0.5 w/v
NaCl	10 mM
KCl	25 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

S. pombe hücreleri için kullanılan besiyerleri;

- “Yeast Extract Agar (YEA)” Besiyeri: Zengin besiyeri hazırlamak için amaca uygun olarak bileşenler (Tablo 3.4) bir araya getirilirken, sıvı besiyerlerine agar eklenmedi.

Tablo 3.4: “Yeast Extract Agar (YEA)” besiyeri içeriği.

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

- “Minimal Medium Agar (MMA)” Besiyeri: Minimal besiyeri için kullanılan bileşenler Tablo 3.5’te verildi. *Gua1ura4h⁻* mutant hücrelerinin genotip kontrollerinde seçici besiyeri için gerekli metabolitler (guanin, urasil) sterilizasyondan sonra final konsantrasyon 50 mg/L olacak şekilde MMA besiyerine ilave edildi. Transformasyon sonrası yapılan çalışmalarda plazmidde yer alan *nmt* promotörünü genin anlatımını baskılamak için besiyerine son konsantrasyon 15 μ M olacak şekilde tiamin ilave edildi.

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

MMA (1 L)		Stok A ₁	
Stok A ₂	100 mL	H ₃ BO ₄	50 mg
Stok 3a	1 mL	CuSO ₄ .5H ₂ O	4 mg
Stok 3b	1 mL	KI	10 mg
Glukoz	10 g	FeCl ₃ .6H ₂ O	20 mg
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	1 g	MnSO ₄ .4H ₂ O	53 mg
Agar	20 g	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	19,5 mg
Distile su	900 mL	ZnSO ₄ .7H ₂ O	40 mg
		Distile su	100 mL
Stok A ₂		Stok 3a	
KH ₂ PO ₄	1 g	Kalsiyum pentotenat	100 mg
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5 g	Nikotinik asit	1 g
NaCl	0.1 g	Mezoinositol	1 g
CaCl ₂ .6H ₂ O	0.15 g	Distile su	100 mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g	Stok 3b	
Stok A ₁	1 mL	Biotin	1 mg
Distile su	100 mL	%50 etanol	100 mL

- Edinburgh Minimal Media (EMM) Besiyeri: Minimal besiyerine ek olarak A₁ solüsyonuna 10 g/L sitrik asit eklenerek hazırlandı.

- “Yeast Nitrogen Base (YNB)” Besiyeri (Zenginleştirilmiş Sentetik Besiyeri) [Synthetic Complete Medium (SCM)]: YNB besiyeri hazırlamak için bileşenler (Tablo 3.6) bir araya getirildi. YNB besiyeri, transformasyon (aminoasitli YNB) için ve *S. pombe*’den plazmidin geri izolasyonunda aminoasitsiz YNB (w/o amino acid) kullanıldı.

Tablo 3.6: “Yeast Nitrogen Base (YNB)” besiyeri içeriği.

YNB (1 L)	
Yeast Nitrogen Base (YNB) (w/o amino acid)	1 g
Amonyum sülfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	5 g
Glukoz	20 g
Distile su	1000 mL

Bu besiyerine adenin (50 mg/mL), arginin, histidin, metionin, triptofan (20 mg/mL), izolösin, lizin, tirozin (30 mg/mL), lösin (60 mg/mL) ve valin (150 mg/mL) olacak şekilde metabolitler ilave edildi.

Çalışmada kullanılan solüsyonlar ve tamponlar;

- ✓ TE tamponu (pH 8.0) (Tablo 3.7)

Tablo 3.7: Tris-EDTA tamponu bileşenleri.

TE Tamponu	
EDTA	1 mM
Trizma Base	10 mM

- ✓ Transformasyon solüsyonu (TB) (Tablo 3.8)

Tablo 3.8: TB bileşenleri.

TB solüsyonu	
PIPES	10 mM
KCl	15 mM
CaCl ₂	250 mM
MnCl ₂	55 mM

- ✓ *S. pombe*’den plazmidin geri izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu (Tablo 3.9)

Tablo 3.9: DNA parçalama tamponu bileşenleri.

DNA Parçalama Tamponu (pH 8.0)	
SDS	%1 (w/v)
NaCl	0,1 M
Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM
TritonX-100	%2 (w/v)

- ✓ *S. pombe* transformasyonunda kullanılan LiAC/EDTA tamponu (Tablo 3.10).

Tablo 3.10: LiAc/EDTA tamponu bileşenleri.

LiAc/EDTA (pH 4.9)	
LiAc	100 mM
EDTA	1 mM

✓ LiAC-PEG tamponu (Tablo 3.11)

Tablo 3.11: LiAc-PEG tamponu bileşenleri.

LiAc-PEG (pH 4.9)	
LiAc	100 mM
EDTA	1 mM
PEG	%40

✓ “Phosphate Buffered Saline (PBS)” (pH 7.4) (Tablo 3.12)

Tablo 3.12: PBS çözeltisi bileşenleri.

PBS Tamponu (pH 7.4) (1 X)	
NaCl	137 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM

✓ Protein İzolasyonu Parçalama Tamponu (Tablo 3.13)

Tablo 3.13: Protein izolasyonunda kullanılan parçalama tamponu bileşenleri.

Parçalama Tamponu	
Tris (pH 7.4)	50 mM
Sodyum klorür	150 mM
Nonidet-P40	% 0.5 (w/v)
EDTA	5 mM

✓ Plazmid İzolasyonu Lizis Tamponu (Tablo 3.14)

Tablo 3.14: Lizis Tamponu bileşenleri.

Lizis Tamponu (pH 8.0)	
Glukoz	50 mM
Tris-HCl	25 mM
EDTA	10 mM

✓ Alkali SDS solüsyonu (Tablo 3.15)

Tablo 3.15: Alkali SDS solüsyonu bileşenleri.

Alkali SDS (pH 12.0)	
NaOH	0.2 N
SDS	%1 (w/v)

✓ 5 M Potasyum asetat (4.8 pH): Plazmid izolasyonunda kullanılan 5 M potasyum asetat çözeltisini 100 mL hazırlamak için 49.05 g potasyum asetat 29,5 mL glasiyel asetik asit içinde çözündürüldü ve distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Protein çalışmalarında kullanılan solüsyonlar;

- ✓ Ayırma Jeli (pH 8.8) ve Yükleme Jeli Tamponu (pH 6.8): Ayırma jeli tamponu için 1.5 M Tris distile suda çözündürülerek pH 8.8'e ayarlandı. Yükleme jeli tamponu için ise 0.5M Tris distile suda çözündürülerek pH 6.8'e ayarlandı.
- ✓ SDS-PAGE Ayırma Jeli (pH 8.8) ve Yükleme Jeli (6.8) : SDS-PAGE yönteminde kullanılan % 10'luk ayırma jeli ve % 5'lik yükleme jeli bileşenleri Tablo 3.16'da verildi.

Tablo 3.16: SDS-PAGE ayırma jeli ve yükleme jeli bileşenleri.

Bileşenler	Ayırma Jeli (pH 8.8)	Yükleme Jeli (pH 6.8)
%30 Akrilamid (w/v)	1,662 mL	337,5 µL
Tris	1 mL	250 µL
%10 SDS (w/v)	50 µL	25 µL
TEMED	1,75 µL	3,5 µL
%10 APS (w/v)	25 µL	12,5 µL
Distile su	2,262 mL	1,875 mL

- ✓ 2X Örnek Uygulama Tamponu (Tablo 3.17)

Tablo 3.17: Örnek uygulama tamponu bileşenleri.

Örnek Uygulama Tamponu (pH 6.8)	
Tris	0.125 M
SDS	% 4 (w/v)
Gliserol	% 20 (v/v)
β-merkaptoetanol	% 10 (v/v)
Bromofenol mavisi	% 0.2 (v/v)

- ✓ 5X Tank tamponu (Tablo 3.18)

Tablo 3.18: SDS-PAGE'de kullanılan tank tamponu bileşenleri.

Tank Tamponu (pH 8.3)	
Tris	25 mM
Glisin	192 mM
SDS	% 0.1 (w/v)

- ✓ Aktarım Tamponu (Tablo 3.19)

Tablo 3.19: Proteinlerin membrana aktarımında kullanılan aktarım tamponu bileşenleri.

Aktarım Tamponu (pH 8.3)	
Tris	25 mM
Glisin	192 mM
SDS	% 0,1 (w/v)
Metanol	% 20 (v/v)

- ✓ TBST tamponu: %0,1 (v/v) oranında Tween, TBS (20 mM Tris Base, 150 mM NaCl ((pH 7,5)) içinde çözdüldü.
- ✓ Yağsız süt tozu: Membranın bloklanması amacıyla yağsız süt tozu %5'lik (w/v) konsantrasyonda TBST tamponu içinde çözdüldü.

- ✓ 20S Proteozomal Aktivite Parçalama Solüsyonu (Tablo 3.20)

Tablo 3.20: 20S Proteozomal aktivite ölçümünde kullanılan parçalama solüsyonu bileşenleri.

Parçalama Solüsyonu (20S Proteozomal Aktivite)	
Sukroz	0.25 M
HEPES (pH 7.8)	25 mM
MgCl ₂	10 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM

- ✓ 20S Proteozomal Aktivite Seyreltme Tamponu (Tablo 3.21)

Tablo 3.21: “Assay Buffer” bileşenleri.

“Assay Buffer (20S Proteozomal Aktivite)”	
Tris (pH 7.8)	50 mM
Mg(CH ₃ COO) ₂	5 mM
KCl	20 mM
DTT	0.5 M

- ✓ Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC: 20S Proteozomal aktivite ölçümünde kullanılan Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC 40 mM konsantrasyonda DMSO (Dimetil sülfoksit) içinde çözündürüldü.

- ✓ Lowry yönteminde kompleks oluşturma belirteci: A çözeltisi: B çözeltisi: C çözeltisi = 100:1:1 hacminde karıştırılarak oluşturuldu.

- A çözeltisi: % 2(w/v) Na₂CO₃ suda çözündürüldü.
- B çözeltisi: % 1(w/v) CuSO₄.5H₂O suda çözündürüldü.
- C çözeltisi: % 2(w/v) Na-K tartarat suda çözündürüldü.

- ✓ 2N NaOH: Lowry yönteminde kullanılmak üzere uygun miktar suda çözündürülerek hazırlandı.

- ✓ 1N Folin belirteci

3.3. S. POMBE HÜCRELERİNİN ÜRETİLMESİ VE SAKLANMASI

Çalışmada kullanılan *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant ırk hücreleri +4°C’deki silika jel stoklardan alındı. MMA (guanin ve urasil içeren) besiyerine ekildi ve 30°C’de 5 gün üretildi. Üreyen kolonilerden biri seçildi ve bu tek koloniden azaltma yöntemiyle elde edilen saf kültürler çalışma boyunca +4°C’de saklandı. Çalışma boyunca hücrelerin genotipik kontrolleri belirli aralıklarla tekrarlandı. Ayrıca kontrolleri yapılan hücrelerin tekrar kullanılmak üzere gliserol stokları alındı.

3.4. S. POMBE HÜCRELERİNİN GENOTİPİNİN KONTROL EDİLMESİ

Çalışmada kullanılacak olan *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant ırkı seçici besiyerine ekilerek genotipi kontrol edildi. Bu amaçla her bir metabolitin konsantrasyonu 50 mg/L olacak şekilde guanin ve urasil içeren MMA, guanin içeren MMA, urasil içeren MMA ve MMA petrilere ekilerek 30°C’de 3 gün üretildi.

3.4.1. *S. pombe*’den Genomik DNA İzolasyonu

Seçici katı besiyerine ekilen *gua1ura4h⁻* mutant ırk ve 972h⁻ yabani tip *S. pombe* hücresine ait tek koloni 1.5 mL’lik mikrosantrifüj tüpünde 100 µL 200 mM LiOAc (lityum asetat), %1’lik SDS (sodyumdodesilsülfat) solüsyonu ile süspanse edildi ve 5 dakika boyunca 70°C’de su banyosunda bekletildi. 300 µL %96-100’lük etanol eklenerek vortekslendi. 15.000 g’de 3 dakika santrifüj sonrası üst sıvı atıldı. Çökelti 500 µl %70’lik etanol ile yıkandıktan sonra 15.000 g’de 3 dakika santrifüjlendi. Çökelti 100 µL distile suda çözündürülerek ve 15.000 g’de 30 saniye çöktürüldü. Üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. PCR reaksiyonlarında 1 µL kalıp olarak kullanıldı. Kalan kısım -20°C’de saklandı (Lööke ve diğ., 2011).

3.4.2. *Gua1ura4h⁻* Mutant Irkının Genomik Düzeyde Kontrolü

Fenotipik kontrol ve genomik DNA izolasyonu sonrası mutant ırk *ura4* genine özgü uygun primerler (Tablo 3.22) ve “ThermoScientific dreamTaq DNA Polymerase” enzimi kullanılarak *ura4* geni PCR ile kontrol edildi. Tablo 3.23’te verilen bileşenler Tablo 3.24’teki koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.22: *Ura4* genine ait primer dizileri.

	Diziler	Tm (°C)	Ürün boyutu
<i>Ura4</i> Geni	F: 5' GAGGATTTTCGACCAGGATATG 3'	52°C	□ 558 bç
	R: 5' GGCTTCGACAACAGGATTA 3'		

Tablo 3.23: *Ura4* geni çoğaltımında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin Adı	Miktarı (μL)	Son Konsantrasyon
Reaksiyon tamponu (10X) (+MgCl ₂)	2	1X
2 mM dNTP	2	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	0.625 mM
Forward primer (10 pmol/μL)	0.5	0.25 pmol/μL
Reverse primer (10 pmol/μL)	0.5	0.25 pmol/μL
Kalıp (100 ng/μL)	1	5 ng/μL
Enzim (5 U/μL)	0.2	0.05 U/μL
Distile Su	13,3	-
Toplam	20	-

Tablo 3.24: *Ura4* geni çoğaltımında kullanılan PCR döngüsü.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95	3 dak.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	35
Bağlanma	52	30 sn.	
Uzama	72	1 dak.	
SonUzama	72	10 dak.	1

3.5. *S.POMBE* HÜCRELERİNDE ÜREMENİN İZLENMESİ

Gua1ura4h⁻ mutant ırk ve transformant ırklarının üreme eğrisini çıkarmak amacıyla ikili mutant ırk EMM (guanin+urasil), transformant ırklar guanin içeren EMM besiyerine 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekilerek 30°C'de 180 rpm'de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Belirli aralıklarla 600 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri alındı. Üç tekrarlı yapılan ölçüm değerlerinin ortalaması alındı ve kültürlerin zamana bağlı üreme grafiği çıkartıldı.

Kültürdeki üreme, spektrofotometrede belirli zaman aralıklarında elde edilen absorbans değerlerinin mL'deki hücre sayısına çevrilmesiyle belirlendi. Absorbans değerleri, mL'deki hücre sayısı bilinen farklı sulandırımalarla hazırlanan standart grafiklerden yola çıkarak hücre/mL cinsine çevrildi. Generasyon süresi literatüre uygun şekilde belirlendi (Karaer, 2001).

3.6. *PSGP572* PLAZMİDİNİN *E. COLI*'DE ÇOĞALTILMASI

Ticari olarak temin edilen *pSGP572* plazmidi süper yeterli *E. coli DH5α* ırkı hücrelere aktararak bol miktarda elde edildi.

3.6.1. Süper Yeterli Hücre Eldesi

Bakteriler transformasyon öncesi plazmidin hücre içine girebilmesi için süper yeterli hale getirildi. *E. coli DH5α* ırkına ait tek koloniden 5 mL LB'ye ekim yapıldı ve 37°C'de 1 gece boyunca 150 rpm'de üremeye bırakıldı. Elde edilen bir gecelik kültürden 1 mL alınarak 250 mL "Super Optimal Broth (SOB)"besiyeri içeren 2 L'lik erlene ekim yapıldı. 18°C'de, 200 rpm'de hücre yoğunluğu $A_{600} \approx 0.6$ olacak şekilde 2 gece üretildi. Kültür 10 dakika buz içinde tutulduktan sonra 4°C'de 10 dakika 1500 g'de santrifüj edildi. Çökelti 80 mL soğuk TB solüsyonunda çözündürüldü ve 10 dakika buz içinde bekletildikten sonra 1500 g'de santrifüjlendi. Hücre çökeltisi 20 mL TB solüsyonunda tekrar süspanse edildi. Son konsantrasyonu %7 olacak şekilde DMSO eklenerek karıştırıldı ve buz içinde 10 dakika bekletildi. 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µL'lik hacimler halinde bölünerek sıvı azot içinde dondurulan hücreler -80°C'de saklandı.

3.6.2. pSGP572 Plazmidinin *E.coli*'ye Transformasyonu

pSGP572 plazmidi, çoğaltılması için süper yeterli hale getirilmiş olan *E.coli DH5α* ırkına transforme edildi. Bu amaçla -80°C'de saklanan 100 µL süper yeterli *E. coli DH5α* hücreleri buzda çözündürüldü. Üzerine 1µg plazmid eklenerek 30 dakika buzda bekletildi. Ardından 90 saniye 42°C'de ısı şoku etkisinde bırakıldıktan sonra 2-3 dakika buzda tutuldu, karışıma 0.5 mL LB besiyeri eklendi ve 1 saat boyunca 37°C'de 150 rpm'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler 50 mg/L ampisilin içeren LBA'lı petrilere yayma ekim yöntemiyle ekildi ve 37°C'lik etüvde 1 gece üremeye bırakıldı.

3.7. *E. COLI*'DEN PSGP572 PLAZMİDİNİN İZOLASYONU VE KONTROLÜ

İnsan MAPT geni ligasyonu öncesi, pSGP572 plazmidi bol miktarda elde edildi. Bu amaçla transformasyon sonucu elde edilen pSGP572 plazmidi içeren *E. coli DH5α* ırkı hücrelerden plazmid izolasyonu gerçekleştirilerek, elde edilen ürünlerin kontrolleri yapıldı.

3.7.1. pSGP572 Plazmidi İçeren *E. coli DH5α* Hücrelerinin Üretilmesi ve İzolasyonu

pSGP572 plazmidi içeren transformant tek koloni *E.coli DH5α* alınarak 5 mL ampisilinli LB besiyerine ekildi, 37°C'de 150 rpm'de çalkalamalı etüvde üremeye bırakıldı.

Gece boyu üretilen *pSGP572* plazmidi içeren *E.coli DH5α* hücreleri ($1-2 \times 10^9$ h/mL) 3500 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı uzaklaştırılarak hücreler 100 µL parçalama tamponuyla (0.05 M glukoz, 0.025 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA) karıştırıldı, 4 µL RNaz A (20 mg/mL) eklendi. Mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 200 µL alkali SDS (0.2 M NaOH, %1 SDS) ilave edildi ve 5 dakika oda sıcaklığında tutuldu. 150 µL 5 M potasyum asetat ilave edilerek 30 dakika buzda bekletildi. 10.000 g'de 5 dakika santrifüjlenerek üst sıvı temiz bir 1.5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Daha sonra 13.000 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı tekrar yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak 400 µL izopropanol eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında tutulduktan sonra 13.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen çökelti 1 mL soğuk %80'lik etanol ile yıkanarak 13.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Elde edilen çökelti 20 dakika oda sıcaklığında kurutuldu ve 50 µL distile suda çözdürüldü.

3.7.2. *pSGP572* Plazmidinin Miktar ve Saflık Belirlenmesi

İzolasyonu yapılan *pSGP572* plazmidinin saflık ve miktarı "Nanodrop 2000c" adlı cihazda ölçüldü. Öncelikle plazmidlerin çözdürüldüğü distile sudan 1.5 µL kör olarak cihaza okutuldu, ardından örneklerden 1.5 µL alınarak saflık ve miktarları belirlendi.

3.7.3. *pSGP572* Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

İzole edilen *pSGP572* plazmidi *EcoRI* (Fermentas) restriksiyon endonükleazıyla tekli kesildi. Ayrıca *pSGP572* plazmidi *EcoRI+NotI*, *EcoRI+Sall*, *EcoRI+BglII*, *PstI+XhoI* ve *PstI+NotI* enzimleri olacak şekilde ikili olarak da kesime uğratarak kontrol edildi. Kesim reaksiyonu Tablo 3.25'te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi, örnekler 37°C'de bekletildi. *pSGP572* plazmidi örneklerinin kontrolleri %1'lik (w/v) agaroz jelde yapıldı.

Tablo 3.25: Restriksiyon endonükleazıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
Plazmid DNA'sı (~400 ng/µl)	1 µL
Enzim	1 µL
Tampon (10x Buffer)	2 µL
Distile su (Tekli/İkili kesim)	16/15 µL
Total Hacim	20 µL

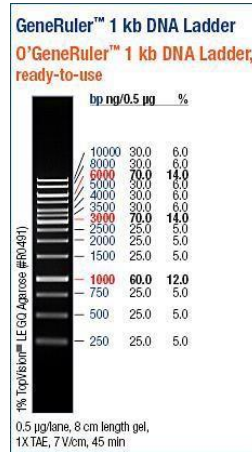
3.7.4. *pSGP572* Plazmidinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrol Edilmesi

Agaroz jel (%1'lik (w/v)) hazırlamak için Tablo 3.26'da belirtildiği şekilde hazırlanan 50 mL 1X TAE tamponuna 0,50 g agaroz (Sigma-Aldrich Agarose, Type II) eklenerek mikrodalga fırında ~2 dakika eritildi. Bir süre oda sıcaklığında bekletilerek ~50-55°C'ye gelen agaroz jele 0,5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel daha önceden hazırlanmış ve tarak yerleştirilmiş yatay elektroforez kasetine yavaşça dökülerek oda sıcaklığında 25-30 dakika katılaşmaya bırakıldı.

Katılaşan jel 1XTAE ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi. Her bir kesim örneğinden 10 µL alındı, 2 µL 6X yükleme tamponu (Fermentas) ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi. Elektroferezde marker olarak "GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, SM0311)" kullanıldı (Şekil 3.2). Agaroz jel, 70 voltta (10 V/cm) 45 dakika yürütüldükten sonra 302 nm dalga boyunda görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Tablo 3.26: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tampon içerikleri.

Çözelti	İçerik
10X TAE (Tris-Asetat EDTA) Tamponu	10 mM EDTA (pH:8.0), %1.2 glasiyel asetik asit, 400 mM Tris
6X Yükleme Tamponu	60 mM EDTA, %0.03 bromofenol mavisi, %0.03 ksilenisiyanol FF, 10 mM Tris-HCl (pH:7.6), %60 gliserol



Şekil 3.2: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan DNA markerı.

3.8. İNSAN MAPT GEN DİZİLERİNİN ÇOĞALTILMASI

İnsan MAPT geni sentetik olarak tasarlandı ve ticari olarak satın alındı. Bu sentetik dizi üzerinden MAPT geninin çoğaltılması gerçekleştirildi.

3.8.1. İnsan MAPT Genine Uygun Primerlerin Tasarlanması

Literatür taraması sonucu çalışmanın amacına uygun olan MAPT geni varyantının ikinci varyant olduğu belirlendi. Bu varyantın dizisi sentetik olarak elde edildi. Bu amaçla dizi *pcDNA3.1*/C-(K)DYK* adlı plazmid içerisinde taşınarak ticari olarak satın alındı. İnsan MAPT geni 2. varyantına uygun geri (“reverse”) ve ileri (“forward”) primerler gen dizisinin tamamını çoğaltmaya uygun olarak tasarlandı. Bu primerlere, genin plazmide ligasyonunda gerek duyulan uygun uçların oluşturulması için *SalI* ve *BamHI* enzimlerine ait kesim dizileri yerleştirildi. Tablo 3.27’de primerlere ait dizi bilgisi verilmiştir.

Tablo 3.27: MAPT genine ait primer dizileri.

	Diziler	T _m (°C)
<i>mapt</i>	F:5' tttgtcgacATGGCTGAGCCCCGCCAG 3'	55
	R: 5' aaggatccCAAACCCTGCTTGGCCAGGGA 3'	55

3.8.2. İnsan MAPT Genini İçeren *pcDNA3.1*/C-(K)DYK* Plazmidinin Çoğaltılması

Ticari olarak satın alınan ve insan MAPT genini içeren *pcDNA3.1*/C-(K)DYK* plazmidini bol miktarda elde etmek ve stoklamak amacıyla 100 µL süper yeterli *E. coli DH5α* ırkı hücre süspansiyonuna 1 µg plazmid DNA’sı transforme edildi ve elde edilen transformantlardan plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. Hem plazmidi içeren *E. coli* hücreleri hem de izole edilmiş plazmid DNA’sı stokları hazırlandı. İzolasyon sonrası plazmidin saflık ve miktarı “Nanodrop 2000c” adlı cihazda ölçüldü.

3.8.3. İnsan MAPT Gen Dizisinin PCR ile Çoğaltılması

İnsan MAPT geni Tablo 3.27’de verilen primerler kullanılarak çoğaltıldı. Reaksiyonda “Thermo Scientific Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” enzimi ve kalıp olarak insan MAPT geni taşıyan *pcDNA3.1*/C-(K)DYK* plazmid DNA’sı kullanıldı. Kontrol olarak *gua1ura4h⁻* ırk genomik DNA’sı ile aynı reaksiyon gerçekleştirildi. Tablo 3.28’de belirtilmiş olan bileşenler 0.2 mL’lik mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı ve Tablo 3.29’da verilen

koşullarda “Bio-RAD T100 Thermal Cycler” adlı cihaz kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Gen ürününü bol miktarda elde etmek için aynı reaksiyondan 10 ayrı tüp hazırlandı. Çoğaltılan diziler agaroz jelde yürütülerek jelden geri kazanıldı. PCR ürününün jelden geri kazanımı “Qiagen QIAquick PCR Purification Kit” ile firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi. Safılaştırılan PCR ürününden alınan 5 µL örnek 1 µL 6X yükleme tamponu (Fermentas) ile karıştırıldı ve agaroz jele yüklendi.

Tablo 3.28: İnsan MAPT geni çoğaltımında kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşenin Adı	Miktarı (µL)	Son Konsantrasyon
Reaksiyon tamponu (5X) (+MgCl ₂)	4	1X
2 mM dNTP	2	0.2 mM
MgCl ₂ (25 mM)	1	1.25 mM
DMSO (%100)	0.6	% 3
Forward primer (10 pmol/µL)	0.5	0.25 pmol/µL
Reverse primer (10 pmol/µL)	0.5	0.25 pmol/µL
Kalıp (100 ng/µL)	1	5 ng/µL
Enzim (5 U/µL)	0.2	0.05 U/µL
Distile Su	10.2	-
Toplam	20	-

Tablo 3.29: İnsan MAPT geni çoğaltımında PCR döngüsü.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	98	30 sn.	1
Denatürasyon	98	10 sn.	35
Bağlanma	55	30 sn.	
Uzama	72	1 dak.	
Son Uzama	72	10 dak.	1

3.9. İNSAN MAPT GENİ İÇEREN *PSGP572* PLAZMİDİNİN HAZIRLANMASI

S. pombe'ye transformasyon öncesi insan MAPT geni, birlikte hücreye aktarılacağı *pSGP572* plazmidi ile ligasyona bırakıldı. Bu amaçla plazmid ve PCR ile çoğaltılan insan MAPT gen ürünü uygun restriksiyon endonükleazlarıyla kesilerek ligasyona hazır hale getirildi. Ardından vektör (taşıyıcı DNA parçası) ve insert (hedef gen ürünü) bir araya getirilerek istenen rekombinant ürün oluşturuldu.

3.9.1. MAPT Geninin *pSGP572* Plazmidine Ligasyonu

İnsan MAPT geni çoğaltım ürünü ve *pSGP572* plazmidi komplementer restriksiyon endonükleazlarıyla kesilerek uygun uçlar oluşturuldu ve ürünler bir araya getirilerek ligasyonları gerçekleştirildi. Bu amaçla MAPT genine ait PCR ürünleri *SalI* ve *BamHI*

restriksiyon endonükleazlarıyla, *pSGP572* plazmid DNA'sı *XhoI* ve *BglII* restriksiyon endonükleazlarıyla kesime bırakıldı. Önce *BglII* ve *BamHI* enzim kesimleri ayrı ayrı gece boyu 37°C'de su banyosunda gerçekleştirildi. Ertesi gün kesim reaksiyonu hacminin 2 katı hacimde % 0,02'lik KAc/EtOH ile 14.000 g'de 20 dakika çöktürülen örnekler 20 µL nükleaz içermeyen distile suda çözöldü. Bu örnekler *XhoI* ve *SalI* enzimleriyle aynı şekilde ikinci kesime bırakıldı. Kesim reaksiyonu bileşenleri Tablo 3.30'da verildi.

Tablo 3.30: *pSGP572* plazmidi ve MAPT geni PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleazlarıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.

1. Kesim Reaksiyonları			
<i>pSGP572</i> plazmidi		MAPT geni PCR ürünü	
10X <i>BglII</i> Tamponu (Buffer O)	4 µL	10X <i>BamHI</i> Tamponu (Buffer R)	9 µL
Plazmid DNA'sı	34 µL	MAPT PCR ürünü	80 µL
Enzim (<i>BglII</i>)	2 µL	Enzim (<i>BamHI</i>)	2 µL
Distile su	-	Distile su	-
Toplam hacim	40 µL		91 µL
2. Kesim Reaksiyonları			
10X <i>XhoI</i> Tamponu (Buffer R)	3 µL	10X <i>SalI</i> Tamponu (Buffer O)	3 µL
Plazmid DNA'sı	20 µL	MAPT PCR ürünü	20 µL
Enzim (<i>XhoI</i>)	2 µL	Enzim (<i>SalI</i>)	2 µL
Distile su	5 µL	Distile su	5 µL
Toplam hacim	30 µL		30 µL

Kesim sonrası ürünler %1'lik agaroz jelde 45 dakika yürütöldü. Ardından kesim ürünleri "Qiagen QIAquick PCR Purification Kit" ile firmanın önerdiği koşullarda jelden geri kazanıldı. Geri kazanım sonrası ürünlerin saflık ve miktarları "Nanodrop 2000c" adlı cihazda ölçöldü. Ayrıca %1'lik agaroz jelde kontrolleri gerçekleştirildi. Miktarı ve saflığı belirlenen kesilmiş MAPT geni, *pSGP572* plazmidi ile ligasyona bırakıldı. Ligasyon sırasında "Roche T4 DNA ligase" enzimi kullanıldı. Ligasyon işlemi için Tablo 3.31'de verilen bileşenler 200 µL hacimli mikrosantriföj tüpünde ligasyon 3:1 (insert/vektör) oranında olacak şekilde karıştırıldı ve oda ısısında 15 dakika inkübasyon sonrası ligasyon karışımı süper yeterli *E.coli DH5α* hücrelerine transforme edildi. Transformasyon Bölüm 3.6.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 3.31: Ligasyon reaksiyonu bileşenleri ve miktarları.

Bileşenler	Miktarlar
10X T4 Ligaz Tamponu	3,3 µL
Vektör (X) (11,8 ng/µL)	15 µL
Insert (3X) (19.1 ng/µL)	5 µL
PEG	5 µL
ATP	5 µL
T4 DNA Ligaz	1 µL
Distile su	-
Toplam hacim	34,3 µL

3.9.2. Transformant *E.coli* Kolonilerinin PCR ile Kontrol Edilmesi

Seçici besiyerinde üreyen *E. coli* hücrelerinin kalıp olarak kullanılmasıyla MAPT genine ait primerlerle koloni PCR gerçekleştirildi. Bu amaçla Tablo 3.28’de verilen miktarlarda reaksiyon bileşenleri kullanılarak aynı koşullarda PCR ile rekombinant plazmidlerin kontrolleri yapıldı.

3.9.3. Rekombinant Plazmidin Çoğaltılması ve İzolasyonu

PCR ile kontrol edilen insan MAPT geni içeren *pSGP572* plazmidi taşıyan *E.coli* hücreleri ampisilin (50 mg/L) içeren LB besiyerinde bir gece boyunca üretildi. İzolasyonları sonrası plazmid konsantrasyonu “Nanodrop 2000c” adlı cihazda ölçüldü ve plazmidlerin doğruluğu restriksiyon endonükleazıyla kesilerek kontrol edildi. Ayrıca genin varlığı PCR ile gösterildi.

3.9.4. Rekombinant Plazmidlerin Restriksiyon Endonükleazlarıyla Kontrol Edilmesi

Plazmid izolasyonu sonrası insan MAPT geni içeren *pSGP572* plazmidi *HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleazlarıyla ile Tablo 3.30’daki bileşenler bir araya getirilerek ayrı ayrı 37°C’de 1,5 saat boyunca kesime bırakıldı ve kesim ürünleri %1’lik agaroz jelde 75V’da 45 dakika elektroforezde yürütülerek kontrol edildi.

Tablo 3.32: Restriksiyon endonükleazıyla kesim reaksiyonu bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
Plazmid DNA’sı (~272,7 ng/µl)	3 µL
Enzim	1 µL
Tampon (10x Buffer)	2 µL
Distile su	14 µL
Total Hacim	20 µL

3.9.5. MAPT Geni İçeren *pSGP572* Plazmidinin Dizileme ile Kontrol Edilmesi

MAPT geni taşıdığı düşünülen *pSGP572* plazmidinin kalıp olarak kullanılmasıyla MAPT genine ait ileri primer ile plazmidde yer alan “green fluorescent protein”e ait reporter gen olan *gfp* genine ait geri primer (Tablo 3.33) kullanılarak hedef bölge çoğaltıldı. Bu amaçla Tablo 3.28’de verilen miktarlarda reaksiyon bileşenleri kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR ürünü jelden geri kazanılarak saflaştırıldı ve hizmet alımıyla dizilemeye gönderildi.

3.10. *S. POMBE*’YE *PSGP572*+*MAPT* PLAZMİDİNİN TRANSFORMASYONU

Kesim reaksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu ve dizileme ile MAPT geni içerdiği kanıtlanan *pSGP572* plazmidi (*pSGP572*+*mapt* olarak adlandırıldı.) *S. pombe*’ye lityum asetat yöntemiyle transforme edildi.

3.10.1. *pSGP572*+*mapt* Plazmidlerinin Lityum Asetat Yöntemi ile Transformasyonu

pSGP572+*mapt* plazmidi konak olarak kullanılan *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant ırkına □3,5 µg olacak şekilde Kanter-Smoler ve arkadaşlarının (1994) önerdiği transformasyon yöntemiyle aktarıldı. Kontrol grubu oluşturmak için aynı anda *gua1ura4h⁻* mutant ırka MAPT geni içermeyen *pSGP572* plazmidinin transformasyonu da yine □3,5 µg olacak şekilde gerçekleştirildi (Karaer, 2001). 20 mL YNB besiyerine 10⁶ hücre/mL olacak şekilde ekilen konak hücreler OD₆₀₀ değeri □0.5 olana kadar üretildi. Hücreler 6500 g’de 10 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı. Çökelti 1 mL steril distile suda çözündürüldü ve üzerine 200 µL LiAC/EDTA eklendi, 6500 g’de 10 dakika boyunca çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırılarak, çökelti 50 µL LiAC/EDTA tamponunda süspanse edildi. %40 PEG solüsyonundan 300 µL eklenerek (LiAC-PEG) karıştırıldı. Bu karışıma □3,5 µg plazmid DNA’sı eklendi. 30°C’de 30 dakika boyunca ara sıra karıştırılarak bekletildi. Ardından 15 dakika 42°C’de ısı şoku uygulanarak hücreler santrifüj ile toplandı. Hücre çökeltisi 1 mL TE tamponu içinde çözündürüldü ve 200 µL *pSGP572*+*mapt* plazmid ve *pSGP572* plazmidini içeren transformantların üremeleri için seçici besiyeri olan MMA+G besiyerine yayma ekim yöntemiyle ekilerek 30°C’lik etüvde □7 gün inkübe edildi.

3.10.2. Pozitif Transformantların Seçici Besiyerlerinde Kontrol Edilmesi

Seçici besiyerinde üreyen *pSGP572+mapt* plazmidi aktarılmış *gua1ura4h⁻* mutant ırkı ve aynı zamanda *pSGP572* plazmidi transforme edilmiş *gua1ura4h⁻* mutant ırk transformant hücreleri tekrar kontrol için MMA, MMA+G ve MMA+G+U petrilere kürdan yardımıyla ekilerek 30°C’lik etüvde üremeleri izlendi. Pozitif transformant *gua1ura4h⁻* kolonileri, çalışmalarda kullanılmak üzere MMA+G+tiamin besiyerlerine ekilerek +4°C stokları alındı.

3.10.2.1. *S. pombe* Transformantların Koloni PCR ile Kontrolü

Transformasyon sonrası seçici besiyerinde seçilen kolonilerin MAPT genine, *mapt-gfp* ve *nmt-mapt* bölgesine özgü primerler (Tablo 3.33) kullanılarak koloni PCR ile kontrolleri gerçekleştirildi. Ayrıca *pSGP572* ve *pSGP572+mapt* plazmidlerinde *nmt-gfp* bölgeleri PCR ile kontrol edildi. Bu amaçla PCR bileşenleri Tablo 3.23’te verildiği şekilde bir araya getirilerek Tablo 3.24’teki koşullarda, reaksiyonda kalıp olarak doğrudan koloniler kullanılarak PCR gerçekleştirildi.

Tablo 3.33: *Gfp* genine ait geri ve *nmt* genine ait ileri primer dizileri.

Gen	Diziler		Tm (°C)
<i>gfp</i>	Geri Primer	5' CTTGTAGTTCCCGTCATCTTT 3'	55
<i>nmt</i>	İleri Primer	5' TTTCAATCTCATTCTCACTTTCTG 3'	55

3.10.3. Tiamin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

pSGP572 plazmidinin taşıdığı *nmt* promotörünü inhibe eden ancak hücreler üzerinde öldürücü olmayan konsantrasyonu belirleyebilmek için farklı konsantrasyonlarda tiamin (Thi) içeren besiyerlerine (MMA+G+Thi) transformant hücrelerin ekimi spot yöntemiyle yapıldı.

3.10.4. Transformantlardan Plazmid Geri İzolasyonu

S. pombe hücrelerinden plazmid geri izolasyonu Hanna ve Xiao (2006)’nın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla plazmid taşıyan *gua1ura4h⁻* hücreleri, seçici MMA+G+Thi içeren petriye öze yardımıyla ekilerek 2 gün 30°C’de inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda hücreler petrilere öze yardımıyla toplanarak 230 µL DNA parçalama tamponu içerisinde süspanse edildi, 0,4 g cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) içeren 1,5 mL’lik mikrosantrifüj

tüplerine aktarıldı ve üzerine 200 µL fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklendi. Hücreler en yüksek hızda vorteks kullanılarak parçalandı. Parçalama sonrası tüplerin altı delinerek, hücre içeriği spinleme ile yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. 16.000 g'de 5 dakika santrifüjlendi, üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 600 µL %96'lık etanol eklendi ve -20°C'de 30 dakika tutuldu. Plazmid DNA'sı 16.000 g'de 15 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Üst sıvı atıldı, tüpler 30 dakika kurumaya bırakıldı ve çökelti 20 µL nükleaz içermeyen steril su içinde çözündürülerek 200 µL süper yeterli *E. coli* hücrelerine Bölüm 3.6.2'de anlatıldığı şekilde transforme edildi. Üreyen koloniler ampicilin içeren LB besiyerinde üretilerek plazmid izolasyonu yapıldı ve izolasyon sonrası *HindIII* restriksiyon endonükleazıyla kesilerek kontrolleri gerçekleştirildi.

Ayrıca geri izolasyon sonrası elde edilen plazmidler kalıp olarak kullanılarak MAPT genine özgü primerlerle Tablo 3.23'te ve Tablo 3.24'teki koşullarda PCR gerçekleştirildi.

3.11. TRANSFORMANT HÜCRELERİN FLORESAN MİKROSKOPTA GÖRÜNTÜLENMESİ

Transformant ırklar ve konak ırk mikroskopik olarak floresan mikroskopunda incelendi. Bu amaçla öncelikle hücreler fiksle edildi. Ardından DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) ile boyandı. Hazırlanan örnekler Olympus BX53 marka floresan mikroskopta görüntülendi.

3.11.1. Hücrelerin Fiksasyonu

Transformant *gua1ura4h⁻* hücreleri ve kontrol grubu hücrelerin 24 saat boyunca sırasıyla guanin ve tiamin (gua+thi) ve guanin + urasil (gua+ura) içeren EMM besiyerinde inkübe edildi. Üretilen transformantlar ile konak hücre toplanarak aynı hacimde tiaminsiz ve uygun metabolitleri içeren EMM besiyerine ekildi. 20. saat sonunda bu kültürlerden 1 mL alınarak 1150 g'de 10 dakika çöktürüldü. Çökelti üzerine 1 mL %10'lük formaldehit eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası 3 defa PBS ile yıkandı ve son olarak 200 µL PBS'te çözündürüldü. Örnekler floresan mikroskopta incelenene kadar -20°C'de alüminyum folyoya sarılarak bekletildi. Aynı örnekler ayrıca DAPI ile boyandı. DAPI ile boyamak için PBS'te çözündürülen hücrelere final konsantrasyon 2 µg/mL olacak şekilde boya eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler 1150 g'de 5 dakika boyunca 500 µL PBS ile santrifüjlenerek yıkandı. Hazırlanan örnekler 100 µL PBS'te çözündürülerek incelemeye kadar -20°C'de alüminyum folyoya sarılarak saklandı.

3.11.2. Hücrelerin Floresan Mikroskopta İncelenmesi

Hücre örnekleri 10 µL olacak şekilde polilizin kaplı lam üzerine damlatıldı ve bir süre kurumaya bırakıldı. Kuruma sonrası 10 µL kapama solüsyonu (Tablo 3.34) eklenerek lamel kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Olympus BX53 marka floresan mikroskopta incelendi.

Tablo 3.34: Kapama solüsyonu içeriği.

PBS	100 µL
Gliserol	900 µL
p-Fenilendiamin	1 µg

3.12. ELDE EDİLEN TRANSFORMANTLARIN FARKLI GLUKOZ KOŞULLARINDA ÜRETİLMESİ

Elde edilen transformantlar ve kontrol grubu hücreler farklı glukoz koşullarında üretildi. Bu amaçla 24 saat boyunca EMM+gua+thi besiyerinde üretilen transformant hücrelerle EMM+gua+ura besiyerinde üretilen konak hücre yıkanarak toplandı ve aynı hacimde tiaminsiz, uygun metabolitleri içeren EMM besiyerine ekildiler. 20. saat sonunda bu kültürlerdeki hücreler santrifüjle toplandı ve düşük (%0,5), orta (%3) ve yüksek (%5) konsantrasyonda glukoz içeren, üç farklı 20 mL MML besiyerinde (*gua1ura4h⁻* için *gua⁺* ura, transformantlar için *gua* içeren) 4 saat 30°C’de 180 rpm’de çalkalamalı etüvde inkübasyona bırakıldı. Üreyen hücrelerden RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

3.13. FARKLI KOŞULLARDA ÜRETİLEN HÜCRELERİN GEN ANLATIM DÜZEYİNDE ANALİZLERİ

Farklı glukoz koşullarında üretilen transformant ırk ve konak hücrelerden RNA izolasyonu sonrası cDNA sentezi gerçekleştirilerek seçilen genlerin (*gsk3*, *dis2*, *ppa2*, *hxx2*, *fbp1*, *sod1*, *ctt1*, *ire1*, *atg14*) anlatımları incelendi.

3.13.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonu “Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit” kullanılarak gerçekleştirildi. Üretici firmanın önerdiği koşullarda, ancak hücrelerin parçalama aşamasında bazı değişiklikler yapılarak *S. pombe* hücrelerine uygun parçalama yöntemi uygulandı.

Farklı konsantrasyonlarda (%0,5, %3, %5) glukoz içeren 20 mL seçici MML besiyerinde 4 saat üretilen *gua1ura4h⁻* ve transformant hücreler 6500 g'de 10 dakika santrifüjle çöktürüldü. Üst sıvı atılarak 200 µL PBS eklendi ve örnekler 0,8 gr cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) içeren 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. "Sartorius Mikro-Dismembrator S" marka hücre parçalayıcısında 3000 rpm'de 1 dakika boyunca aralarda buzda bekletilerek 3 tekrarlı olarak parçalama gerçekleştirildi. Parçalama sonrası tüplerin altı delinip spinlenerek hücre içeriği yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla 8000 g'de 3 dakika santrifüj sonrası üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. 400 µL "Lysis/Binding Buffer" eklendi ve karıştırıcı ile karıştırılarak örnekler filtreli kolonlara alındı. 8.000 g'de 1 dakika santrifüj sonrası alt sıvı atıldı. Her bir örnek için 90 µl "DNase Incubation Buffer" ve 10 µl "DNase I" karıştırılarak, filtreli kolonlara bu karışımdan 100 µL eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Filtreli kolona 500 µL "Wash Buffer I" eklenerek 8.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 500 µL "Wash Buffer II" ilave edildi. 8.000 g'de 1 dakika santrifüj sonrası 200 µL "Wash Buffer II" ile ikinci yıkama gerçekleştirildi. Filtreli kolon 2 dakika 13.000 g'de santrifüj edilerek temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, 50 µL "Elution Buffer" ile yıkandı. Daha sonra 8.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. RNA'ların miktar ve saflığı "Nanodrop 2000c" adlı cihazda ölçüldükten sonra % 1,2'lik agaroz jelde elektroforez yapılarak RNA'ların varlığı saptandı. Ardından RNA'lar cDNA'ya çevrildi. RNA stokları -80°C'de saklandı.

RNA örnekleri 2000 ng olacak şekilde "Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda cDNA'ya çevrildi. Tablo 3.35'deki bileşenler 200 µL'lik mikrosantrifüj tüpünde bir araya getirildi ve 10 dakika 65°C'de bekletildi. Sonrasında Tablo 3.36'da verilen bileşenler eklenerek 20 µL'lik son hacim elde edildi. Örnekler 30 dakika boyunca +50°C'de inkübe edildi ve 5 dakika 85°C'de bırakıldı. Reaksiyon sonrası cDNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi.

Tablo 3.35: RNA örneklerini cDNA'ya çevirirken kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	2000 ng
Anchored-oligo(dT) primer	50 pmol/mL	2.5 µM
Distile su	Hacim 11.4 µL'ye tamamlanır	
Total	11.4 µL	

Tablo 3.36: RNA örneklerini cDNA'ya çevirirken kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Bileşenler	Miktar	Son Konsantrasyon
5X Reaksiyon tamponu	4 µL	1X 8mM MgCl ₂
RNase inhibitörü (40 U/mL)	0.5 µL	20 U
dNTP karışımı (10 mM)	2 µL	1mM (her biri)
DTT	1 µL	5 mM
Reverse Transkriptaz	1.1 µL	22 U
Total hacim	20µL	

3.13.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PCR) ile tau proteininin fosforilasyonunda rol oynayan bir kinaz olan *gsk3*; tau proteininin defosforilasyonunda görev alan fosfatazlar *dis2* ve *ppa2*; enerji metabolizması ile ilişkili *hvk2* ve *fbp1*; stres yanıt genleri *sod1* ve *ctt1*; ER stresi ile ilişkili *ire1*; otofaji ile ilişkili *atg14* ve çalışmada işaret geni olarak kullanılan yeşil floresan proteine ait *gfp* genlerinin anlatımları incelendi. “Housekeeping” gen olarak *gpdh* geni kullanıldı.

3.13.2.1. GZ-PCR Primer Tasarımı

NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanındaki bilgilerden yola çıkılarak *S.pombe gsk3*, *dis2*, *ppa2*, *gfp* ve insan MAPT genlerine ait diziler bulundu. Primer tasarımı “IDT Primer Quest Tool (<https://eu.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>)” programıyla gerçekleştirildi. GZ-PCR için tasarlanan primer dizileri, genlere ait mRNA dizileri üzerinden, ürün boyutları □120 nt ve genin 3' ucuna yakın olacak şekilde seçildi. Daha önceki çalışmalarda tasarlanan *gpdh*, *hvk2*, *fbp1* (Kına, 2016), *ire1*, *atg14* (Özarabacı, 2019) ve *sod1*, *ctt1* primerlerine ait diziler kullanıldı (Tablo 3.37).

Tablo 3.37: GZ-PCR reaksiyonunda kullanılan primerlere ait diziler ve özellikleri.

Gen	İleri Primer	Geri Primer	Tm(°C)
<i>gpdh</i>	5' ggtgacaaccactcctccat 3'	5' tcaacaacacggtgggagta 3'	55
<i>mapt</i>	5' caagtgtggctcaaaggataat 3'	5' ggtttatgatggatgttcctaa 3'	55
<i>gsk3</i>	5' gatgcttctcctcgtcatt 3'	5' catcaagtttcacgggtaaag 3'	55
<i>dis2</i>	5' ggtgtggaagacgggta 3'	5' gctctcgtcaacactcat 3'	55
<i>ppa2</i>	5' tattgtatcgtgtggaatc 3'	5' ggtgtccttcgagctatt 3'	55
<i>hvk2</i>	5' caacaaggactttgcccaat 3'	5' aagggtgtcgtctcctttga 3'	55
<i>fbp1</i>	5' gtatgggtgcttcggctcatt 3'	5' tcatgtttcgatgggtcaa 3'	55
<i>sod1</i>	5' attggcgtaccattgtcat 3'	5' gacaccacaagcgttacgtg 3'	55
<i>ctt1</i>	5' atcctcaatccgaccacttg 3'	5' aacgtcggtaatttcgtcca 3'	55
<i>ire1</i>	5' attctcgacattctcggtg 3'	5' aactgtgaatccgtctggt 3'	55
<i>atg14</i>	5' tcacctagtttactcaaca 3'	5' cggcaaatgtccataaaaactc 3'	55
<i>qgfp</i>	5' tggaagcgttcaattagca 3'	5' ggaccatgtgatctctcttc 3'	50

3.13.2.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PCR için "Bio-Rad CFX96" cihazı kullanıldı. GZ-PCR analizi "Bio-Rad CFX Manager Software" yazılımı ile gerçekleştirildi ve analiz sonucu veriler "Pfaffl" metoduyla (Pfaffl, 2001) değerlendirildi. Floresan boya olarak "ThermoScientific Applied Biosystems PowerUp SYBR™ Green PCR Master Mix" kit firmanın önerdiği koşullarda kullanıldı. Gen anlatımındaki değişiklikleri belirlemek amacıyla, referans gen olarak hücre dışı koşulların etkisiyle anlatımı değişmeyen *S. pombe gpdh* geni seçildi.

GZ-PCR'da ilk aşama olarak PCR bileşenleri bir araya getirildi. Tablo 3.37'de belirtilen primerler, 100 µM stoktan alınıp 10 kat sulandırıldı. Tablo 3.38'de yer alan bileşenler karıştırıldı. Her bir örnek için 19 µl karışım, 96 kuyucuklu "LightCycler 480 Multiwell Plate" plakanın kuyucuklarına konuldu. 1 µl cDNA (100 ng) kuyucuklara eklendi. Kontrol grubu cDNA'ları 1, 1/5, 1/25 ve 1/125 kat sulandırılarak standart oluşturuldu. Kalıp içermeyen kontrol ("non-template control, NTC") için kalıp cDNA miktarı kadar saf su eklendi. "LightCycler 480 Multiwell Plate", "LightCycler 480 Multiwell Sealing Foil" ile kapatılarak 1500 g'de 30 saniye spin edildi. "Bio-Rad CFX96" cihazına yerleştirildi ve Tablo 3.39'da verilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi. Gen anlatımı düzeyindeki değişiklikler, hedef genin döngü sayısının referans genin döngü sayısına oranlanmasıyla belirlenerek, örnekler "Relative Quantification" analizi uygulandı (Pfaffl, 2001). Elde edilen verilerin istatistiksel analizi, "GraphPad Prism 7" yazılımında iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) ile yapıldı.

Tablo 3.38: GZ-PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenin Adı	Miktarı (µL)	Son Konsantrasyon
SYBR Green Master Mix (2X)	10	1X
Forward primer (10 pmol/µL)	0.5	0.25 pmol/µL
Reverse primer (10 pmol/µL)	0.5	0.25 pmol/µL
Kalıp	1	Farklı konsantrasyonlar
Distile Su	8	-
Toplam	20	-

Tablo 3.39: GZ-PCR koşulları.

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95	10 dak	1
Denatürasyon	95	15 sn	40
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	1 dak	
Erime eğrisi	95	5 sn	1
	65	1 dak	
	97	-	
Soğuma	40	10 sn	1

3.14. BİYOKİMYASAL ANALİZLER

Çalışmada MAPT geninin *S. pombe*'ye aktarılarak anlatım yaptığı düşünülen tau proteininin çeşitli hücresel süreçler (proteozomal aktivite, glukoz tüketimi, hücre içi oksidasyon) üzerine etkisi biyokimyasal analizlerle araştırıldı.

3.14.1. İmmünolojik Saptama

Çalışmada transformant ırkta insan tau proteininin anlatımının yapıp yapılmadığını göstermek amacıyla immünolojik olarak araştırmalar gerçekleştirildi.

3.14.1.1 Protein İzolasyonu

Hücrelerden total protein izolasyonu Zhang ve diğ. (2001) tarafından önerilen yöntemle gerçekleştirildi. Tiamin içeren seçici EMM besiyerinde üretilen konak hücreler ile transformant hücrelerden total protein izolasyonu gerçekleştirildi. Tüm aşamalar buzda, çöktürmek için kullanılan santrifüjleme işlemleri +4°C'de yapıldı. Bu amaçla 24 saat boyunca tiamin içeren 20 mL seçici EMM besiyerinde üretilen konak hücre ve transformant hücreler 10 dakika 6500 g'de santrifüjlenerek PBS ile yıkamak amacıyla toplandı. Daha sonra tiamin içermeyen seçici EMM besiyerine ekildi. Üreyen hücreler 20. saat sonunda 10 dakika 6500 g'de santrifüjlenerek toplandı. Çökelti üzerine 400 µL "Parçalama Tamponu" ve 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpüne 0,8 gr cam boncuk (çap: 0,45-0,50 mm) eklendi ve Bölüm 3.13.1'deki şekilde parçalama gerçekleştirildi. Mikrosantrifüj tüpünün altı delinerek homojenat spinlenerek yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Örnekler 20 dakika boyunca 14.000 g'de santrifüjlenerek üst sıvı yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve ileri çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.14.1.2 Protein Miktar Tayini

Protein izolasyonu sonrası "Smart™ BCA Protein Assay Kit" kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda protein miktar tayini yapıldı.

3.14.1.3 SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Ayırma ve yükleme jelleri hazırlamak için Tablo 3.16'da verilen jel bileşenleri karıştırıldı. Öncelikli olarak ayırma jeli hazırlandı. Bileşenlere en son APS eklendi ve karışım daha önceden

dikey jel elektroforezi için hazırlanmış jel kasetine mikropipet yardımıyla üstte 3-4 cm boşluk kalacak şekilde döküldü. Distile su ile jelin yüzeyi düzgün hale getirilerek jel polimerizasyona bırakıldı. Ardından jel üzerindeki su uzaklaştırıldı, yükleme jeli hazırlanarak 1-2 cm ayırma jelinin üzerine döküldü ve tarak yerleştirildi. Yükleme jelinin de polimerize olması için en az yarım saat beklendi. Bekleme esnasında örnekler hazırlandı, 20 µL protein örnek ile 10µL 2X örnek uygulama tamponu karıştırıldı. Örnekler jele yüklenmeden önce 2-3 dakika 90°C’de bekletilerek denatüre edildi.

Jel polimerize olduktan sonra tarak dikkatlice kaldırıldı. Dikey elektroforez tankı, 1X tank tamponu ile doldurularak hazırlanan jel kaseti, jelin alt kısmında hava kabarcığı kalmayacak şekilde tanka yerleştirildi. Tank tamamen 1X tank tamponu ile dolduruldu ve kuyular bu tamponla yıkandı. Örnekler □60 µg olacak şekilde kuyulara yüklendi. “PageRuler™ Prestained Protein Ladder” marker olarak kullanılır. Örnekler yükleme jelinden ayırma jeline geçene kadar

100 V’da ardından 200 V’da yürütüldü. Jel bir spatula yardımıyla camların arasından çıkarılarak örnekler immünolojik saptama için membrana aktarıldı.

3.14.1.4. Proteinlerin Membrana Aktarımı, “Western Blot” Analizi

Elektroforez sonrası jel transfer tamponuna (Tablo 3.19) konularak 15 dakika çalkalayıcı tablada çalkalandı. Tank aktarım sisteminde (ıslak emdirim) kullanılacak PVDF membran (Thermo Scientific) ve filtre kağıtları jel boyutunda kesildi, kesilen membran metanol içeren bir kaptan ıslatıldı. Ayrıca membran ve filtre kağıtları 2-3 dakika aktarım tamponunda bekletildi. Tank aktarım sisteminde dikey elektro-emdirim aygıtı firmanın önerdiği koşullarda kurularak, aktarım tamponu tanka dolduruldu. Membran anot tarafında yer alacak şekilde jel membranın üzerine yerleştirilerek kaset (süngerler, filtre kağıtları, jel ve membran) hazırlandı. Hazırlanan kaset tanka yerleştirilerek aktarım 100 V’da 95 dakikada gerçekleştirildi.

Aktarım sonrası membran proteinler üst yüzeyde yer alacak şekilde membran bloklama çözeltisi (yağsız süt tozu) içinde çalkalamaya bırakıldı. Daha sonra membran, 1/1000 oranında anti-tau birincil antikorunu (Abcam Anti-Tau antibody [E178]) içeren 5 mL membran bloklama çözeltisi içinde gece boyu +4°C’de tutuldu. Birincil antikor çözeltisiyle muamelenin ardından membran 5 defa 10 dakika aralıklarla PBS-Tween solüsyonuyla yıkandı. Yıkama sonrası “Goat anti-Rabbit IgG-HRP (Santa Cruz)” ikincil antikor çözeltisinde (membran bloklama çözeltisi içinde 1/1000 oranında) 2 saat bekletildi. İkincil antikor çözeltisi 5 defa 10 dakika aralıklarla

PBS-Tween solüsyonuyla yıkanarak uzaklaştırıldı. “ECL Plus Western Blotting Detection System” proteine ait bantların görüntülenmesinde üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı. Membrana aktarılmış proteinleri saptamak için “BioRad Chemidoc MP” cihazıyla ImageLab 5.2.1 yazılımı kullanılarak görüntüleme gerçekleştirildi.

3.14.2. 20S Proteozomal Aktivitenin Ölçülmesi

Transformantlar ve konak ırkta 20S proteozomal aktivite tayini Reinheckel ve arkadaşlarının (2000) önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla 24 saat boyunca tiamin içeren 20 mL seçici EMM besiyerinde üretilen konak hücre ve transformant hücreler 10 dakika 6500 g’de santrifüjlenerek toplanarak PBS ile yıkandı ve aynı hacimde tiamin içermeyen seçici EMM besiyerine ekildi. Üreyen hücreler 10 dakika 6500 g’de santrifüjlenerek toplandı. Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren MML besiyerinde 4 saat üretilen hücreler 6500 g’de +4°C’de 10 dakika santrifüjlenerek çöktürüldü. Çökelti 400 µL parçalama solüsyonu içinde çözdürüldü ve cam boncukla parçalanarak homojenat yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Hücre lizati 14.000 g’de +4°C’de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve üst sıvıdaki protein konsantrasyonu 50 µg/mL’ye “Assay Buffer” ile seyreltildi. Peptidaz aktivitesi ölçümü için 100 µL sulandırılmış protein örneğine 99 µL “Assay Buffer” ve 1 µL Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (amino-4-metilkumarin)(stok 40 mM) eklendi. Karışım reaksiyonun gerçekleşmesi için 37°C’de 1 saat bırakıldı. Reaksiyon eşit hacimde soğuk etanol ve 1.6 mL 125 mM sodyum borat tamponu (Na₂B₄O₇·10H₂O) (pH 9.0) eklenerek durduruldu. Floresan belirleme için eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 390 ve 470 nm olacak şekilde ölçüm alındı (Hamad, 2007). Sonuçların analizi “GraphPad Prism 7” yazılımında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile gerçekleştirildi.

3.14.2.1. “Lowry” Yöntemi ile Protein Miktar Tayini

Lowry yöntemi ile protein miktar tayini Lowry ve arkadaşlarının (1951) önerdiği şekilde gerçekleştirildi. Öncelikle konsantrasyonu bilinen BSA ile standart grafik oluşturuldu. Sonrasında 0,1 mL protein örneği 0,1 mL 2 N NaOH ile karıştırılarak 100°C’de 10 dakika bekletildi. Oda ısısında soğutularak üzerine 1 mL A:B:C çözeltileri hacimce 100:1:1 oranında bir araya getirilerek elde edilen kompleks oluşturma belirteci ilave edildi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. Daha sonra 0,1 mL 1N Folin Belirteci vortekste karıştırılarak eklendi ve 30

dakika karanlıkta bekletildi. Örnekler 550 nm dalga boyunda absorbansları ölçülerek standart grafiğinden yola çıkarak protein konsantrasyonları hesaplandı.

3.14.3. Glukoz Tüketiminin Belirlenmesi

Hücrelerin glukoz tüketimi “Cayman Glucose Colorimetric Assay Kit” kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi. 24 saat boyunca tiamin içeren seçici EMM besiyerinde üretilen konak hücre ve transformant hücreler toplanarak aynı hacimde tiamin içermeyen seçici EMM besiyerine ekildi. 20. saat sonunda bu kültürlerdeki hücreler santrifüjle toplandı, % 0,5 oranında glukoz içeren MML besiyerine 10^7 hücre/mL olacak şekilde ekildi. Her 60 dakikada bir 4 saat boyunca besiyerinden örnekler toplandı ve toplanan bu üst sıvı örnekleri 25 kat sulandırıldı. Sulandırım sonrası bu örnekten 15 μ L alındı ve 85 μ L “Assay Buffer” ile karıştırılarak 100 μ L “Enzyme Mixture” ile reaksiyon gerçekleştirildi. 37°C’de 10 dakika bekletildikten sonra 514 nm’de spektrofotometrik ölçüm alındı. Kit içerisinde yer alan glukoz stoğu ile 0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 ve 25 mg/dL’lik örnekler hazırlanarak standart grafik hazırlandı. Standart grafikten yola çıkarak örneklerin glukoz konsantrasyon değişiklikleri belirlendi ve glukoz tüketim grafiği oluşturuldu.

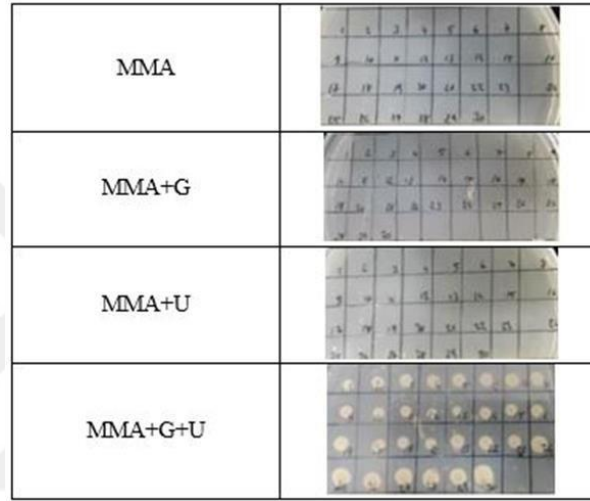
3.14.4. Hücre İçi Oksidasyonun Belirlenmesi

Hücre içi oksidasyon düzeyi Pereira ve diğ. (2003) ile Inoue ve diğ. (1999) tarafından önerilen yöntemlerde bazı değişiklikler yapılarak belirlendi. 24 saat boyunca tiamin içeren 20 mL seçici EMM besiyerinde üretilen konak hücre ve transformant hücreler 10 dakika 6500 g’de santrifüjlenerek çöktürüldü ve aynı hacimde tiaminsiz seçici EMM besiyerine ekildi. 20. saat sonunda bu kültürlerdeki hücreler 10 dakika 6500 g’de santrifüjlenerek toplandı. Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren seçici EMM besiyerinde 4 saat bekletilmiş konak hücre ve transformant hücreler, hücre sayıları eşit olacak şekilde ($OD_{600} \square 1.0$) 3000 g’de 5 dakika santrifüjlendi, üst sıvı tamamen uzaklaştırılarak çöken hücreler 1 mL MML besiyerinde çözüldü. Etanolde hazırlanmış 7,7 mM’lık stok Dichlorofluorescein diacetate (DHCF-DA) çözeltisinden, son derişim 40 μ M olacak şekilde 5,2 μ L eklendi ve 30°C’de 1 saat bekletildi. Ardından hücreler 3500 g’de 5 dakika santrifüjlenerek distile su ile yıkandı, örnekler 400 μ L PBS’te çözdürülen örnekler 200 μ L olacak şekilde iki tekrarlı olarak 96 kuyulu platlere alındı, kinetik okuma için spektrofluorometrede (Bio-tek FLx800) eksitasyon ve emisyon dalga boyları sırasıyla 490 ve 524 nm olacak şekilde $\square 2,5$ saat ölçüldü.

4. BULGULAR

4.1. *S. POMBE* HÜCRELERİNİN GENOTİP KONTROLÜ

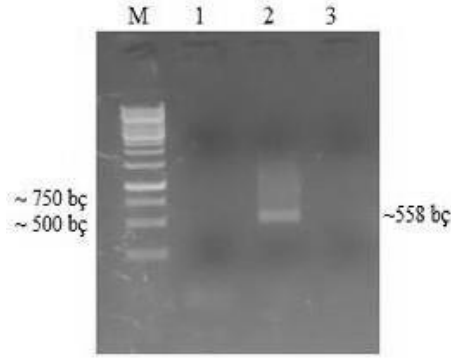
Gua1ura4h⁻ *S. pombe* mutant ırkı çalışma boyunca seçici besiyerlerine ekilerek belirli aralıklarla genotipi kontrol edildi. Hücrelerin beklenildiği şekilde genotipe uygun olarak yalnızca urasil (U) ve guanin (G) içeren MMA besiyerinde üreme gösterdikleri gözlemlendi (Şekil 4.1).



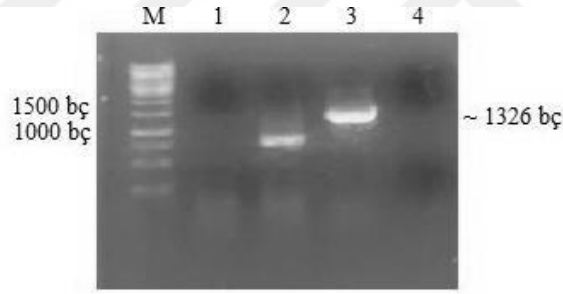
Şekil 4.1: Seçici besiyerinde *gua1ura4h⁻* mutant ırkının genotip kontrolü (MMA, MMA+Guanin, MMA+Urasil ve MMA+Urasil+Guanin besiyerinde *gua1ura4h⁻* hücrelerinin üremesi).

4.1.1. *Gua1ura4h⁻* Mutant ırkının PCR ile Kontrol Edilmesi

Gua1ura4h⁻ mutant ırkının genomunda *ura4* geni ve MAPT geninin yer almadığını göstermek amacıyla *gua1ura4h⁻* genomik DNA izolasyonu sonrası bu genlere ait primerlerle PCR gerçekleştirildi. *Ura4* geni kontrolü olarak *S. pombe* 972h⁻ yabancı ırkına ait genomik DNA kullanıldı. *Ura4* genine ait 558 bp'lik kısım ile MAPT geni tam boy çoğaltılarak kontrol edildi. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforeziyle elde edilen görüntüleri Şekil 4.2 ve 4.3'te verildi.



Şekil 4.2: Konak ırkının *ura4* geni bakımından PCR ile genomik DNA kullanılmasıyla kontrolü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *gua1ura4h⁻* genomik DNA'sı; 2: *972h⁻* genomik DNA'sı; 3: negatif kontrol).

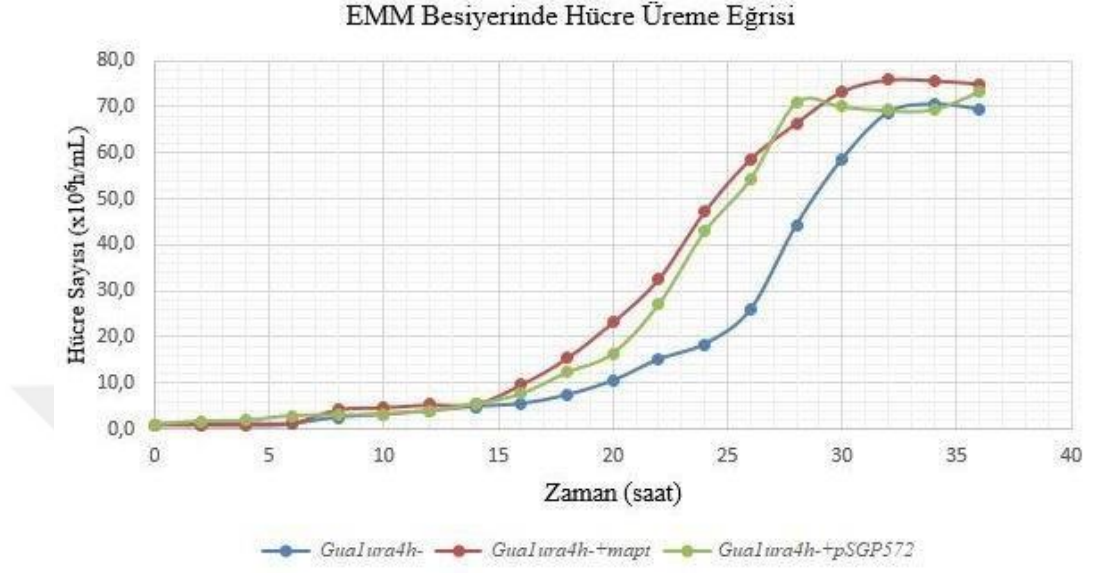


Şekil 4.3: Konak ırkının MAPT geni bakımından PCR ile genomik DNA kullanılmasıyla kontrolü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *gua1ura4h⁻* genomik DNA'sı; 2: *972h⁻* genomik DNA'sı; 3: pozitif kontrol; 4: negatif kontrol).

4.2. *S.POMBE* HÜCRELERİNDE ÜREMENİN İZLENMESİ

S. pombe gua1ura4h⁻ ırkında etkin şekilde transformasyonun gerçekleştiği YNB besiyerinde logaritmik evrenin ortası Karaer ve arkadaşları (2001) tarafından 24 saat olarak belirlenmiştir (Karaer, 2001). Bu çalışma sırasında EMM besiyerinde protein izolasyonu ve diğer deneylerde logaritmik evrenin ortasını belirlemek amacıyla *gua1ura4h⁻* mutant ırkının ve transformant ırkların üremeleri izlendi. 36 saat boyunca 2 saat aralıklarla 600 nm dalga boyunda optik yoğunlukları (OD) ölçüldü. Mililitresindeki hücre sayısı bilinen çeşitli sulandırımaların OD

değerlerine göre oluşturulan standart grafikten yararlanılarak kültürlerdeki hücre üremelerinin zamana bağlı grafikleri çıkartıldı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4: *gualura4h⁻* konak ırkı, *gualura4⁺mapt* ve *gualura4⁺pSGP572* transformant ırklarının EMM besiyerinde üreme grafiği (*gualura4h⁻* ırkının EMM+G+U; transformantların EMM+G besiyerinde üremesi).

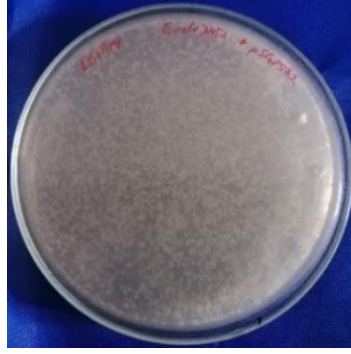
Bu grafikler sonucunda *gualura4h⁻* mutant ırkının guanin ve urasil içeren EMM besiyerinde generasyon süresi yaklaşık 4,5 saat, *gualura4⁺mapt* ve *gualura4⁺pSGP572* transformant ırklarının guanin içeren EMM besiyerinde generasyon süreleri yaklaşık 4 saat olarak bulundu. Logaritmik evrenin ortası *gualura4h⁻* mutant ırkı için 27. saat, *gualura4⁺mapt* ve *gualura4⁺pSGP572* transformant ırkları için sırasıyla 24. ve 19. saat olarak belirlendi.

4.3. E. COLİ'DEN PSGP572 PLAZMİDİ İZOLASYONU VE KONTROLÜ

E. coli DH5α ırkından izole edilen *pSGP572* plazmidi izole edildi ve ardından restriksiyon endonükleazlarıyla kesilerek kontrolleri gerçekleştirildi.

4.3.1. *pSGP572* Plazmidinin *E.coli*'de Çoğaltılması

pSGP572 plazmidini bol miktarda elde etmek için *E. coli DH5α* ırkına transformasyonu gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası ampisilin içeren LB besiyerinde plazmidi aldığı düşünülen koloniler üredi (Şekil 4.5).



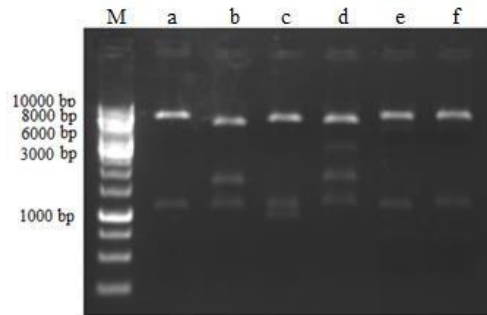
Şekil 4.5: *pSGP572* plazmidinin süper yeterli *E.coli DH5α* hücrelerine transformasyonu sonrası ampisilin içeren LB besiyerinde üreyen transformant koloniler.

4.3.2. *pSGP572* Plazmidinin *E.coli*'den İzolasyonu

Plazmidi alan *E. coli DH5α* hücrelerine ait kolonilerden 5 tanesi seçilerek plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen bu plazmidler restriksiyon endonükleazlarıyla kesilerek kontrol edildi.

4.3.3. *pSGP572* Plazmidinin Kontrol Amaçlı Restriksiyon Endonükleazları ile Kesimi

İzole edilen *pSGP572* plazmidlerinden seçilen bir örneğin *EcoRI* (Fermentas) restriksiyon endonükleazıyla tekli kesimi, *EcoRI*+*NotI*, *EcoRI*+*Sall*, *EcoRI*+*BglII*, *PstI*+*XhoI* ve *PstI*+*NotI* enzim kombinasyonları ile ikili kesimleri gerçekleştirildi. Kesim sonrası agaroz jel elektroforeziyle plazmid boyutu (~9300 bp.) doğrulandı (Şekil 4.6).



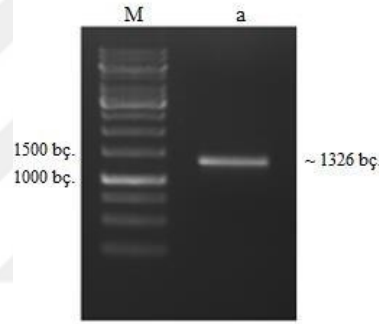
Şekil 4.6: *pSGP572* plazmidinin restriksiyon endonükleazları ile kesiminin agaroz jel görüntüsü (M: 1 kb'lık DNA Ladder; a. *EcoRI*; b. *EcoRI* + *NotI*; c. *EcoRI* + *Sall*; d. *EcoRI* + *BglII*; e. *PstI* + *XhoI*; f. *PstI* + *NotI* enzimiyle kesim).

4.4. MAPT GENİ İÇEREN *PSGP572* PLAZMİDİNİN ELDE EDİLMESİ

Çalışmada kullanılan insan MAPT geni çoğaltıldıktan sonra *pSGP572* plazmidine doğru bir şekilde aktarıldı ve bu plazmid çalışmalarda kullanılmak üzere bol miktarda elde edildi.

4.4.1. MAPT Geninin Çoğaltılması

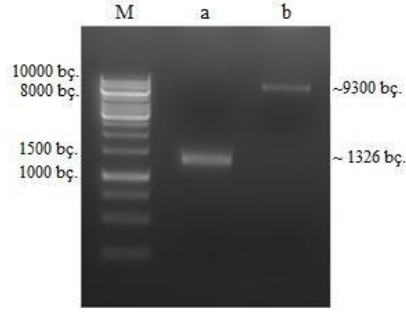
İnsan MAPT geni içeren *pcDNA3.1*/C-(K)DYK* plazmid DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı gene özgü primerlerle tam boyutu PCR ile çoğaltılan MAPT gen ürünü saflaştırıldı ve agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 4.7). PCR ürünün beklenen boyutta olduğu gözlemlendi (~1326 bp.). PCR ürününün geri kazanımı sonrası konsantrasyonu nanodropta ölçülerek, uygun saflıkta 48,2 ng/μl ve 45,9 ng/μl olarak belirlendi.



Şekil 4.7: İnsan MAPT geni PCR ürününün saflaştırma sonrası agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: PCR ürünü jelden geri kazanım örneği).

4.4.2. MAPT Geninin *pSGP572* Plazmidine Ligasyonu

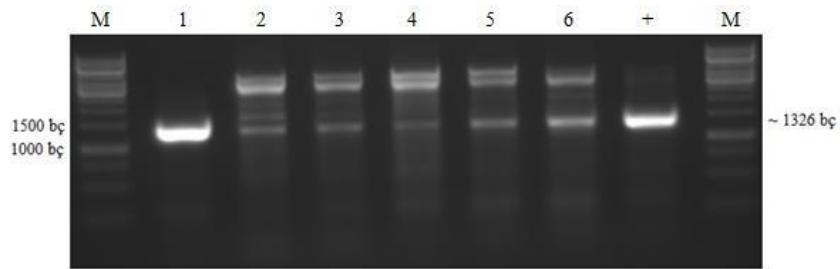
Ligasyon öncesi plazmidi tek noktadan kesen *XhoI* ve *BglII* restriksiyon endonükleazları ile kesilen *pSGP572* plazmidi ve PCR ürünüde plazmide uygun uç oluşturmak üzere *Sall* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazları ile kesilen MAPT geni jelden geri kazanıldı. Geri kazanım ürünü ligasyon öncesi %1'lik agaroz jele 3 μL olarak yüklendi ve elektroforez ile kontrolleri gerçekleştirildi (Şekil 4.8). Geri kazanım ürünlerinin nanodropta ölçüm sonucu miktarları sırasıyla 11,8 ng/μL ve 19,1 ng/μL olarak saptandı. MAPT geni ve *pSGP572* plazmidi Bölüm 3.9.1'de anlatıldığı şekilde ligasyona bırakıldı.



Şekil 4.8: Ligasyon öncesi geri kazanılan *Sall* ve *BamHI* restriksiyon endonükleazları ile kesilen MAPT geni PCR ürünü ve *XhoI* ve *BglIII* ile kesilen *pSGP572* plazmidinin agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: MAPT geni PCR ürünü; b: *pSGP572* plazmidi).

4.4.3. Ligasyon Ürünlerinin *E.coli DH5α*'ya Transformasyonu

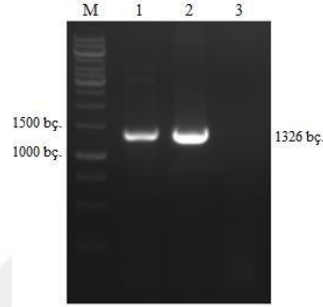
MAPT geninin *pSGP572* plazmidine ligasyonu sonrasında *E. coli DH5α* hücrelerine transformasyon gerçekleştirildi. MAPT genini alan transformant hücreler gene özgü primerlerle PCR yapılarak belirlendi. Bu amaçla seçilen 18 koloni 3'erli gruplar halinde kalıp olarak kullanıldı. Koloni PCR sonucunda örnekler %1'lik agaroz jel elektroforeziyle analiz edildi (Şekil 4.9).



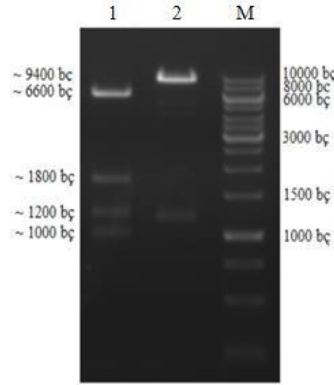
Şekil 4.9: Ligasyon ürününün *E. coli*'ye transformasyonu sonrasında ampisilinli LB besiyerinde üreyen 18 koloninin kalıp olarak kullanıldığı, MAPT genine özgü primerlerle gerçekleştirilen koloni PCR agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: 1.,2.,3. koloniler; 2: 4., 5., 6. koloniler; 3: 7., 8., 9. koloniler; 4: 10., 11., 12. koloniler; 5: 13., 14., 15. koloniler; 6: 16., 17., 18. koloniler; +: pozitif kontrol).

MAPT geni varlığı belirlenen 1 numaralı *E. coli* kolonisinden plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası bu plazmidten hem MAPT geni kontrolü için MAPT genine

özgü primerlerle PCR, hem de *HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleazlarıyla kesim gerçekleştirildi. PCR ürünleri (Şekil 4.10) ve kesim sonuçları (Şekil 4.11) agaroz jelde gözlemlendi. Beklenildiği gibi MAPT geni içeren plazmid *HindIII* restriksiyon endonükleazı ile kesildiğinde 4 bant, *EcoRI* restriksiyon endonükleazı ile kesildiğinde 2 bant saptandı. PCR ürünü ≈ 1300 bp olarak elde edildi. Geni taşıdığı gösterilen bu plazmid *pSGP572+mapt* olarak adlandırıldı.



Şekil 4.10: *pSGP572+mapt* plazmidinin PCR ile doğrulanması (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pozitif kontrol; 2: *pSGP572+mapt* plazmidi; 3: negatif kontrol).



Şekil 4.11: *pSGP572+mapt* plazmidinin *HindIII* ve *EcoRI* restriksiyon endonükleazıyla kesimi (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *HindIII* ile; 2: *EcoRI* ile kesim).

4.4.4. MAPT Geni İçeren *pSGP572* Plazmidinde Hedef Bölgenin Dizileme ile Kontrol Edilmesi

pSGP572+mapt plazmidinin kalıp olarak kullanıldığı ve *maptF-gfpR* primerleri ile çoğaltılan bölge hizmet alımı ile iki yönlü olarak dizilendikten sonra elde edilen diziler BLAST analizi ile karşılaştırıldı. Karşılaştırma sonucunda ileri okumada (Şekil 4.12) %97,23, geri okumada ise %86,07 (Şekil 4.13) oranında hedef dizilerle benzerlik gözlemlendi, iki okumada da “e değeri” 0.0 olarak bulundu. Bu durum bize klonlanan parçadaki hedef bölgenin doğruluğunu gösterdi.

Sequence ID: Query_126961 Length: 1197 Number of Matches: 1

Range 1: 20 to 1188 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1991 bits(1078)	0.0	1157/1190(97%)	25/1190(2%)	Plus/Plus
Query 28	GTGATGGAAGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTAC	87		
Sbjct 20	GTGA-GG-AGATCACGCTGGGACGTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTAC	77		
Query 88	ACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCTGCAG	147		
Sbjct 78	ACCATGCACCAAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCTGCAG	137		
Query 148	ACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACT	207		
Sbjct 138	ACCCCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACT	197		
Query 208	CCAACAGCGGAAGATGTGACAGCACCTTAGTGAGTGAGGGAGCTCCCGCAAGCAGGCT	267		
Sbjct 198	CCAACAGCGGAAGATGTGACAGCACCTTAGTGAGTGAGGGAGCTCCCGCAAGCAGGCT	257		
Query 268	GCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCGAAGGAACACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGA	327		
Sbjct 258	GCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCGAAGGAACACAGCTGAAGAAGCAGGCATTGGA	317		

Şekil 4.12: İleri primer ile dizileme sonrası elde edilen dizinin hedef dizi ile karşılaştırmasının BLAST analizi sonucu.

Range 1: 47 to 809 [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
815 bits(441)	0.0	686/797(86%)	45/797(5%)	Plus/Plus
Query 60	CAAAGACACCAAGCTCTGGTGAACCTCCAAATCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCA	119		
Sbjct 47	CAAAGACACCA--CAG-GCTAGTGAA-CTTCAAATTCA-GGGAT-GCAGC--ATACAGCA	98		
Query 120	GCCCCGGCTCCCAAGGACTCCCGGACGCGCTCCCGACCCGCTCCCTTCCAACCCAC	179		
Sbjct 99	G--CCGGCT--CCA-GCA-TTCCGGCAG-CGCT--CGCACCCGT--C-T-C-ACCAC	144		
Query 180	CCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGGCAGTGGTCCGTAACCTCCACCAAGTCGCGCTCTCCG	239		
Sbjct 145	CCA-CC-GGAG-CC-AGAAGGTGGCAGTGGT-GTACT-CACCAAGTCGCGCTCTCCG	198		
Query 240	CCAAGAGCCGCTGC-AGA-CAGCCCCGTCGCCATGCCAGACCTGAA-GAATGTC-AAG	295		
Sbjct 199	CCAGGAGC-GGCTGCAAGACAGCCCCGGTGCCCATGCCAGACCTGAAAGAATGTCAAAG	257		

Şekil 4.13: Geri primer ile dizileme sonrası elde edilen dizinin hedef dizi ile karşılaştırmasının BLAST analizi sonucu.

4.5. *PSGP572+MAPT* PLAZMİDİNİN *S. POMBE* HÜCRELERİNE TRANSFORMASYONU

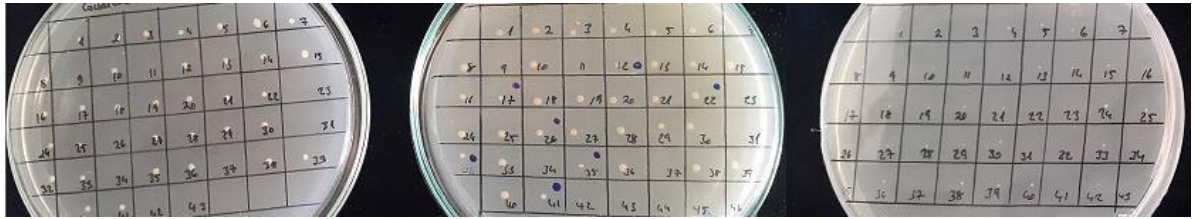
MAPT geni varlığı kanıtlanan *pSGP572+mapt* plazmidinin *S. pombe* hücrelerine transformasyonu Bölüm 3.10.1’de anlatıldığı gibi başarıyla gerçekleştirildi.

4.5.1. Transformant Hücrelerin Seçici Besiyerinde Saptanması

pSGP572+mapt plazmidinin *gua1ura4h⁻* mutant ırka transformasyonu sonrası, hücreler guanin içeren MMA besiyerine yayma ekim ile ekildi. Üreyen kolonilerin seçimi MMA, MMA+G, MMA+U+G besiyerlerinde yapıldı ve MMA+G besiyerinde üreyerek istediğimiz fenotipik özelliği gösteren 11 koloniden 4. koloni (pMS-mapt olarak adlandırıldı) çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi (Şekil 4.14). Transformasyonda kontrol grubu olarak *pSGP572* plazmidini *gua1ura4h⁻* ırkına transforme edildi. Transformasyon sonrası hücreler guanin içeren MMA besiyerine yayılarak ekildi ve üreyen 41 koloni MMA, MMA+G, MMA+U+G besiyerlerine seçim için ekildi (Şekil 4.15). İstenen fenotipte 34 koloni saptandı. Bu transformant kolonilerden biri çalışmalarda kullanılmak üzere seçildi ve pMS olarak adlandırıldı.



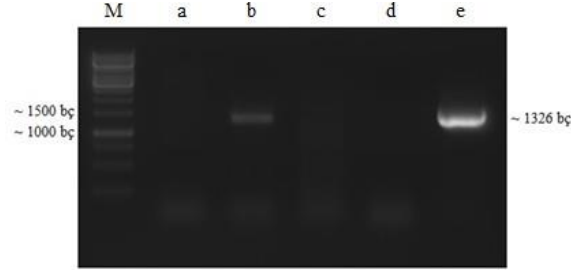
Şekil 4.14: *pSGP572+mapt* plazmid taşıyan *gua1ura4h⁻* transformantlarının sırasıyla MMA, MMA+G+U ve MMA+G seçici besiyerlerinde ekim sonuçları.



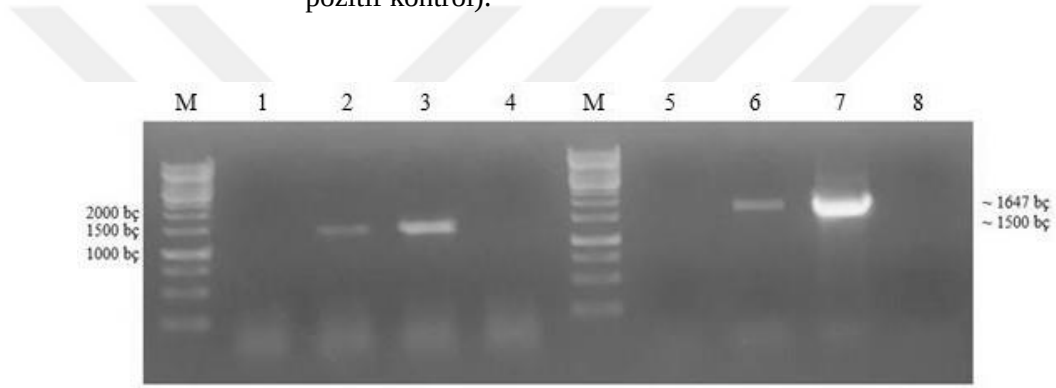
Şekil 4.15: *pSGP572* plazmidini içeren *gua1ura4h⁻* transformantlarının sırasıyla MMA+GU, MMA+G ve MMA seçici besiyerlerinde ekim sonuçları.

4.5.1.1. Elde Edilen Transformantların Koloni PCR ile Kontrolü

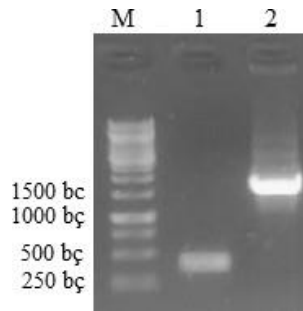
Elde edilen transformantlar ve *gua1ura4h⁻* mutant ırkı, MAPT genine özgü primerler kullanılarak koloni PCR ile kontrol edildi (Şekil 4.16). Ayrıca *maptF/gfpR* ve *nmtF/maptR* primer çiftleri kullanılarak da kontroller gerçekleştirildi (Şekil 4.17). Bu plazmidler (*pSGP572* ve *pSGP572+mapt*) de *nmtF/gfpR* primer çifti ile kontrol edildi (Şekil 4.18).



Şekil 4.16: Seçici besiyerinde seçilen kolonilerin MAPT genine uygun primerlerle gerçekleştirilen koloni PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; a: *gua1ura4h*⁻; b: pMS-mapt kolonisi; c: pMS kolonisi; d: negatif kontrol; e: pozitif kontrol).



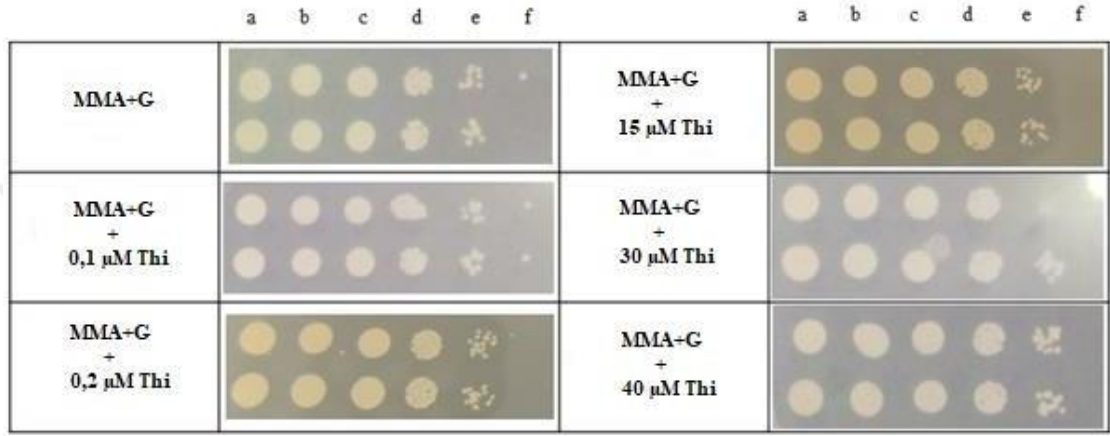
Şekil 4.17: maptF/gfpR ve nmtF/maptR primer çiftleri kullanılarak gerçekleştirilen koloni PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *gua1ura4h*⁻; 2: pMS-mapt; 3: *pSGP572+mapt*, pozitif kontrol; 4: nmtF/maptR primerlerle kalıpsız PCR sonucu, negatif kontrol; 5: *gua1ura4h*⁻; 6: pMS-mapt; 7: *pSGP572+mapt*, pozitif kontrol; 8: maptF/gfpR primerlerle kalıpsız PCR sonucu, negatif kontrol).



Şekil 4.18: *pSGP572* ve *pSGP572+mapt* plazmidlerinin nmtF-gfpR primerleriyle PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: *pSGP572*; 2: *pSGP572+mapt*).

4.5.2. Tiamin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

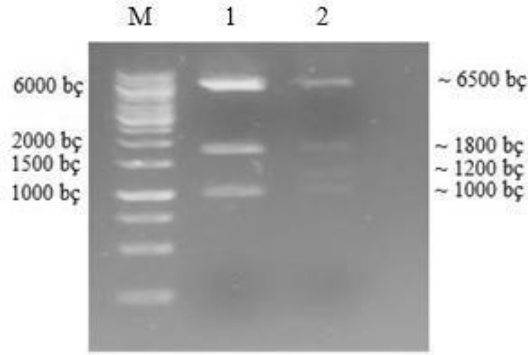
pSGP572 plazmidinin taşıdığı *nmt* promotörünü inhibe eden ancak hücreler üzerinde öldürücü olmayan konsantrasyonu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda tiamin içeren besiyerlerine (MMA+G+Thi) transformant hücrelere spot ekim yapılarak uygulanacak olan konsantrasyon 15 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.19).



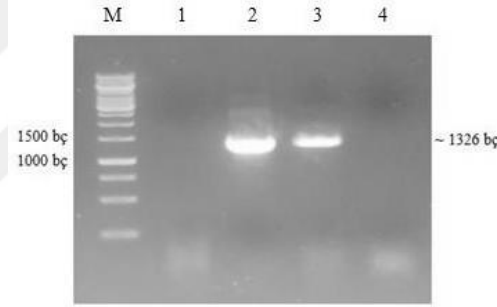
Şekil 4.19: Transformant hücrelerin farklı konsantrasyonlarda tiamin içeren seçici besiyerine spot ekimi sonuçları (a: doğrudan ekim; b: 10 kat sulandırım; c: 10^2 kat sulandırım; d: 10^3 kat sulandırım; e: 10^4 kat sulandırım; f: 10^5 kat sulandırım).

4.5.3. Transformant *S. pombe* Hücrelerinden Plazmid Geri İzolasyonu

pMS-mapt ve pMS transformant ırkından plazmid geri izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyon sonrası elde edilen plazmidler süper yeterli haldeki (Bölüm 3.6.1) *E. coli*'ye aktarıldı. Transformasyon sonrası ampisilinli LB besiyerinde *pSGP572+mapt* plazmidini içermesi olası olan tek bir koloninin ürettiği gözlemlendi. Bu koloniden izolasyon sonrası elde edilen plazmid *HindIII* restriksiyon endonükleazıyla kesilerek kontrol edildi (Şekil 4.20). Beklenen 1000 bp, 1200 bp, 1800 bp ve 6600 bp'lik bantlar gözlemlendi. Ayrıca MAPT genine özgü primerler kullanılarak PCR ile kontrolü gerçekleştirildi (Şekil 4.21). Transformasyon sonrası ampisilinli LB besiyerinde *pSGP572* plazmidini taşıması olası olan iki koloni ürettiği gözlemlendi. Bu kolonilerden izolasyon sonrası yalnızca bir tanesinden yeterli konsantrasyonda geri izolasyon gerçekleştirildi ve izole edilen plazmid *HindIII* restriksiyon endonükleazıyla kesilerek kontrol edildi (Şekil 4.20), beklenildiği gibi 1000 bp, 1800 bp ve 6500 bp'lik bantlar jelde gözlemlendi. Ayrıca MAPT genine özgü primerler kullanılarak PCR ile kontrolü gerçekleştirildi (Şekil 4.21).



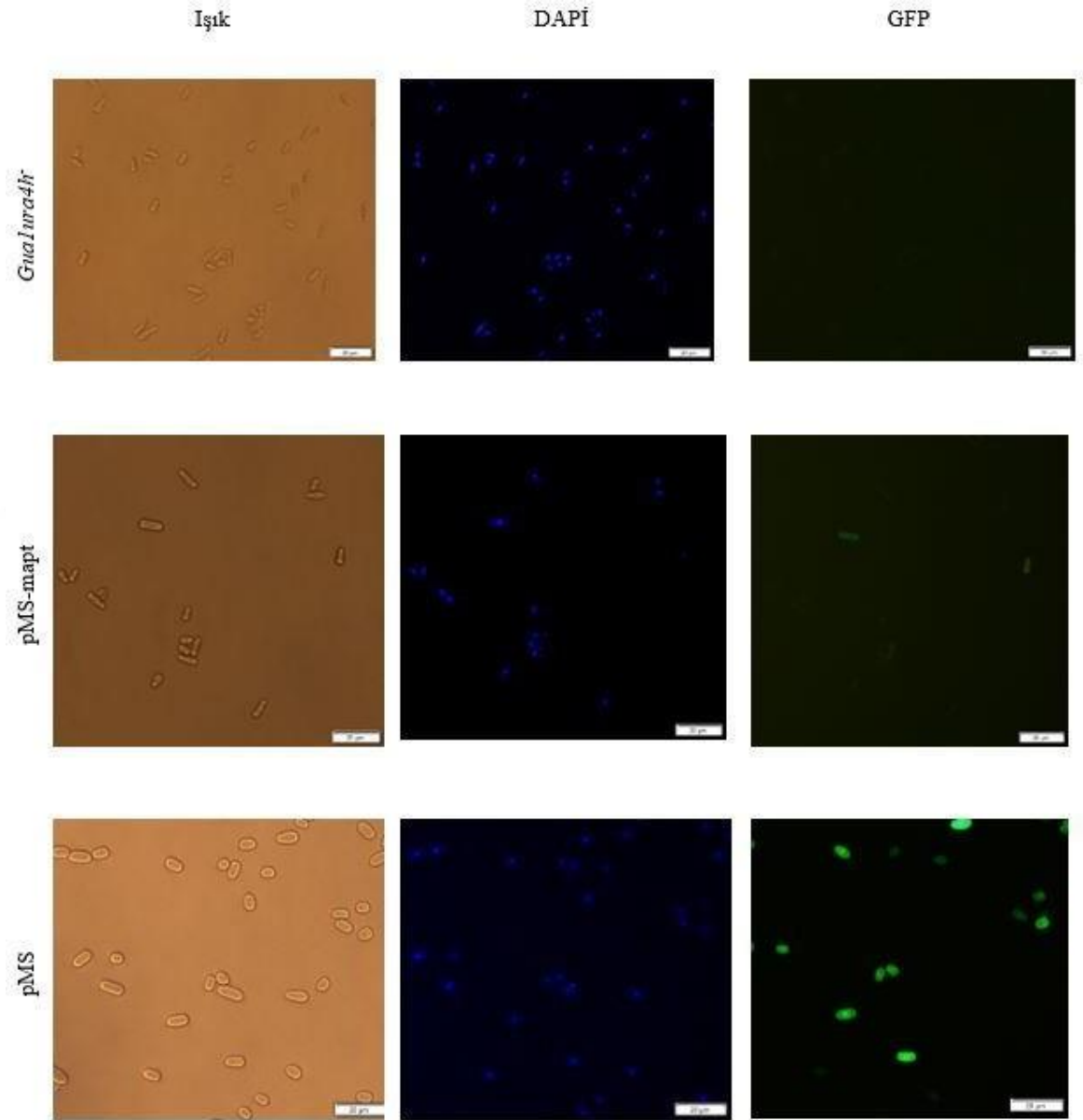
Şekil 4.20: Transformant pMS ve pMS-mapt *S. pombe* hücrelerinden plazmid geri izolasyonu sonrası *Hind*III restriksiyon endonükleazı ile kesim sonrası agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1 kb DNA Ladder; 1: pMS+ *Hind*III; 2: pMS-mapt+ *Hind*III).



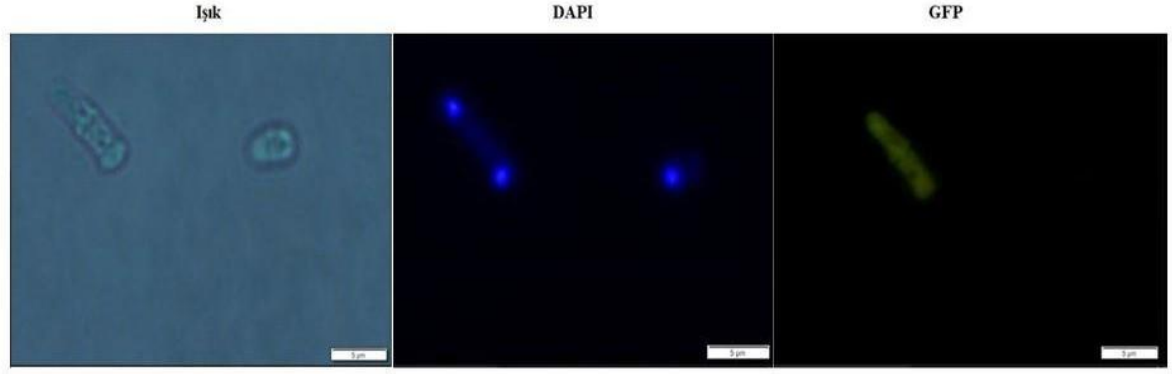
Şekil 4.21: Transformant pMS-mapt ve pMS *S. pombe* hücrelerinden plazmid geri izolasyonu sonrası MAPT genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucu agaroz jel görüntüsü (M: GeneRuler 1kb DNA Ladder; 1: Geri izole edilen *pSGP572* plazmid; 2: Geri izole edilen *pSGP572+mapt* plazmid; 3: pozitif kontrol; 4: Kalıpsız negatif kontrol).

4.5.4. *S. pombe* Hücrelerinin Floresan Mikroskopta İncelenmesi

Transformant pMS-mapt hücreleri ile kontrol grubu olarak kullanılan *gua1ura4h⁻* konak hücreleri ve pMS hücreleri seçici besiyerlerinde önce tiaminli sonra tiaminsiz ortamda üretildikten sonra fikse edilip, DAPI ile boyanarak floresan mikroskopta görüntülendi. pMS ve pMS-mapt hücrelerine ait örneklerde ışımlar gözlemlendi. Konak ırkta (*gua1ura4h⁻*) floresan ışıma rastlanmadı (Şekil 4.22,4.23).



Şekil 4.22: *Gua1ura4h*, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin 40X objektif kullanılarak floresan mikroskop altındaki görüntüleri (Bar boyutu: 20 μ m).



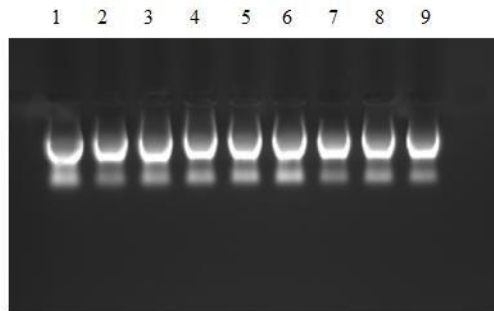
Şekil 4.23: pMS-mapt hücrelerinin 100X objektif kullanılarak floresan mikroskobu altındaki ayrıntılı büyütülmüş görüntüsü (Bar boyutu: 5µm).

4.6. GEN ANLATIMI DÜZEYİNDE ANALİZLER

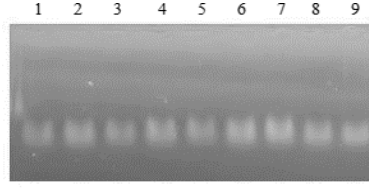
Elde edilen hücrelerde farklı hücresel süreçlerde rol oynayan gen anlatımları karşılaştırmalı olarak analiz edildi.

4.6.1. Total RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Farklı glukoz konsantrasyonu (%0,5, %3, %5) ve uygun metabolitleri (guanin+urasil, guanin) içeren MML besiyerinde üretilen hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütülerek incelendi (Şekil 5.24). cDNA sentezi için RNA örneklerinden 2000 ng kullanıldı ve cDNA'lar agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 4.25).



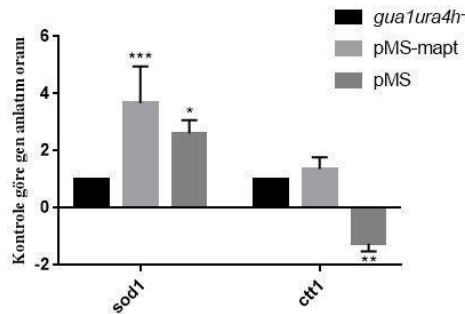
Şekil 4.24: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üretilmiş örneklerden RNA izolasyonu agaroz jel görüntüsü (1,2,3: %0,5; 4,5,6: %3; 7,8,9: %5 konsantrasyonda glukoz içeren MML besiyerinde üretilmiş sırasıyla *gua1ura4h*, pMS-mapt ve pMS).



Şekil 4.25: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üretilmiş örnekler için cDNA'ların agaroz jel görüntüsü (1,2,3: %0,5; 4,5,6: %3; 7,8,9: %5 konsantrasyonda glukoz içeren MML besiyerinde üretilmiş sırasıyla *gua1ura4h*, pMS-mapt ve pMS).

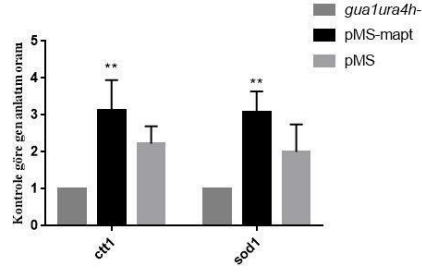
4.6.2. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PCR) Analizi

Optimum glukoz içeren (%3 konsantrasyonda) koşullarda üretilen pMS ve pMS-mapt transformantları, konak ırk ile Bölüm 3.13.2'de açıklanan genler bakımından gen anlatımı düzeyinde karşılaştırıldığında stres yanıtı ile ilişkili olarak *sod1* geninde pMS-mapt transformantında 3,7 kat anlamlı artış, pMS ırkında 2,6 kat anlamlı bir artış meydana geldi. *Ctt1* genine bakıldığında pMS-mapt transformantında 1,4 kat artış görülürken, pMS ırkında 1,2 kat azalma gözlemlendi (Şekil 4.26).

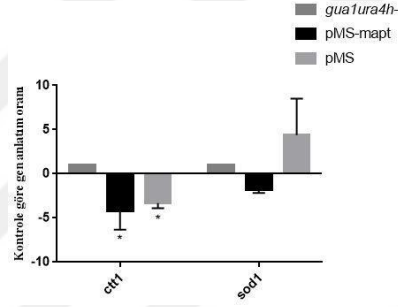


Şekil 4.26: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre transformant ırklardaki *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,000***; 0,0024**; 0,0155*).

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda üreyen hücreler *sod1* ve *ctt1* gen anlatımları bakımından karşılaştırıldığında Şekil 4.27 ve 4.28'deki grafikler elde edilmiştir.

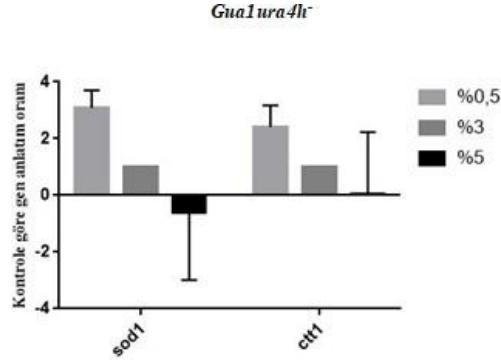


Şekil 4.27: *Gua1ura4h⁻* konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0013, 0,0032**).



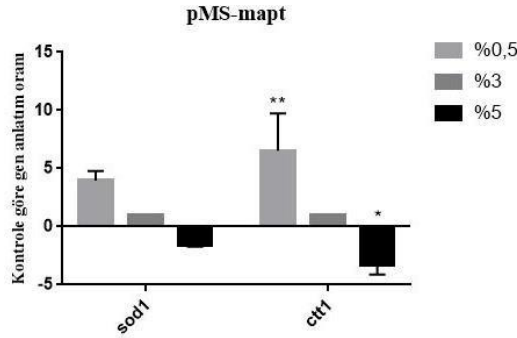
Şekil 4.28: *Gua1ura4h⁻* konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0161*).

Gen anlatımı düzeyinde *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarına bakıldığında %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen kontrol grubu hücrelere göre %0,5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen konak hücrelerde *sod1* geni anlatımı 3 kat artarken, %5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerde 0,6 kat azalma meydana geldi. *Ctt1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 2,4 kat artış görülürken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde gen anlatımında bir değişiklik görülmedi (Şekil 4.29).



Şekil 4.29: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen *gua1ura4h⁻* hücrelerinin *sod1* ve *ctt1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.

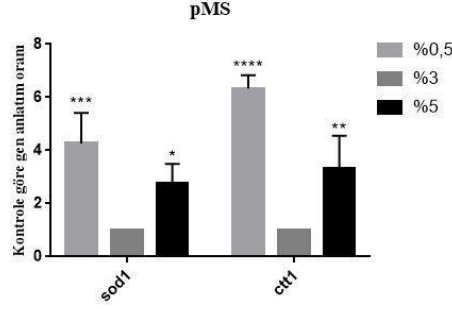
Gen anlatımı düzeyinde *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarına bakıldığında %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen pMS-map4 hücrelerine göre %0,5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen pMS-map4 hücrelerde *sod1* geni anlatımı 4 kat artarken, %5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerde 1,6 kat azalma görüldü. *Ctt1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 6,5 kat artış görülürken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 3,3 kat azalma gözlemlendi (Şekil 4.30).



Şekil 4.30: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-map4 hücrelerinin *sod1* ve *ctt1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value: 0,0020**/0,0181*).

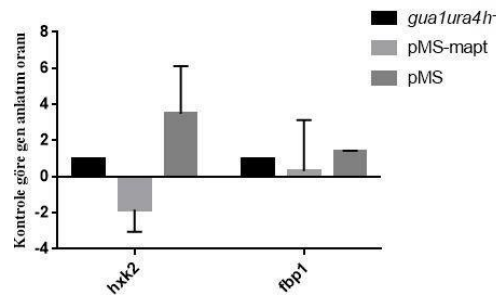
Gen anlatımı düzeyinde *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımlarına bakıldığında %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen pMS hücrelerine göre %0,5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen pMS hücrelerde *sod1* geni anlatımında 4,2 kat, %5 oranında glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerde 2,7 kat artış meydana geldi. *Ctt1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında,

%0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 6,3 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 3,3 kat artış gözlemlendi (Şekil 4.31).



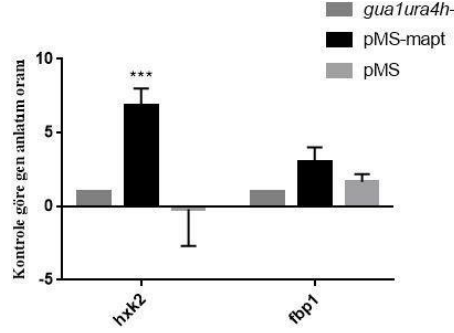
Şekil 4.31: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin *sod1* ve *ctt1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0005***; 0,0067**; 0,0329*).

Optimum glukoz içeren (%3 konsantrasyonda) koşullarda üretilen transformant ırklar, konak ırk ile gen anlatımı düzeyinde karşılaştırıldığında *hvk2* gen anlatımı pMS-mapt transformantında 1,8 kat azalırken, pMS ırkında 3,5 kat arttı. *Fbp1* genine bakıldığında pMS-mapt transformantında değişim görülmezken, pMS ırkında 1,4 kat artış meydana geldi (Şekil 4.32).

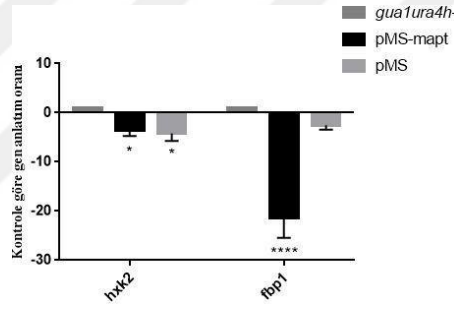


Şekil 4.32: *Gua1ura4h* konak ırkına göre transformant ırklardaki *hvk2* ve *fbp1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda üreyen hücreler *hvk2* ve *fbp1* gen anlatımları bakımından karşılaştırıldığında Şekil 4.33 ve 4.34'deki grafikler elde edilmiştir.

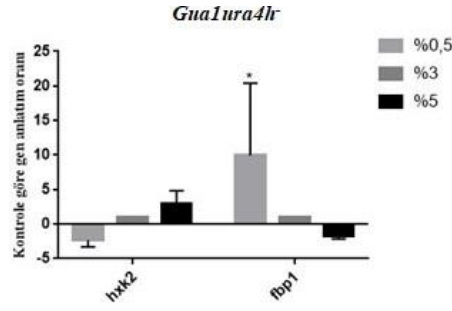


Şekil 4.33: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *hxx2* ve *fbp1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0005***).



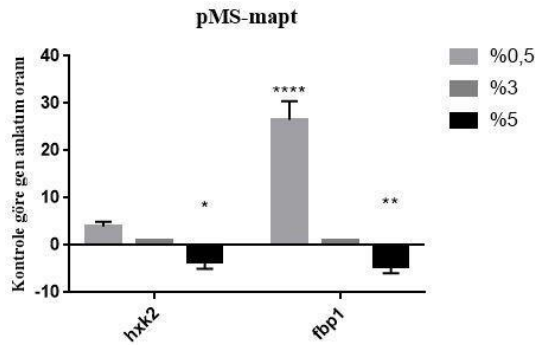
Şekil 4.34: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *hxx2* ve *fbp1* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0192*;<0,0001****).

Gua1ura4h⁻ konak ırkında gen anlatımı düzeyinde *hxx2* ve *fbp1* genlerinin anlatımlarına bakıldığında %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücreler kontrol grubu kabul edilerek bu gruba göre diğer konsantrasyonlarda üretilen hücelere ait gen anlatımları karşılaştırıldı ve %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *hxx2* geni anlatımı 2,3 kat azaldı. %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde ise 2,8 kat arttı. Ayrıca *fbp1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *fbp1* geni anlatımı 10 kat artış gösterirken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 1,6 kat azalma meydana geldi (Şekil 4.35).



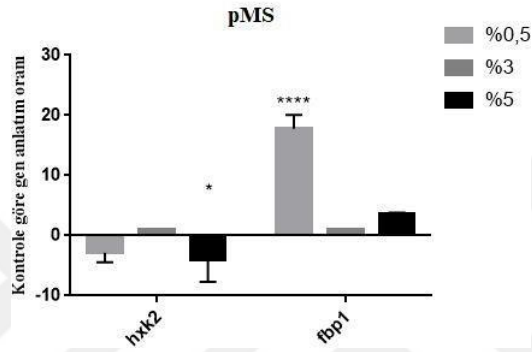
Şekil 4.35: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen *gua1ura4hr* hücrelerinin *hxx2* ve *fbp1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value:0,0412*).

pMS-mapt transformant ırkında *hxx2* ve *fbp1* genlerinin anlatımları %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle karşılaştırıldığında %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *hxx2* geni anlatımı 4 kat artarken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 3,5 kat azalma gözlemlendi. *fbp1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *fbp1* geni anlatımında 26 kat artış, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 4,3 kat azalma saptandı. (Şekil 4.36).



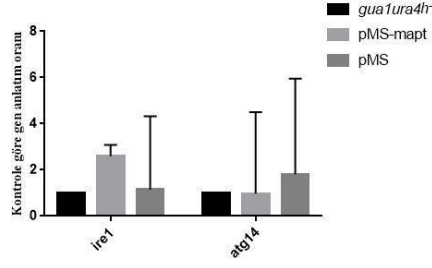
Şekil 4.36: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin *hxx2* ve *fbp1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0082**; 0,0210*).

pMS transformant ırkında *hvk2* ve *fbp1* genlerinin anlatımları %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle karşılaştırıldığında %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *hvk2* geni anlatımı 2,8 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 3,9 kat azaldı. *fbp1* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *fbp1* geni anlatımında 18 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 3,5 kat artış belirlendi (Şekil 4.37).



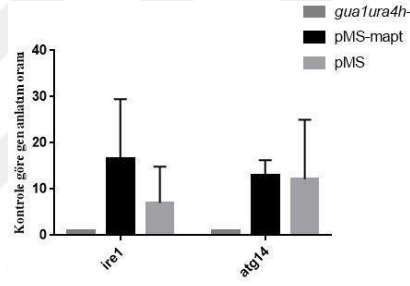
Şekil 4.37: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin *hvk2* ve *fbp1* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value <0,0001****; 0,0212*).

Konak ırk ve transformant ırklar optimum glukoz konsantrasyonu koşullarında gen anlatımı düzeyinde *ire1* geni bakımından incelendiğinde pMS-mapt transformant ırkında konağa göre 2,6 kat artış meydana gelirken, pMS kontrol ırkında değişiklik gözlenmedi. *Atg14* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, pMS-mapt transformant ırkında konağa göre fark gözlenmedi, pMS kontrol ırkında 1,8 kat artış görüldü (Şekil 4.38).

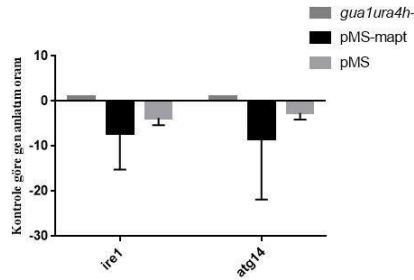


Şekil 4.38: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre transformant ırklardaki *ire1* ve *atg14* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda üreyen hücreler *ire1* ve *atg14* gen anlatımları bakımından karşılaştırıldığında Şekil 4.39 ve 4.40'daki grafikler elde edilmiştir.

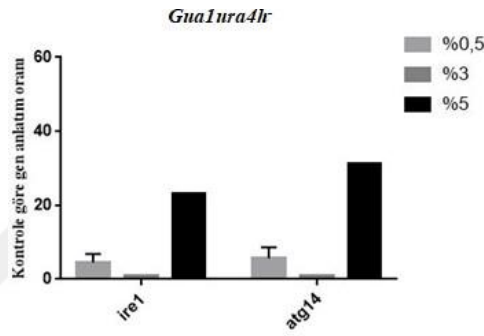


Şekil 4.39: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *ire1* ve *atg14* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.



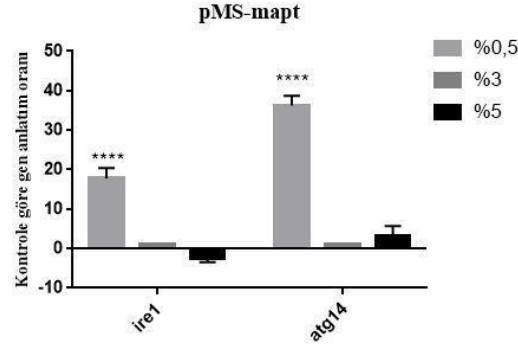
Şekil 4.40: *Gua1ura4h*⁻ konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *ire1* ve *atg14* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi.

Gua1ura4h⁻ konak ırkında *ire1* geninin anlatımı %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *ire1* geni anlatımı 4,5 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 23 kat arttı. *Atg14* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *atg14* geni anlatımında 5,6 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 31 kat artış meydana geldi (Şekil 4.41).



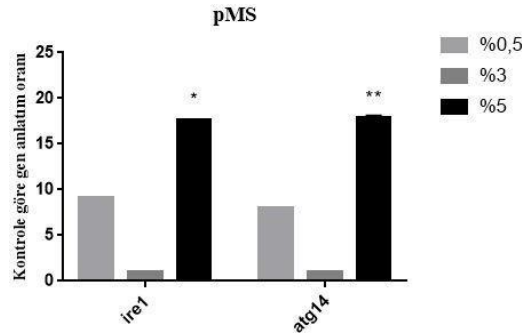
Şekil 4.41: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen *gua1ura4h⁻* hücrelerinin *ire1* ve *atg14* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.

pMS-mapt transformant ırkında *ire1* geninin anlatımı %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *ire1* geni anlatımı 18 kat anlamlı bir artış gösterirken, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 2,5 kat azaldı. *Atg14* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *atg14* geni anlatımı 36 kat anlamlı bir artış gösterirken, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 3 kat artış meydana geldi (Şekil 4.42).



Şekil 4.42: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin *ire1* ve *atg14* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value<0,0001****).

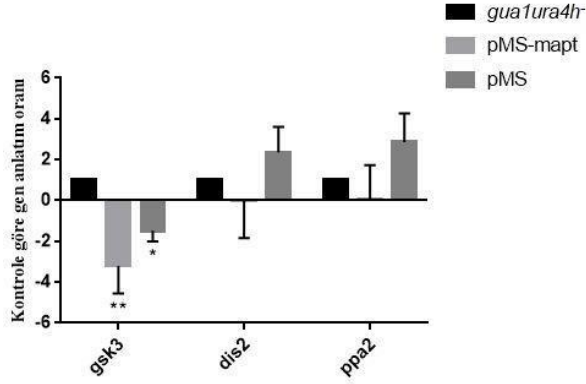
pMS transformant ırkında *ire1* geninin anlatımı incelendiğinde %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *ire1* geni anlatımı 9 kat artarken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 17,5 kat anlamlı bir artış gözlemlendi. *Atg14* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *atg14* geni anlatımında 8 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 18 kat anlamlı bir artış meydana geldi (Şekil 4.43).



Şekil 4.43: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin *ire1* ve *atg14* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri (P value: 0,0072**; 0,0243*).

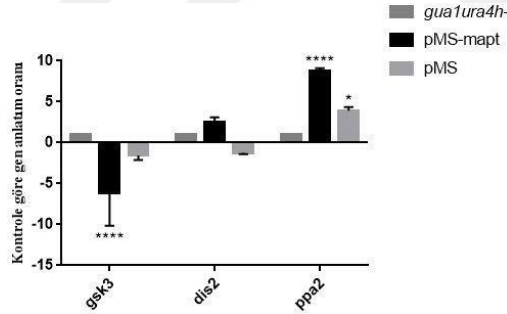
Konak ırk ve transformant ırklar *gsk3* geni bakımından incelendiğinde pMS-mapt transformant ırkında konağa göre 3,2 kat anlamlı bir azalma meydana gelirken pMS kontrol ırkında 1,5 kat anlamlı bir azalma meydana geldi. *Dis2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, pMS-mapt transformant ırkında konağa göre değişim gözlenmezken pMS kontrol ırkında 2,3 kat artış

görüldü. *Ppa2* geni bakımından incelendiğinde pMS-mapt transformant ırkında konağa göre değişim meydana gelmezken pMS kontrol ırkında 2,8 kat artış meydana geldi. (Şekil 4.44).

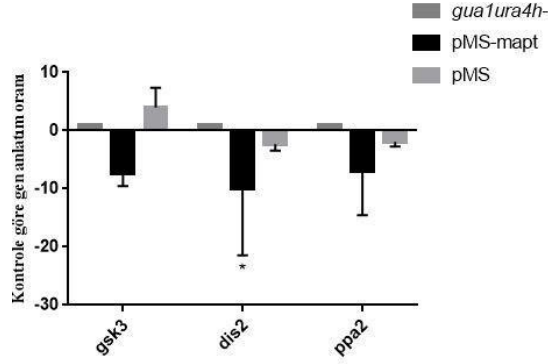


Şekil 4.44: *Gua1ura4h* konak ırkına göre transformant ırklardaki *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value:0,0011**; 0,0326*).

Farklı konsantrasyonlarda glukoz içeren ortamlarda üreyen hücreler *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* gen anlatımları bakımından karşılaştırıldığında Şekil 4.45 ve 4.46'daki grafikler elde edilmiştir.

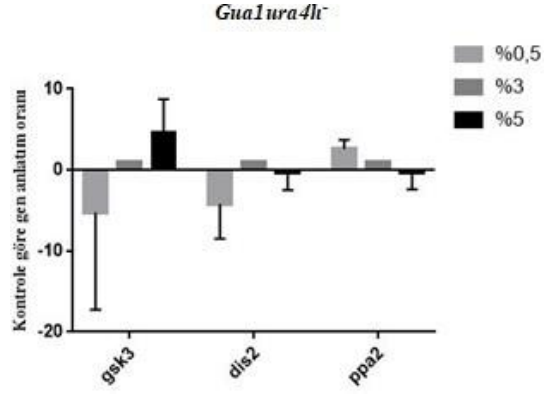


Şekil 4.45: *Gua1ura4h* konak ırkına göre %0,5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value:0,0001****; 0,0376*).



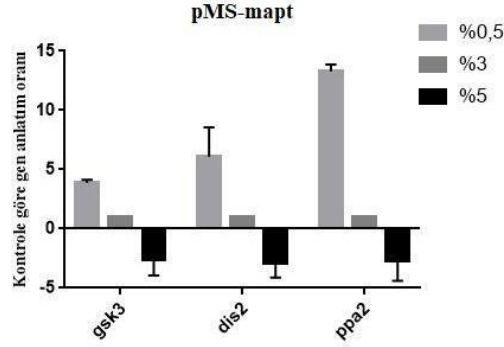
Şekil 4.46: *Gua1ura4h⁻* konak ırkına göre %5 glukoz içeren ortamda üretilen transformant ırklardaki *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımlarının karşılaştırmalı analizi (P value: 0,0248*).

Gua1ura4h⁻ konak ırkında gen anlatımı düzeyinde *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımında kontrol olarak %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle diğer gruplar karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *gsk3* geni anlatımı 5,3 kat azalırken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 4,5 kat arttı. *Dis2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *dis2* geni anlatımında 4,2 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 0,3 kat azalma meydana geldi. *Ppa2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *ppa2* geni anlatımı 2,6 kat artış gösterirken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 0,3 kat azalma meydana geldi (Şekil 4.47).



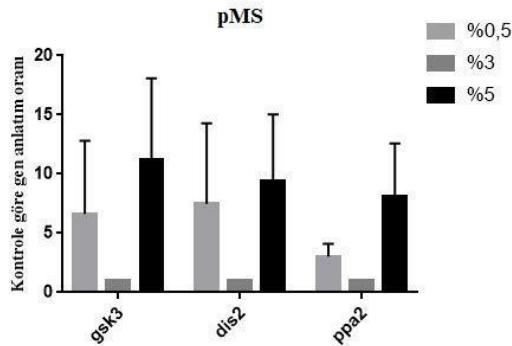
Şekil 4.47: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen *gua1ura4h⁻* hücrelerinin *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.

pMS-map transformant ırkında gen anlatımı düzeyinde *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımında kontrol olarak %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle diğer gruplar karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *gsk3* geni anlatımı 3,8 kat artarken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 2,6 kat azaldı. *Dis2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *dis2* geni anlatımı 6 kat artış gösterirken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 2,8 kat azalma meydana geldi. *Ppa2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *ppa2* geni anlatımı 13 kat artış gösterirken; %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 2,8 kat azalma gözlemlendi (Şekil 4.48).



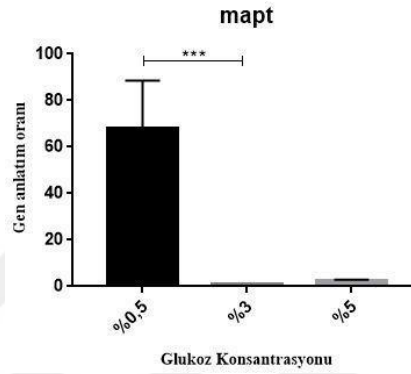
Şekil 4.48: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinin *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.

pMS transformant ırkında gen anlatımı düzeyinde *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımında kontrol olarak %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle diğer gruplar karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde *gsk3* geninin anlatımı 6,6 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde 11 kat arttı. *Dis2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *dis2* geni anlatımında 7,5 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 9,3 kat artış meydana geldi. *Ppa2* geni bakımından karşılaştırma yapıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde *ppa2* geninin anlatımında 3 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üreyen hücrelerde 8 kat artış meydana geldi (Şekil 4.49).



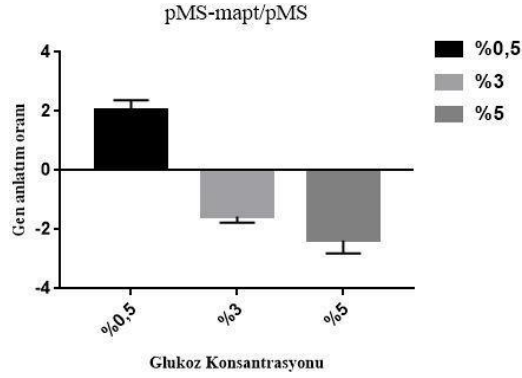
Şekil 4.49: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS hücrelerinin *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genleri bakımından karşılaştırmalı anlatım analizleri.

pMS-mapt hücrelerinde değişen glukoz konsantrasyonlarının MAPT geninin anlatımına etkisini belirlemek için %3 konsantrasyonda glukoz içeren ortamda üreyen hücrelerle diğer gruplar karşılaştırıldığında, %0,5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde MAPT geninin anlatımı 68 kat, %5 konsantrasyonda glukoz içeren besiyerinde üretilen hücrelerde ise 2,3 kat arttı (Şekil 4.50). *Gua1ura4^h* ve pMS örnekleri için de kontrol amaçlı olarak MAPT genine özgü primerlerle gerçek zamanlı PCR gerçekleştirildi, ancak bu kontrol grupları MAPT genine sahip olmadığı için okuma gerçekleşmedi.



Şekil 4.50: Farklı glukoz konsantrasyonlarında üreyen pMS-mapt hücrelerinde MAPT geninin anlatımı (P value:0,0008***).

pMS-mapt transformant ırk ve pMS transformant kontrol grubu *gfp* gen anlatım düzeyleri karşılaştırıldığında, %3 oranında glukoz içeren koşullarda üretilen transformant kontrol grubunda *gfp* genin 1,5 kat daha fazla, %5 oranında glukoz içeren koşullarda üretilen transformant kontrol grubu hücrelerde 2,4 kat daha fazla anlatım yaptığı görüldü. %0,5 oranında glukoz içeren koşullarda üretilen tau proteini içeren transformant hücreler transformant kontrol grubu hücrelere göre 2 kat daha fazla anlatım yaptı (Şekil 4.51).



Şekil 4.51: Farklı glukoz konsantrasyonlarında pMS-mapt transformantında pMS kontrol grubuna göre *gfp* gen anlatım düzeyi.

4.7. BİYOKİMYASAL VE PROTEİN DÜZEYİNDE ANALİZLER

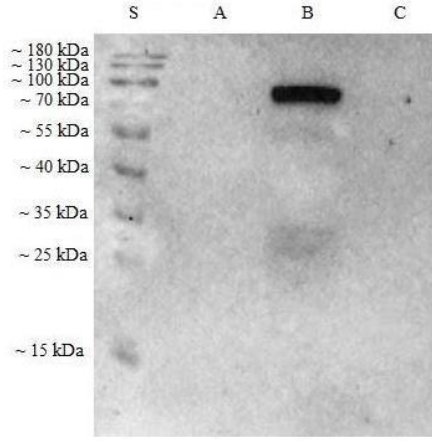
Transformant ırklar ve konak ırdan protein izolasyonu sonrası Western blot analizi gerçekleştirildi. Hücrelerin glukoz tüketimi, 20S proteozomal aktivite ve hücre içi oksidasyon düzeyleri ölçüldü.

4.7.1. Protein İzolasyonu ve SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Protein izolasyonu sonrası “Smart™ BCA Protein Assay Kit” kullanılarak yapılan protein miktar tayininde protein konsantrasyonları *gua1ura4h⁻* için 5045 µg/mL, pMS-mapt için 4320 µg/mL, pMS için 4117 µg/mL olarak bulundu. Her bir örnek için protein miktarı 60 µg olacak şekilde poliakrilamid jel elektroforezi gerçekleştirildi.

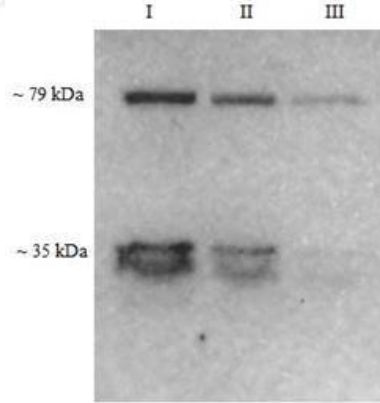
4.7.2. “Western Blot” Analiz Sonuçları

Gua1ura4h⁻, pMS-mapt ve pMS ırklarından izole edilen proteinler SDS-PAGE ile yaklaşık 1 saat yürütüldükten sonra jeldeki proteinler PVDF membrana tank aktarım sistemiyle aktarıldı. Bloklama işleminden sonra insan tau proteinine özgü birincil antikor (Abcam Anti-Tau antibody [E178]) kullanıldı ve ikincil antikor (Goat anti-Rabbit IgG-HRP (Santa Cruz)) ile muamele sonrası membran görüntülendi (Şekil 4.52). Uygulanan örneklerden pMS-mapt kuyucuğunda 25-35 kDa aralığında, ~35 kDa, ~55 kDa ve 70-100 kDa aralığında olmak üzere dört bant gözlemlendi.



Şekil 4.52: Western blot sonuçları (A: *gua1ura4h⁻*; 2: pMS-mapt; 3: pMS örneklerinden izole edilmiş protein örnekleri, S: Standart protein: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa).

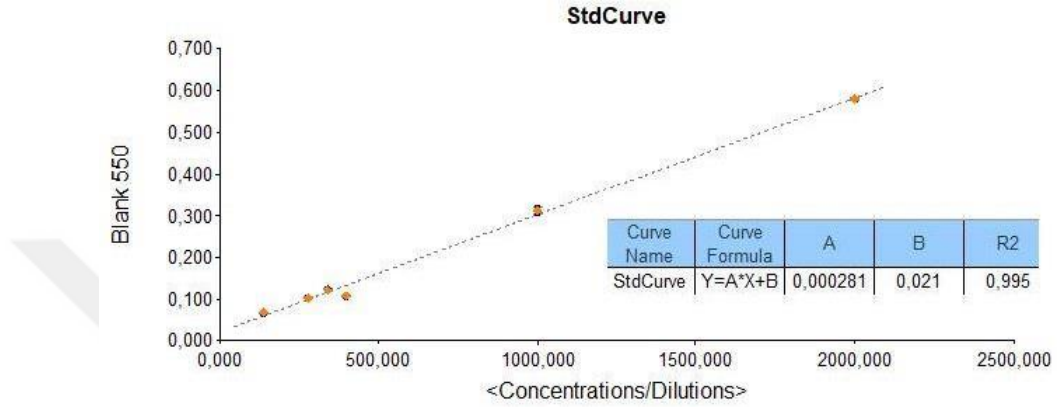
Ayrıca farklı glukoz konsantrasyonu içeren koşullarda üretilmiş pMS-mapt hücrelerinden protein izolasyonu sonrası western blot analizinde eşit miktarda (50 µg) protein içeren örneklerde %0,5 glukoz içeren koşullarda daha kalın bant gözlemlendi (Şekil 4.53).



Şekil 4.53: Farklı glukoz koşullarında üretilmiş pMS-mapt hücrelerinde tau proteini anlatımını gösteren Western blot analiz sonucu membran görüntüsü (I: %0,5, II: %3, III: %5 konsantrasyonunda glukoz içeren koşullarda üretilmiş pMS-mapt hücreleri).

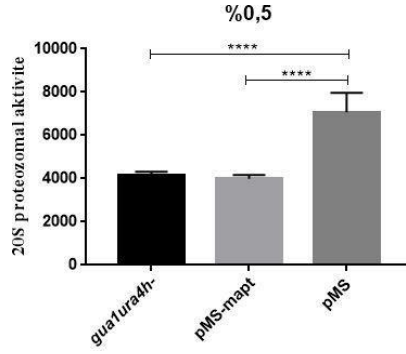
4.7.3. 20S Proteozomal Aktivitenin Ölçümü

Transformant ırklar ve konak ırkta 20S proteozomal aktivite ölçümü öncesi protein miktarı Lowry yöntemiyle belirlendi. İlk olarak standart grafiği çıkarıldı (Şekil 4.54). Standart grafiği eğri denklemi “ $y = 0,000281x + 0,021$ ”, R^2 değeri ise 0,995 olarak bulundu.

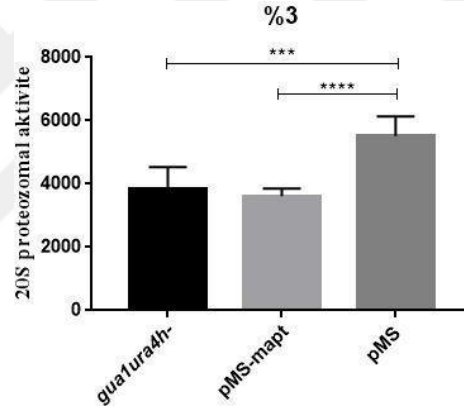


Şekil 4.54: Lowry yöntemi sonucu BSA ile hazırlanmış konsantrasyonu bilinen örnekler kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiği.

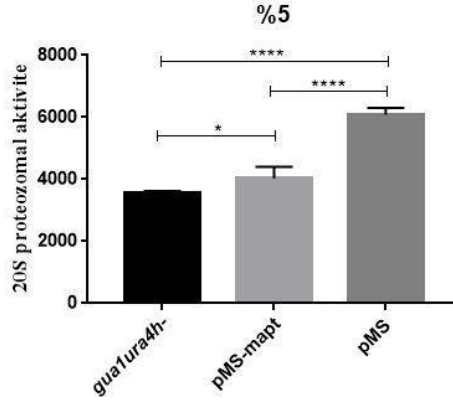
Örneklerin miktarı 50 µg/mL’ye ayarlanarak 20S proteozomal aktivite ölçüldü. AMC (amino-4-metilkumarin) kullanılarak oluşturulan standart grafiği eğri denklemi “ $y=1800,35x + 53,11$ ”, R^2 değeri ise 0,954 olarak bulundu. Deney ve kontrol grupları arasında 20S proteozomal aktivite karşılaştırıldığında %0,5 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda üreyen *gua1ura4h⁻* ve pMS-mapt hücrelerinde yaklaşık olarak aynı miktarda 20S proteozomal aktivite gözlenirken pMS hücrelerinde bu iki gruba göre yaklaşık 2 kat daha fazla 20S proteozomal aktivite gözlemlendi (Şekil 4.55). Hücreler %3 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda üretildiklerinde aynı şekilde *gua1ura4h⁻* ve pMS-mapt hücrelerinde farklılık gözlenmedi. Ancak pMS hücrelerinde yaklaşık olarak 1,5 kat anlamlı bir artış saptandı (Şekil 4.56). %5 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda hücreler üretildiğinde, diğer koşullarda olduğu gibi *gua1ura4h⁻* ve pMS-mapt arasında çok büyük bir farklılık görülmezken, pMS hücrelerinde yine yaklaşık olarak 1,5 katlık anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.57). GraphPad Prism 7 yazılımı kullanılarak 3 tekrarlı olarak yapılan deneylerin analizleri, tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile gerçekleştirildi ve grafikler oluşturuldu.



Şekil 4.55: %0,5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h*⁻, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).



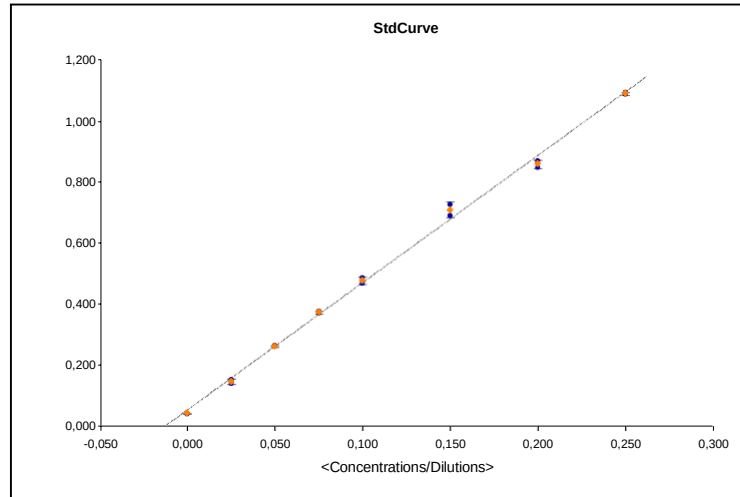
Şekil 4.56: %3 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h*⁻, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0003 ***).



Şekil 4.57: %5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h*⁻, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı 20S proteozomal aktivitelerinin tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0131*).

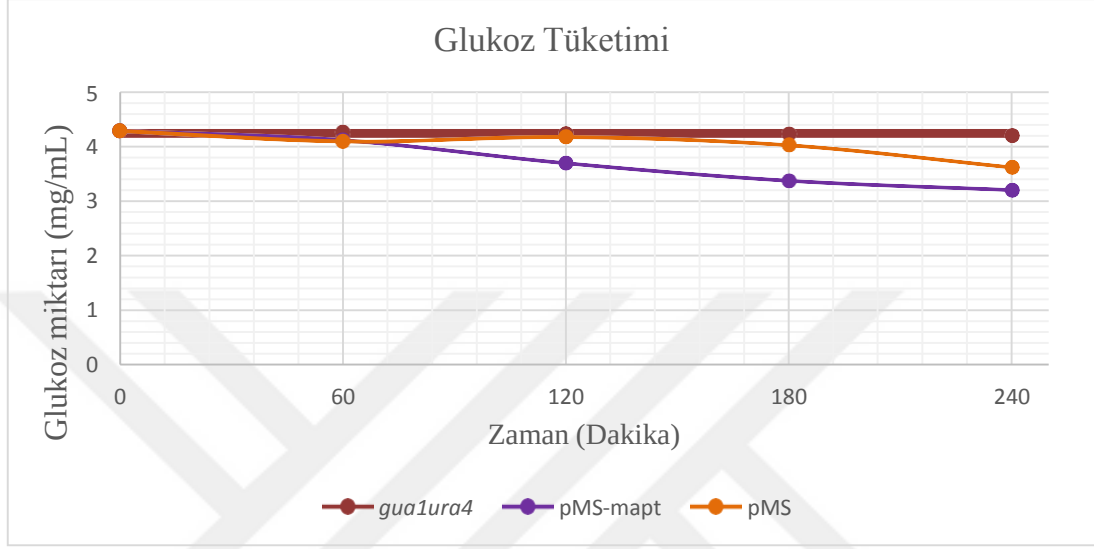
4.7.5. Glukoz Tüketimi

Hücrelerin glukoz tüketimi “Cayman Glucose Colorimetric Assay Kit” kullanılarak üretici firmanın önerdiği koşullarda gerçekleştirildi. Kit içerisindeki talimatlar doğrultusunda öncelikle Şekil 4.58’de gösterilen standart grafiği oluşturuldu. Standart grafiği eğri denklemi “ $y = 4,16x + 0,0534$ ”, R^2 değeri ise 0,998 olarak bulundu.



Şekil 4.58: Cayman Glucose Colorimetric Assay Kit standart grafiği.

Standart grafiğinden yola çıkılarak üretilen *gua1ura4h⁻* mutant ırk, pMS-mapt ve pMS transformant ırklarının glukoz tüketimleri Şekil 4.59'da verildi. 4 saat sonunda *gua1ura4h⁻* hücrelerinin 0,09 mg/mL; pMS transformant hücrelerinin 0,66 mg/mL; pMS-mapt transformant hücrelerinin ise 1,08 mg/mL miktarında glukoz tükettiği belirlendi.



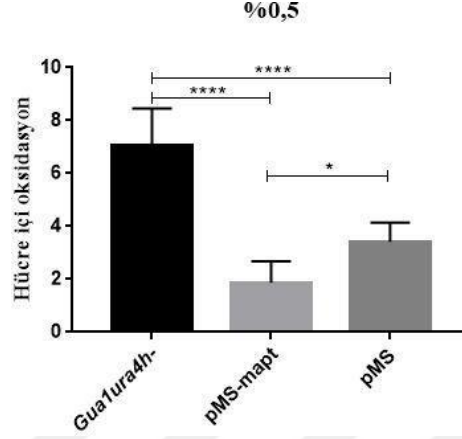
Şekil 4.59: *gua1ura4h⁻*, pMS-mapt, pMS ırklarının glukoz tüketimi.

4.7.6. Hücre İçi Oksidasyon Düzeyinin Belirlenmesi

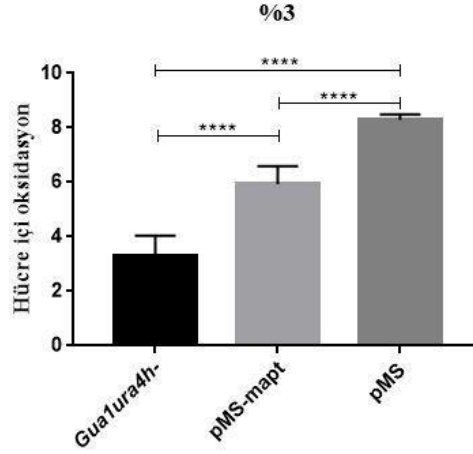
Farklı konsantrasyonlarda (%0.5, %3, %5) glukoz içeren MML besiyerinde üretilen *S. pombe gua1ura4h⁻* mutant ırk, pMS-mapt ve pMS hücrelerinde, hücre içi oksidasyon düzeylerine göre bir karşılaştırma yapıldığında Şekil 4.60, 4.61 ve 4.62'de verilen grafikler elde edildi.

Deney ve kontrol grupları arasında hücre içi oksidasyon miktarı karşılaştırıldığında %0,5 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda hücreler üretildiğinde *gua1ura4h⁻* hücrelerinde, pMS-mapt hücrelerine göre 3 kat, pMS hücrelerine göre ise 2 kat daha fazla anlamlı bir artış belirlendi (Şekil 4.60). Hücreler %3 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda üretildiklerinde pMS-mapt hücrelerinin *gua1ura4h⁻* hücrelerine göre yaklaşık 1,7 kat daha fazla, pMS hücrelerinin ise *gua1ura4h⁻* hücrelerine göre 2,2 kat daha fazla hücre içi reaktif oksijen türlerine sahip olduğu gözlemlendi, iki koşulda da gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu (Şekil 4.61). %5 glukoz konsantrasyonu içeren ortamda hücreler üretildiğinde pMS-mapt ve pMS hücrelerinin *gua1ura4h⁻* hücrelerine göre 2 kat daha fazla hücre içi reaktif oksijen türü içerdiği gözlemlendi. pMS-mapt ve pMS hücreleri arasında anlamlı bir farklılık görülmezken, iki transformant ırk ile

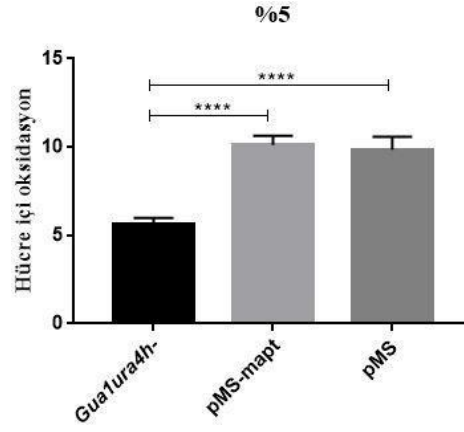
konak ırk hücreleri karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık gözlemlendi (Şekil 4.62). Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve analizi GraphPad Prism 7 yazılımında tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile gerçekleştirilerek grafikler oluşturuldu.



Şekil 4.60: %0,5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h⁻*, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****; 0,0489*).



Şekil 4.61: %3 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h⁻*, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).



Şekil 4.62: %5 glukoz içeren besiyerinde üretilmiş *gua1ura4h⁻*, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin karşılaştırılmalı hücre içi oksidasyon miktarının tek yönlü varyans analizi (P value <0,0001 ****).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Alzheimer hastalığı nöronal hücrelerin ölümü ve sinaps kaybıyla meydana gelen, hücre dışında amiloid- β (A β) plakları ve hücre içinde tau proteinlerinin meydana getirdiği nörofibriller düğümlerin oluşumuyla tanımlanan, nörodejeneratif bir hastalıktır (Porzoor ve Macreadie, 2013). Nörodejenerasyona yol açan proteini kodlayan bazı insan genlerinin karşılığı mayada bulunmamaktadır. Bu organizmalarda heterolog gen anlatımı ("insanlaştırılmış maya/humanized yeast") yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsanlaştırılmış maya sistemlerinin, hastalık ilişkili moleküler süreçleri aydınlatmak ve yeni tıbbi bileşikleri tanımlamak için önemli materyal olduğu kanıtlanmıştır (Mager ve Winderickx, 2005; Johnston, 2020). Nörodejeneratif bozukluklar alanında bu tür çalışmalara örnek olarak, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalığı gibi proteinin yanlış katlanmasıyla ortaya çıkan hastalıklar sayılabilir (Winderickx ve diğ., 2008; Franssens ve diğ., 2010; DeVos ve diğ., 2011). Alzheimer hastalığında tau proteini ve amiloid- β (A β) peptidi, Parkinson hastalığında α -sinüklein ve Lrrk2, Huntington hastalığında huntingtin ile sıralı, yayılım gösteren poliglutamin (polyQ) bölgeleri gibi nörodejenerasyonda rol oynayan çeşitli proteinler heterolog anlatım yoluyla mayada çalışılmıştır (Outeiro ve Lindquist, 2003; Vandebroek ve diğ., 2005). Bu insan proteinlerinin mayadaki anlatımı esnasında, agregasyon fenotipi ve toksisite gibi protein patolojisi ile ilgili önemli özellikler görülmüştür (Pereira ve diğ., 2012).

Maya modelleri, memeli modellerine kıyasla daha az karmaşık ve iyi karakterize edilmiş biyolojisi ile çok sayıda avantaj sağlamaktadır. Ancak, mayaların tek hücreli organizma olmaları ve diğer hücrelere işlevsel olarak bağlı olmamaları gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Maya modelleri, AD'de yer alan hücresel mekanizmaları araştırmak için çok önemli organizmalar olmaya devam etmektedir (Bharadwaj ve diğ., 2010; Seynnaeve ve diğ., 2018).

İnsan MAPT geninin *S. cerevisiae*'de heterolog anlatımı gerçekleştirilmiştir. AD araştırmaları için heterolog tau proteini anlatımı yapan *Saccharomyces cerevisiae* maya modeli daha önce derinlemesine incelenmiştir (DeVos ve diğ., 2011). Ayrıca De Vos ve arkadaşları, insan tau proteini anlatımı yaptırılan mayalarda, tau proteini agregasyonunun önemli bir tau-ilişkili büyüme fenotipine etkisi olmadığını göstermişlerdir (DeVos ve diğ., 2011; Porzoor ve Macreadie, 2013). Çalışmamızda da insan MAPT geninin anlatımını yapan hücrelerde, De Vos

ve arkadaşları'nın (2011) daha önceden belirttiği gibi tau proteini anlatımının hücre büyümesinde ve fenotipinde bir değişime neden olmadığını destekler nitelikte gözlemlendi.

Bu çalışmada sentetik olarak tasarlanan insan MAPT geninin (varyant 2) *S. pombe*'de heterolog anlatımı amaçlandı. Bu amaçla gen 3' ucunda *gfp* genine ait dizileri içerecek şekilde ticari bir plazmid olan *pSGP572* plazmidine ligasyonu yapılarak *S. pombe*'de tau-GFP füzyon proteini eldesi için ilk ve önemli bir basamak olan ligasyon aşaması doğru bir şekilde gerçekleştirildi. Daha sonra insan MAPT geni içeren *pSGP572+mapt* plazmidini *E.coli*'de klonlandıktan sonra, en az 3 tekrarlı olacak şekilde *S. pombe* hücrelerine transformasyonu yapıldı. Bu plazmidle gerçekleştirilen transformasyondan 11 adet pozitif koloni elde edildi. Fenotipik seçim sonrası kolonilerden biri seçilerek MAPT geninin *S. pombe* hücresine aktarıldığı PCR yöntemi ve floresan mikroskop aracılığıyla gösterildi. Ayrıca aktarılan genin anlatım yapıp yapmadığını kanıtlamak için transformasyon sonrası gerçekleştirilen Western blot analizi sonucunda, transformant hücrelerin tau proteini anlatımı yaptığı saptandı. Western blot analizi sırasında PVDF membranda antikorla muamele sonrası 4 farklı bant gözlemlendi. Bu bantlardan 2'sinin (~55 kDa ve 70-100 kDa aralığında) beklediğimiz izoform olan tau proteini ($\square$ 55 kDa) ile tau-gfp füzyon proteinine ($\square$ 55 kDa + $\square$ 27 kDa) ait olduğu düşünüldü. Gözlemllediğimiz diğer iki bant ise Sergeant ve arkadaşlarının (1997) daha önce belirttiği şekilde alternatif kırılma sonucu oluşan izoformlara ait olabileceğini düşündürmektedir. Tau proteini ile ilgili yapılan önceki çalışmalarda (Sergeant ve diğ., 1997; DeVos ve diğ., 2011) belirtildiği gibi fosforilasyon, glikozilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar ve alternatif kırılma nedeniyle western blot analizi sonucunda bazen proteine ait beklenen ağırlık ile gözlenen ağırlık arasında farklılıklar olabilmektedir. Literatür bilgileri bu bulgularımızı destekler niteliktedir.

Aerobik organizmalar, sinyalizasyona zarar verecek şekilde hücre içerisinde artan toksik konsantrasyonlarını ROS (reaktif oksijen türleri) üretimiyle engellemek zorundadır. Hücreler, ROS seviyelerini azaltmak ve fizyolojik koşulları düzenlemek için çok güçlü antioksidan sistemlere sahiptir. Bu sistemler arasında katalazlar, süperoksit redüktazlar ve peroksidazlar önemli rol oynarlar, ancak bazı durumlarda hücrelerin ROS seviyelerini azaltmak ve hücre hasarını onarmak için daha fazla sinyal yolunun indüklenmesi gerekmektedir (Vivancos ve diğ., 2006). Mitokondriyal işlevsel bozukluk ve ROS üretimi, yaşlanma sürecinin ayırt edici genel özellikleri olduğundan, AD'nin yaşla birlikte artan görülme sıklığını da açıklayabilir (Heinisch ve Brandt, 2016). Bu nedenle, oksidatif stres ve tau proteini fosforilasyonu arasındaki etkileşim

ve ilişkilerinin anlaşılabilmesi için gelecek çalışmalarda bu konuların üzerinde daha fazla durulması gerekmektedir (Seynnaeve ve diğ., 2018).

Bu çalışmada stres yanıtıyla ilişkili genlerden *sod1* ve *ctt1* genleri gen anlatım düzeyinde incelendi. *Sod1* geni süperoksit dismutaz, *ctt1* geni ise katalaz enzimini kodlamaktadır. Gen anlatım düzeyinde incelendiğinde pMS-mapt ve pMS hücrelerinde anlamlı bir artış görüldü. De Vos ve arkadaşları (2011) maya hücresinde tau proteinin hücre içerisinde toksisiteyi arttırdığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada benzer şekilde *S. pombe*'de de tau proteininin hücre içerisinde stres yanıtında artışa neden olduğu gözlemlendi.

Daha önceki çalışmalarda *nmt* promotorünün tiaminli ortamda baskılansa bile orta veya düşük seviyede anlatım yapabileceği belirtilmiştir (Forsburg, 1993; Maundrell, 1993; Hoffman ve diğ., 2015). Bu çalışmada da tiamin ile *nmt* promotörünü baskılamamıza karşın benzer bir durumla karşılaştık. Ayrıca Ganini ve arkadaşları (2017), *gfp* gibi floresan proteinlerin anlatımlarının hücrelerde oksidatif strese neden olduğunu bildirmiştir (Ganini ve diğ., 2017). Çalışmamızda pMS hücrelerinde stres yanıtında artış meydana gelmesi, *pSGP572* plazmidinde yer alan *gfp* geninin anlatım yaparak stres oluşturmaktan kaynaklanmaktadır. Hücre içi oksidasyon düzeylerine biyokimyasal olarak bakıldığında, pMS-mapt ve pMS hücrelerinin *gua1ura4h⁻* hücrelerine göre anlamlı bir şekilde daha fazla hücre içi reaktif oksijen türlerine sahip olduğu saptandı. Bu durum tau proteinin hücre içerisinde önemli düzeyde strese neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca *gfp* geninin anlatımı karşılaştırıldığında pMS hücrelerinde daha fazla anlatım gerçekleşmiş olması bu bulguyu destekler niteliktedir.

Hücre içi enerji metabolizmasına bakıldığında, yan ürün olarak ortaya çıkan oksidanların toksik etkilerinin giderilmesi için hücrede bazı ürünler üretilir (Spitz ve diğ., 2000). Bu durumda glukoz açlığı, düşük oksijenli solunum ve fazlaca glikolize giden insan tümör hücrelerinde, hidrojen peroksit ve glutatyon disülfat seviyeleri hücre içinde yükselmektedir. Bu durum hücrede oksidatif stres yaratarak stres yanıt yollarının aktifleşmesine neden olur (Lee ve diğ., 1998; Spitz ve diğ., 2000; Song ve diğ., 2002). Glukoz açlığı oksidatif strese neden olarak transkripsiyon faktörü olan *pap1*'in (AP-1 transkripsiyon faktörü) nükleusta birikmesine ve *pap1*'in *ctt1*, *trr1* ve *sod1* (Toone ve diğ., 1998; Mutoh ve diğ., 2002) gibi oksidatif stres yanıt genlerinin anlatımının artmasını sağlamaktadır (Madrid ve diğ., 2004). Bu çalışmada glukoz açlığı koşullarında (%0,5) hücreler incelendiğinde gen anlatımı düzeyinde *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımından yola çıkılarak stres yanıtının tüm hücrelerde arttığı görüldü. Glukoz

baskılaması koşullarında (%5) ise konak ve pMS-map1 hücrelerinde stres yanıtı ile ilişkili genlerin anlatım düzeyinde azalma, pMS hücrelerinde ise diğer hücrelerin aksine artış izlendi. pMS hücrelerindeki bu artışa, glukoz baskılaması koşullarından daha çok gfp proteininin hücrede meydana getirdiği stres yanıtının neden olduğunu düşündürmektedir.

Mayalarda glukoz varlığında, alternatif karbon kaynaklarının kullanımı, oksijenli solunum, stres yanıt yolları ve sporulasyon baskılanırken (glukoz baskılaması), glikoliz ve fermentasyon aktive edilir (glukoz aktivasyonu) (Johnston, 1999). *S. pombe*'de glukoz varlığında ilk olarak G protein-bağlı reseptör (GPCR) aracılığı ile glukoz algılanmakta ve sonrasında cAMP bağımlı protein kinaz A (PKA) aracılığı ile sinyal iletimi gerçekleşmektedir (Hoffman ve Winston, 1991; Byrne ve Hoffman, 1993; Hoffman, 2005). Glukoz baskılama sinyali cAMP bağımlı PKA yolağının aktivasyonu ile *fbp1* geninin anlatımını baskımlarken (Hoffman ve Winston, 1990), buna karşılık glukoz açlığı sinyali *fbp1* geninin anlatımını MAPK'ın aktivasyonu aracılığı ile arttırmaktadır (Palabıyık ve diğ., 2012). Glukoz metabolizmasında yer alan diğer bir enzim de hekzokinaz 2 enzimidir ve *hxx2* geni tarafından kodlanmaktadır. Hekzokinaz-2 enzimi ise, glikolitik akışın ilk basamağında görev alan bir enzimidir (Walker, 1998).

Mayalarda glukoz açlığı koşullarında hücre, hücresel solunumu tercih etmekte ve metabolik olarak glukoneogenetik yönde bir akış meydana gelmektedir. Buna bağlı olarak *fbp1* geninin anlatımı artarken, *pka1* geni tarafından kodlanan protein kinaz A (PKA) ise glikoneogeneze ters çalıştığı için anlatımı düşmektedir (Hoffman ve Winston, 1991; Byrne ve Hoffman, 1993; Hoffman, 2005). *pka1* ile *gsk3* geni pozitif genetik etkileşim içerisinde olduklarından *gsk3* geninin anlatımında azalma, bu koşullar altında *gsk3* geni ile negatif genetik etkileşim gösteren *ppa2* geninin anlatımında artış görülmesi beklenen bir durumdur. Ayrıca oksidatif stres yanıtı da artmaktadır (Rallis ve diğ., 2017). Mayalarda glukoz baskılaması koşullarında hücre fermentasyona gider ve glikolitik akış hızlanır. Buna bağlı olarak *fbp1* gen anlatımında düşüş, glikoneogenez ile ters çalışan *pka1* geninin anlatımında ise artış beklenmektedir. Bu nedenle *pka1* geni ile pozitif genetik etkileşim içerisinde olan *gsk3* geninin anlatımında artış, *ppa2* geninin anlatımında ise azalma beklenmektedir. Glukoz baskılaması koşullarında stres yanıt genlerinin anlatımında azalma görüleceği bildirilmiştir (Hoffman ve Winston, 1991; Byrne ve Hoffman, 1993; Hoffman, 2005).

Bu çalışmada optimum glukoz konsantrasyonu içeren koşullarda hücreler arasında karşılaştırma yaptığımızda *hvk2* gen anlatımı pMS-mapt hücrelerinde, konak ırka göre azalırken, pMS hücrelerinde artış gözlemlendi. Glikoneogenezde görevli *fbp1* geni bakımından incelediğimizde hücrelerde anlamlı bir farklılık görülmedi. Tau proteini fosforilasyonunda görevli *gsk3* geninin anlatımına hem pMS-mapt hem de pMS hücrelerinde baktığımızda azaldığı görüldü. Hücrede defosforilasyonda görevli olan *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımı pMS-mapt hücrelerinde değişmedi, pMS hücrelerinde artış izlendi.

Değişen glukoz konsantrasyonu koşullarında, glukoz açlığı hücresel solunuma yol açmaktadır (Hoffman ve Winston, 1991; Byrne ve Hoffman, 1993; Hoffman, 2005). Çalışmamızda literatüre uygun şekilde konak ırkta *fbp1* geninin anlatımının arttığı, *gsk3* geninin anlatımının azaldığı saptandı. Konak ırka ait gen anlatım analizlerinde bu iki genin birbirlerine zıt bir profil oluşturduğu, glukoz açlığı koşullarında konakta *fbp1* gen anlatımı artarken, *gsk3* genin anlatımının azaldığı görüldü. *Ppa2* geni, *gsk3* geniyle negatif genetik etkileşimde olması nedeniyle beklendiği gibi anlatımı artış gösterdi. Vivancos ve arkadaşlarının (2006) belirttiği gibi hücresel solunum arttığında hücre içerisinde stres yanıtı da artmaktadır ve buna uygun şekilde konak ırkta stres yanıtından sorumlu *sod1* ve *ctt1* genlerinin anlatımının arttığı saptandı. Konak ırkta glukoz baskılaması durumunda literatüre uygun şekilde *fbp1* ve *sod1* genlerinin anlatımı azalırken, *gsk3* ve *hvk2* genlerinin anlatımında artış meydana geldi. Bunun yanı sıra *ctt1*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımında değişiklik görülmedi.

pMS-mapt hücrelerinde glukoz açlığı koşullarında bekleneceği gibi hücrede glikoneogenezde görevli *fbp1*, stres yanıtı genleri *sod1* ve *ctt1* genleri ile defosforilasyonda görevli *ppa2* ve *dis2* genlerinin anlatımında artış meydana geldi. Glukoz tüketimine biyokimyasal olarak bakıldığında pMS-mapt hücrelerinin diğer iki gruba göre 4 saatlik sürede daha fazla glukoz tüketmesi, glukoz metabolizmasının hızlandığına işaret etmektedir. Glukoz açlığı koşulları sağlanmış olsa da *hvk2* geninin anlatımının artış göstermesi, glukoz tüketimiyle ilgili biyokimyasal bulgularımızı destekler niteliktedir. Glukoz baskılaması koşullarında ise stres yanıtı ile ilişkili *sod1*, *ctt1* genleri, enerji metabolizmasıyla ilişkili *fbp1* geni ve defosforilasyondan sorumlu *dis2* ve *ppa2* genleri, *gsk3* ve *hvk2* genlerinin anlatımında azalma meydana geldi. pMS-mapt hücrelerinde glukoz baskılaması ve açlığı koşullarında marker olarak kullandığımız heksokinaz enzimini kodlayan *hvk2* geni ile *gsk3* geninin transkript düzeylerinde beklenenden farklılık göstermiş olması bu konudaki literatür bilgilerine göre

kabul edilebilir bir durumdur. Enzimler hücre içerisinde değişen koşullarda aktif ya da inaktif halde bulunabilmektedir. *Gsk3* gen anlatımındaki azalma, hücre içerisindeki enzim miktarının az olduğu anlamına gelmemektedir (Alberts ve diğ., 2015). Glukoz açlığı koşullarında pMS-mapt hücrelerinin daha fazla glukoz harcamış olması ve *hvk2* genindeki artıştan yola çıkarak glukoz metabolizmasının hızlandığı gözlemlendi. Adams ve arkadaşları (2019), amiloid- β proteini bulunmadığında tau proteini ile glukoz metabolizması arasında pozitif yönde güçlü bir ilişki olduğunu, ayrıca tau proteini patolojisi arttıkça metabolizmada yavaşlama meydana gelebileceğini ve bu ilişkinin negatif yönde ilerleyeceğini rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda da kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında pMS-mapt hücrelerinde glukoz metabolizmasında hızlanma olduğu ve pMS-mapt hücreleri MAPT geni bakımından gen anlatımı düzeyinde incelendiğinde, diğer koşullara göre glukoz açlığı koşulunda etkili bir artış görüldü.

Mayalarda glukoz açlığı koşullarında glukoz, yüksek afiniteli heksoz taşıyıcıları tarafından, glukoz baskılaması koşullarında ise düşük afiniteli heksoz taşıyıcıları tarafından hücreye taşınmaktadır (Saitoh ve diğ., 2014). Chen ve arkadaşları (2020), tau proteininin glukoz alımını etkilediğini rapor etmişlerdir. Chen ve arkadaşlarına göre tau proteini kaynaklı AD'de glukoz alımında bozukluklar meydana gelmektedir ve bu bozukluklar glukoz taşıyıcılarının azalmasına bağlı olarak glukoz alımında azalmayla sonuçlanmaktadır. Hücre içerisinde azalan glukoz alımı da yavaşlayan metabolizma ile ilişkilidir. Ayrıca glukoz alım bozukluğunun, tau proteini patolojisi oluşmadan önce meydana gelebileceğini ileri sürmüşlerdir. Çalışmamızda pMS-mapt hücrelerinin değişen glukoz koşullarında beklenenden farklı bir gen anlatım profili sergilemesi, transformant hücrenin glukoz açlığı koşullarında yüksek afiniteli heksoz taşıyıcıları kullanırken, glukoz baskılaması koşullarında düşük afiniteli heksoz taşıyıcıları kullanmadığını düşündürdü.

pMS hücreleri glukoz açlığı koşulunda *gsk3* gen anlatımı dışında konak ırka benzer bir gen anlatım profili gösterdi. Ancak stres yanıtı ile ilişkili genlerin konak ırka göre daha fazla anlatım yaptığını belirledik. pMS hücrelerinde glukoz açlığı koşullarına uygun şekilde *sod1*, *ctt1*, *fbp1*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımı artarken, glikoneogenez yönünde metabolik akış ilerlediği için glikolizde görev alan *hvk2* geninin anlatımında azalma meydana geldi. Glukoz baskılaması koşullarında ise *fbp1*, *sod1*, *ctt1*, *gsk3*, *dis2* ve *ppa2* genlerinin anlatımında artış meydana geldi. Stres yanıt genlerinde meydana gelen artış, bu stres yanıtının *gfp* geninin aşırı anlatımından

kaynaklanıyor olabileceğini düşündürmektedir. *Gfp* geni *S. pombe* hücresi için yabancı bir gendir ve MAPT ile birlikte bulunmadığı koşullarda, füzyon proteini halinde bulunduğu koşullara göre daha fazla anlatım yapıyor olması hücre içinde stres yanıtına yol açabileceğine işaret etmektedir (Ganini ve diğ., 2017).

Bazı veriler tau proteininin proteozomal yıkım ile yıkılabileceğini gösterirken (David ve diğ., 2002; Petrucelli ve diğ., 2004; Zhang ve diğ., 2005; Dickey ve diğ., 2007), aşırı anlatımı yapılan tau proteini ve endojen tau proteininin farklı yıkım yollarına gidebileceğine dair kanıtlar bulunmuştur (Luo ve diğ., 2007). Krüger ve arkadaşları, otofajinin endojen tau proteininin yıkımı için birincil yol olduğu görüşünü savunmaktadır (Krüger ve diğ., 2012).

Bu çalışmamızda 20S proteozomal aktiviteyi biyokimyasal yolla ölçtüğümüzde pMS-mapt hücreleri ile konak hücreler arasında farklılık görülmedi. Ancak pMS hücrelerinde 20S proteozomal aktivitede bir artış gerçekleşti. Bu durum pMS hücrelerinde bulunan gfp proteinlerinin proteozomal yıkım ile yıkıldığını düşündürdü.

Glukoz açlığı ve glukoz baskılaması koşullarında ise aynı şekilde konak ve pMS-mapt hücreleri arasında 20S proteozomal aktivitede farklılık görülmezken, pMS hücrelerinde artış meydana geldi. Değişen glukoz konsantrasyonlarının proteozomal aktivite üzerinde bir etkiye neden olmadığı saptandı.

Çalışmamızda glukoz açlığı koşullarındaki hücrelerde, literatüre uygun şekilde *ppa2* ve *atg14* genleri arasında pozitif yönde bir korelasyon görüldü. Glukoz açlığı koşullarında konak ve transformant hücreleri karşılaştırdığımızda en çok artışın ve buna bağlı olarak da en çok otofaji gerçekleştiren hücrelerin pMS-mapt hücreleri olduğunu belirledik.

Agregat eğilimli proteinlerin anlatımı, glukoz yoksunluğu (glikozilasyonun azalması ve şaperon aktivitesi için azaltılmış enerji ile sonuçlanır), hipoksiya, oksidatif stres ve ER'den Ca^{2+} akışı gibi birçok ER stres uyararı, ER'de katlanma kapasitesini aşan katlanmamış proteinlerin birikimine yol açmaktadır. Giderek artan sayıdaki çalışmalar, mayadan memelilere kadar otofajinin, ER stresini tarafından indüklendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, ER stresini otofajiye bağlayan sinyal mekanizmaları, spesifik stres koşullarına ve incelenen organizmalara bağlı olarak değişmektedir. Mayadaki UPR sinyal yolağına, stres algılama domaini ve sitozolik endoribonükleaz domaini içeren bir ER transmembran proteini olan Ire1 (inositol-requiring kinase 1) aracılık etmektedir. (Bernales ve diğ., 2006).

Bu çalışmada da *ire1* gen anlatımı normal koşullarda konak ırk ve pMS hücrelerinde değişim göstermezken pMS-mapt hücrelerinde artış gösterdi. Bu durum tau proteininin hücre içerisinde ER stresine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Glukoz açlığı koşullarında *ire1* geni anlatımı tüm hücre tiplerinde artışa neden oldu. Bernales ve arkadaşlarının (2006) bulgularına uygun olarak, bu hücrelerde otofaji ile ilişkili olan *atg14* geninin anlatımının da artış göstermesi ER stresinin otofajiyi indükleyici etkisini destekler niteliktedir. Glukoz açlığı gibi çevresel streslerin otofajiye katkısı olduğu bilinmektedir (Metcalf ve diğ., 2012). Ancak pMS-mapt hücrelerinde bu artışın oldukça yüksek olması glukoz açlığının yanı sıra tau proteininin varlığının da bu genler arasındaki etkileşime otofajinin artması yönünde katkı sağladığını düşündürdü.

Glukoz baskılaması koşullarında ise *ire1* gen anlatımında konak ırk ve pMS hücrelerinde artış, pMS-mapt hücrelerinde azalma görüldü. Glukoz baskılayıcı koşullarda pMS-mapt hücrelerinde ER stresinde azalma, tüm hücre tiplerinde *atg14* geninin anlatımında artış meydana geldi, ancak pMS-mapt hücrelerini diğer hücrelerle karşılaştırdığımızda bu artış oldukça düşük seviyede saptandı. *atg14* geninin anlatımındaki bu değişim, otofajideki azalmanın ER stresinde meydana gelen düşme ile ilişkili olabileceğini düşündürdü.

İnsülin direnci ve Tip II diyabetin, beyinde AD'nin neden olduğu nörodejenerasyonla yakından ilişkili olduğu keşfedilmiş ve Alzheimer hastalığı (AD), "Tip III diyabet" olarak tanımlanmıştır (Shieh ve diğ., 2020). Glisemik kontrol, diyabet hastalığının odak noktasını oluşturmaktadır. Kronik hipergliseminin zaman içinde kademeli olarak beyni de etkileyebildiği bilinmektedir (Pugazhenthı ve diğ., 2017). Beyinde enerji depolaması sınırlıdır ve düşük oksijen veya glukoz beyin fonksiyonlarını azaltmaktadır. Bu nedenle de beyin, kandan glukoz alımına ihtiyaç duymaktadır. Ancak AD hastalarında glukoz metabolizmasının önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Butterfield ve Halliwell, 2019). Çalışmamızda gen anlatım düzeyinde analizlerin sonucunda, glukoz baskılaması koşullarında, pMS-mapt ırkında glukoz metabolizmasının yavaşladığı görüldü. Bu durum insülin direncinde gözlenen, ortamda glukoz varlığına rağmen hücrenin glukozu içeri alamamasına benzer bir durumdur. Transformant ırkta bu durumun gerçekleşmiş olması, tau proteininin hücreye glukoz alımında bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak *S. pombe* alternatifi olan ve sıklıkla çalışmalarda kullanılan *S. cerevisiae* ile kıyaslandığında hücresel süreçler bakımından memelilere daha yakındır. Bu çalışmada elde

ettiğimiz tau proteini içeren model organizma kullanılarak Alzheimer hastalığı ve diğer tau proteini ile ilişkili hastalıkların moleküler mekanizmasını (stres yanıtı, ER stresi, protein katlanması, apoptoz, mikrotübül organizasyonu vb.) aydınlatmak ve bu hastalığa karşı etken madde (doğal ve sentetik bileşikler, sekonder metabolitler, çeşitli ilaç ham maddesi vb.) veya ilaçların etkilerini kısa sürede gözlemlemek mümkün hale gelebilecektir. Çalışmamıza yapılan deneylere ek olarak daha ileri teknikler kullanılarak heterolog tau proteininin daha ayrıntılı incelemesi gerçekleştirilebilir.



KAYNAKLAR

- Adams, J.N., Lockhart, S.N., Li, L., Jagust, W.J., 2019, Relationships between tau and glucose metabolism reflect Alzheimer's disease pathology in cognitively normal older adults, *Cerebral Cortex*, 29(5), 1997-2009.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2015, Molecular biology of the cell (6th Edition), Garland Science, Taylor & Francis Group, ISBN 978-0-8153-4464-3.
- Altimus, C.M., Keller, K., Brannelly, P., Ross, E., ..., Stevens, M., 2019, Analysis of tauopathy research funding between 2006 and 2016 reveals critical gaps in research priorities, *Alzheimer's & Dementia*, 15(1), 42-54.
- Aravind, L., Watanabe, H., Lipman, D.J., Koonin, E.V., 2000, Lineage-specific loss and divergence of functionally linked genes in eukaryotes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 11319–11324.
- Askanas, V., Engel, W.K., Bilak, M., Alvarez, R.B., Selkoe, D.J., 1994, Twisted tubulofilaments of inclusion body myositis muscle resemble paired helical filaments of Alzheimer brain and contain hyperphosphorylated tau, *The American journal of pathology*, 144, 177–187.
- Avila, J., 2008, Tau kinases and phosphatases: commentary, *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 258–259.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., ..., Ktistakis, N.T., 2008, Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum, *The Journal of cell biology*, 182, 685–701.
- Bastow, E.L., Gourlay, C.W., Tuite, M.F., 2011, Using yeast models to probe the molecular basis of amyotrophic lateral sclerosis, *Biochemical Society Transactions*, 39, 1482–1487.
- Bernales, S., McDonald, K.L., Walter, P., 2006, Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response, *PLoS biology*, 4(12).

- Bharadwaj, P., Martins, R., Macreadie, I., 2010, Yeast as a model for studying Alzheimer's disease, *FEMS Yeast Research*, 10, 961–969.
- Brandis, K.A., Holmes, I.F., England, S.J., Sharma, N., Kukreja, L., DebBurman, S.K., 2006, α -synuclein fission yeast model, *Journal of Molecular Neuroscience*, 28(2), 179-191.
- Braun, R.J., Büttner, S., Ring, J., Kroemer, G., Madeo, F., 2010, Nervous yeast: Modeling neurotoxic cell death, *Trends in biochemical sciences*, 35, 135-144.
- Braun, R.J., 2015, Ubiquitin-dependent proteolysis in yeast cells expressing neurotoxic proteins, *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 8.
- Breitenbach, M., Ralser, M., Perrone, G.G., ... Daves, I.W., 2013, Oxidative stress and neurodegeneration: the yeast model system, *Frontiers in Bioscience*, 18, 1174-1193.
- Brodsky, J.L., 2012, Cleaning up: ER-associated degradation to the rescue, *Cell*, 151, 1163–1167.
- Butterfield, D.A., Halliwell, B., 2019, Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease, *Nature Reviews Neuroscience*, 20(3), 148-160.
- Byrne, S.M., Hoffman, C.S., 1993, Six git genes encode a glucose-induced adenylate cyclase activation pathway in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of cell science*, 105(4), 1095-1100.
- Cardenas, A.M., Ardiles, A.O., Barraza, N., Baez-Matus, X., Caviedes, P., 2012, Role of tau protein in neuronal damage in Alzheimer's Disease and Down Syndrome, *Archives of medical research*, 43, 645-654.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., Madeo, F., 2010, Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines, *Cell Death & Differentiation*, 17, 763–773.
- Chen, L., Wei, Z., Chan, K.W., Li, Y., Suchal, K., Bi, S., ..., Xu, J., 2020, D-Glucose uptake and clearance in the tauopathy Alzheimer's disease mouse brain detected by on-resonance variable delay multiple pulse MRI, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 0271678X20941264.

- Chiang, H.L., Dice, J.F., 1988, Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal, *Journal of Biological Chemistry*, 263, 6797–6805.
- Cirak, Y., Sarsik, B., Cakar, B., Sen, S., Simsir, A., Uslu, R., 2013, Predictive and prognostic values of Tau and BubR1 protein in prostate cancer and their relationship to the Gleason score, *Medical oncology*, 30, 526.
- Crowther, T., Goedert, M., Wischik, C.M., 1989, The repeat region of microtubule-associated protein tau forms part of the core of the paired helical filament of Alzheimer's disease, *Annals of medicine*, 21(2), 127-132.
- David, D.C., Layfield, R., Serpell, L., Narain, Y., Goedert, M., Spillantini, M.G., 2002, Proteasomal degradation of tau protein, *Journal of neurochemistry*, 83, 176-185.
- DeVos, A., Anandhakumar, J., Van den Brande, J., Verduyck, M., Franssens, V., Winderickx, J., ... , Swinnen, E., 2011, Yeast as a model system to study tau biology, *International journal of Alzheimer's disease*, 428970.
- Dickey, C.A., Dunmore, J., Lu, B., Wang, J.W., Lee, W. C., Kamal, A., Burrows, F., Eckman, C., Hutton, M., Petrucelli, L., 2006, HSP induction mediates selective clearance of tau phosphorylated at proline-directed Ser/Thr sites but not KXGS (MARK) sites, *The FASEB journal*, 20, 753–755.
- Dickey, C.A., Kamal, A., Lundgren, K., Klosak, N., Bailey, R.M., Dunmore, J., ... , Petrucelli, L., 2007, The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins, *The Journal of clinical investigation*, 117(3), 648–658.
- Drewes, G., Trinczek, B., Illenberger, S., Biernat, J., Schmitt-Ulms, G., Meyer, ..., Mandelkow, E., 1995, Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions and dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262, *Journal of Biological Chemistry*, 270, 7679–7688.
- Egel, R., 2004, *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN 978-3642056314.

- Fekete, T., Raso, E., Pete, I., Tegze, B., Liko, I., Munkacsy, G., ..., Györfy, B., 2012, Meta-analysis of gene expression profiles associated with histological classification and survival in 829 ovarian cancer samples, *International journal of cancer*, 131, 95–105.
- Forman, M. S., Trojanowski, J. Q., Lee, V.M.Y., 2004, Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs, *Nature medicine*, 10(10), 1055–1063.
- Forsburg, S.L., 1993, Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems, *Nucleic acids research*, 21(12), 2955.
- Franssens, V., Boelen, E., Anandhakumar, J., Vanhelmont, T., Buttner, S., Winderickx, J., 2010, Yeast unfolds the road map toward α -synuclein-induced cell death, *Cell Death & Differentiation*, 17(5), 746–753.
- Fu, C., Ward, J.J., Loiodice, I., Velve-Casquillas, G., Nedelec, F.J., Tran, P.T., 2009, Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation, *Developmental cell*, 17(2), 257–267.
- Ganini, D., Leinisch, F., Kumar, A., Jiang, J., Tokar, E.J., Malone, C.C., ..., Mason, R.P., 2017, Fluorescent proteins such as eGFP lead to catalytic oxidative stress in cells, *Redox biology*, 12, 462–468.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., ..., Merad, M., 2010, Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages, *Science*, 330(6005), 841–845.
- Gitler, A.D., 2008, Beer and bread to brains and beyond: can yeast cells teach us about neurodegenerative disease?, *Neurosignals*, 16, 52–62.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M.C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., ..., Hardy, J., 1991, Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease, *Nature*, 349(6311), 704–706.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., 2006, A century of Alzheimer's disease, *Science*, 314(5800), 777–781.

- Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., Crowther, R.A., 1989, Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease, *Neuron*, 3(4), 519-526.
- Goldbaum, O., Oppermann, M., Handschuh, M., Dabir, D., Zhang, B., Forman, M.S.,..., Richter-Landsber, C., 2003, Proteasome inhibition stabilizes tau inclusions in oligodendroglial cells that occur after treatment with okadaic acid, *Journal of Neuroscience*, 23, 8872-8880.
- Guerriero, C.J., Brodsky, J.L., 2012, The Delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology, *Physiological reviews*, 92, 537–576.
- Guo, T., Noble, W., Hanger, D.P., 2017, Roles of tau protein in health and disease, *Acta neuropathologica*, 133(5), 665-704.
- Gutz H., Heslot H., Leupold U., Loprieno N., 1974, *Schizosaccharomyces pombe*, 395–446. Handbook of Genetics. ed. King, R.C., Plenum Press, New York.
- Hagan, I.M., 1998, The fission yeast microtubule cytoskeleton, *Journal of cell science*, 111, 1603-1612.
- Hamad, İ., 2007, *Oksidatif stres uygulanmış Schizosaccharomyces pombe'de protein oksidasyonuna karşı doğal antioksidanların koruyucu etkisi*, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Hamano, T., Gendron, T.F., Causevic, E., Yen, S.H., Lin, W.L., Isidoro, C., ..., Ko, L.W., 2008, Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression, *European Journal of Neuroscience*, 27, 1119–1130.
- Hanna, M., Xiao, W., 2006, Isolation of nucleic acids. In *Yeast Protocol*, 15-20. Humana Press, Totowa, NJ.
- Heinisch, J.J., Brandt, R., 2016, Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: the humanization of yeast cells, *Microbial Cell*, 3(4), 135.

- Hoffman, C.S., Winston, F., 1989, A transcriptionally regulated expression vector for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Gene*, 84(2), 473-479.
- Hoffman, C.S., Winston, F., 1990, Isolation and characterization of mutants constitutive for expression of the *fbp1* gene of *Schizosaccharomyces pombe*, *Genetics*, 124(4), 807-816.
- Hoffman, C.S., Winston, F., 1991, Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe fbp1* gene occurs by a cAMP signaling pathway, *Genes & development*, 5(4), 561-571.
- Hoffman, C.S., 2005, Glucose sensing via the protein kinase A pathway in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemical Society Transactions*, 33(1), 257-260.
- Hoffman, C.S., Wood, V., Fantes, P.A., 2015, An ancient yeast for young geneticists: a primer on the *Schizosaccharomyces pombe* model system, *Genetics*, 201(2), 403-423.
- Hoogenraad, C.C., Bradke, F., 2009, Control of neuronal polarity and plasticity – a renaissance for microtubules?, *Trends in cell biology*, 19, 669–676.
- Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008, The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease, *Journal of neurochemistry*, 104, 1433–1439.
- Huang, J., Klionsky, D.J., 2007, Autophagy and human disease, *Cell cycle*, 6, 1837–1849.
- Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, K., Izawa, S., Kimura, A., 1999, Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of Biological Chemistry*, 274 (38), 27002-27009.
- Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., 2008, Alzheimer neurofibrillary degeneration: significance, etiopathogenesis, therapeutics and prevention: Alzheimer review series, *Journal of cellular and molecular medicine*, 12(1), 38–55.
- Irie, K., Murakami, K., Masuda, Y., Morimoto, A., Ohigashi, H., Ohashi, R., ... Shirasawa, T., 2005, Structure of β -amyloid fibrils and its relevance to their neurotoxicity: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Journal of bioscience and bioengineering*, 99, 437-447.

- Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J.,..., Götz, J., 2010, Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models, *Cell*, 142, 387–397.
- Jo, C., Gundemir, S., Pritchard, S.,..., Johnson, G.V., 2014, Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52, *Nature communications*, 5, 3496.
- Johnston, M., 1999, Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells, *Trends in Genetics*, 15, 29-33.
- Johnston, M., 2020, Model Organisms: Nature's Gift to Disease Research, *Genetics*, 214(2), 233-234.
- Josephs, K.A., 2017, Current understanding of neurodegenerative diseases associated with the protein tau, *Mayo Clinic Proceedings*, 92(8), 1291-1303.
- Kamat, P.K., Rai, S., Nath, C., 2013a, Okadaic acid induced neurotoxicity: an emerging tool to study Alzheimer's disease pathology, *Neurotoxicology*, 37, 163–172.
- Kamat, P.K., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., Ali, S., Najmi, A.K., Nath, C., 2013b, Okadaic acid-induced Tau phosphorylation in rat brain: role of NMDA receptor, *Neuroscience*, 238, 97–113.
- Kamat, P.K., Rai, S., Swarnkar, S., Shukla, R., Nath, C., 2014, Molecular and cellular mechanism of okadaic acid (OKA)-induced neurotoxicity: a novel tool for Alzheimer's Disease therapeutic application, *Molecular neurobiology*, 50, 852–865.
- Kamenetz, F., Tomita, T., Hsieh, H., Seabrook, G., Borchelt, D., Iwatsubo, T.,..., Malinow, R., 2003, APP processing and synaptic function, *Neuron*, 37, 925-937.
- Kanai, Y., Hirokawa, N., 1995, Sorting mechanisms of tau and MAP2 in neurons: suppressed axonal transit of MAP2 and locally regulated microtubule binding, *Neuron*, 14, 421–432.
- Kanter-Smoler, G., Dahlkvist, A., Sunnerhagen, P., 1994, Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells, *Biotechniques*, 16(5), 798-800.

- Karaer, S., 2001, *Schizosaccharomyces pombe*'nin inozin monofosfat dehidrogenaz (*gual*) geninin klonlanması ve yapısal analizi, Doktora, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Karran, E., Mercken, M., De Strooper, B., 2011, The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics, *Nature reviews Drug discovery*, 10, 698-712.
- Khurana, V., Lindquist, S., 2010, Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: Why cook with baker's yeast?, *Nature Reviews Neuroscience*, 11, 436-449.
- Kimura, T., Yamashita, S., Fukuda, T.,..., Takashima, A., 2007, Hyperphosphorylated tau in parahippocampal cortex impairs place learning in aged mice expressing wild-type human tau, *The EMBO journal*, 26, 5143–5152.
- Kimura, T., Fukuda, T., Sahara, N.,..., Takashima, A., 2010, Aggregation of detergentinsoluble tau is involved in neuronal loss but not in synaptic loss, *Journal of Biological Chemistry*, 285, 38692–38699.
- Kimura, N., 2016, Diabetes mellitus induces Alzheimer's disease pathology: histopathological evidence from animal models, *International journal of molecular sciences*, 17(4), 503.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A.,..., Veenhuis, M., 2003, A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes, *Developmental cell*, 5, 539–545.
- Knowles, T.P.J., Vendruscolo, M., Dobson, C.M., 2014, The amyloid state and its association with protein misfolding diseases, *Nature*, 15, 384–396.
- Koga, H., Martinez-Vicente, M., Macian, F.,..., Cuervo, A.M., 2011, A photoconvertible fluorescent reporter to track chaperone-mediated autophagy, *Nature communications*, 2, 386.
- Kolarova, M., Garcia-Sierra, F., Bartos, A., Ricny, J., Ripova, D., 2012, Structure and pathology of tau protein in Alzheimer Disease, *International journal of Alzheimer's disease*, doi:10.1155/2012/731526.

- Kontsekova, E., Zilka, N., Kovacech, B., Skrabana, R., Novak, M., 2014, Identification of structural determinants on tau protein essential for its pathological function: novel therapeutic target for tau immunotherapy in Alzheimer's disease, *Alzheimer's research & therapy*, 6 (4), 45.
- Kruegel, U., Robison, B., Dange, T., Kahlert, G., Delaney, J.R., Kotireddy, S.,..., Schmidt, M., 2011, Elevated proteasome capacity extends replicative lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*, *PLoS Genetics*, 7, e1002253.
- Krüger, U., Wang, Y., Kumar, S., Mandelkow, E.M., 2012, Autophagic degradation of tau in primary neurons and its enhancement by trehalose, *Neurobiology of aging*, 33(10), 2291-2305.
- Lee, Y.J., Galoforo, S.S., Berns, C.M., Chen, J.C., Davis, B.H., Sim, J.E.,..., Spitz, D.R., 1998, Glucose deprivation-induced cytotoxicity and alterations in mitogenactivated protein kinase activation are mediated by oxidative stress in multidrug-resistant human breast carcinoma cells, *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5294-9.
- Lee, V.M.Y., Goedert, M., Trojanowski, J.Q., 2001, Neurodegenerative tauopathies, *Annual review of neuroscience*, 24, 1121–1159.
- Leupold, U., 1970, Genetical methods for *Schizosaccharomyces pombe*, *In Methods in Cell Physiology*, 4, 169-177.
- Levy-Lahad, E., Wijsman, E.M., Nemens, E.,..., Schellenberg, G.D., 1995, A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1, *Science*, 269, 970–973.
- Liu, F., Iqbal, K., Grundke-Iqbal, I., Rossie, S., Gong, C.X., 2005, Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease, *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 1790–1796.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.S., 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Lööke, M., Kristjuhan, K., Kristjuhan, A., 2011, Extraction of genomic dna from yeasts for PCR-based applications, *Biotechniques*, 50(5), 325–328.

- Luo, W., Dou, F., Rodina, A., Chip, S., Kim, J., Zhao, Q.,..., Chiosis, G., 2007, Roles of heat-shock protein 90 in maintaining and facilitating the neurodegenerative phenotype in tauopathies, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 9511–9516.
- Madrid, M., Soto, T., Franco, A., Paredes, V., Vicente, J., Hidalgo, E.,..., Cansado, J., 2004, A cooperative role for Atf1 and Pap1 in the detoxification of the oxidative stress induced by glucose deprivation in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41594-41602.
- Mager, W.H., Winderickx, J., 2005, Yeast as a model for medical and medicinal research, *Trends in pharmacological sciences*, 26, 265-273.
- Maina, M.B., Al-Hilaly, Y.K., Serpell, L.C., 2016, Nuclear tau and its potential role in Alzheimer's Disease, *Biomolecules*, 6, 9.
- Mandelkow, E.M., Biernat, J., Drewes, G., Gustke, N., Trinczek, B., Mandelkow, E., 1995, Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules, *Neurobiology of aging*, 16(3), 355–363.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., 2012, Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration, *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006247.
- Martin, L., Latypova, X., Terro, F., 2011, Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease, *Neurochemistry international*, 58, 458–471.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M.,..., Terro, F., 2013a, Tau protein phosphatases in Alzheimer's disease: The leading role of PP2A, *Ageing research reviews*, 12, 39– 49.
- Martin, L., Latypova, X., Wilson, C.M.,..., Terr, F., 2013b, Tau protein kinases: Involvement in Alzheimer's disease, *Ageing research reviews*, 12, 289– 309.
- Mason, R.P., Giorgini, F., 2011, Modeling Huntington disease in yeast: perspectives and future directions, *Prion*, 5, 269–276.

- Matrone, M.A., Whipple, R.A., Thompson, K., Cho, E.H., Vitolo, M.I., Balzer, E.M.,..., Martin, S.S., 2010, Metastatic breast tumors express increased tau, which promotes microtentacle formation and the reattachment of detached breast tumor cells, *Oncogene*, 29, 3217–327.
- Maundrell, K., 1993, Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast, *Gene*, 123(1), 127-130.
- Maurage, C.A., Bussiere, T., Sergeant, N., Ghesteem, A., Figarella-Branger, D., Ruchoux, M.M.,..., Ruchoux, M.M., 2004, Tau aggregates are abnormally phosphorylated in inclusion body myositis and have an immunoelectrophoretic profile distinct from other tauopathies, *Neuropathology and applied neurobiology*, 30, 624–34.
- Metcalf, D.J., García-Arencibia, M., Hochfeld, W.E., Rubinsztein, D.C., 2012, Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration, *Experimental neurology*, 238(1), 22-28.
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, R.J., 2014, Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum, *Autophagy*, 7, 673–682.
- Miller-Fleming, L.,Giorgini, F., Outeiro, T.F., 2008, Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders, *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 3, 325–338.
- Mizushima, N., Komatsu, M., 2011, Autophagy: renovation of cells and tissues, *Cell*, 147, 728–741.
- Mizushima, N., 2012, Autophagy in protein and organelle turnover, *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 76, 397–402.
- Mutoh, N., Nakagawa, C.W., Yamada, K., 2002, Characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase-deficient mutant of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Current genetics*, 41(2), 82-88.
- Nakaseko, Y., Goshima, G., Morishita, J., Yanagida, M., 2001, M phase–specific kinetochore proteins in fission yeast: Microtubule-associating Dis1 and Mtc1 display rapid separation and segregation during anaphase, *Current Biology*, 11(8), 537-549.

- Nakaseko, Y., Nabeshima, K., Kinoshita, K., Yanagida, M., 1996, Dissection of fission yeast microtubule associating protein p93Dis1: regions implicated in regulated localization and microtubule interaction, *Genes to Cells*, 1(7), 633-644.
- Nazarko, T.Y., Ozeki, K., Till, A.,..., Subramani, S., 2014, Peroxisomal Atg37 binds Atg30 or palmitoyl-CoA to regulate phagophore formation during pexophagy, *Journal of Cell Biology*, 204, 541–557.
- Neve, R.L., Harris, P., Kosik, K.S., Kurnit, D.M., Donlon, T.A., 1986, Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2, *Molecular Brain Research*, 1(3), 271-280.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J.P., Cribbs, D.H., La Ferla, F.M., 2004, A β immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome, *Neuron*, 43, 321-332.
- Outeiro, T.F. and Lindquist, S., 2003, Yeast cells provide insight into alpha-synuclein biology and pathobiology, *Science*, 302(5651), 1772–1775.
- Özarabacı, I., 2019, *Schizosaccharomyces pombe*’de endoplazmik retikulum stresi ile apoptoz arasındaki ilişki, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kına, Ü.Y., 2016, *Schizosaccharomyces pombe*’de heksoz taşıyıcılarının anlatım düzeylerinin araştırılması, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Palabiyik, B., Kig, C., Pekmez, M., Dalyan, L., Arda, N., Temizkan, G., 2012, Investigation of the relationship between oxidative stress and glucose signaling in *Schizosaccharomyces pombe*, *Biochemical genetics*, 50(5-6), 336-349.
- Pereira, G., Schiebel, E., 1997, Centrosome-microtubule nucleation, *Journal of cell science*, 110(3), 295-300.
- Pereira, C., Bessa, C., Soares, J., Leao, M., Saraiva, L., 2012, Contribution of Yeast Models to Neurodegeneration Research, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, doi:10.1155/2012/941232.

- Pereira, M.D., Herdeiro, R.S., Fernandes, P.N., Eleutherio, E.C.A., Panek, A.D., 2003, Targets of oxidative stress in yeast sod mutants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1620, 245-251.
- Petrucelli, L., Dickson, D., Kehoe, K., Taylor, J., Snyder, H., Grover, A.,..., Hutton, M., 2004, CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation, *Human molecular genetics*, 13, 703–714.
- Pfaffl, M.W., 2001, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Plyte, S.E., Feoktistova, A., Burke, J.D., Woodgett, J.R., Gould, K.L., 1996, *Schizosaccharomyces pombe* *skp1*⁺ encodes a protein kinase related to mammalian glycogen synthase kinase 3 and complements a *cdc14*cytokinesis mutant, *Molecular and cellular biology*, 16(1), 179-191.
- Pombase, 2019 <http://www.pombase.org/status/statistics> [Ziyaret tarihi: 28.12.2019].
- Poppek, D., Keck, S., Ermak, G., Jung, T., Stolzing, A., Ullrich, O.,..., Grune, T., 2006, Phosphorylation inhibits turnover of the tau protein by the proteasome: Influence of RCAN1 and oxidative stress, *Biochemical Journal*, 400, 511-520.
- Porzoor, A., Macreadie, I.G., 2013, Application of yeast to study the tau and amyloid β abnormalities of Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, 35, 217–225.
- Pradeepkiran, J.A., Reddy, A.P., Reddy, P.H., 2019, Pharmacophore-based models for therapeutic drugs against phosphorylated tau in Alzheimer's disease, *Drug discovery today*, 24(2), 616-623.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., Ferri, C.P., 2013, The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis, *Alzheimer's & dementia*, 9, 63–75.
- Pugazhenth, S., Qin, L., Reddy, P.H., 2017, Common neurodegenerative pathways in obesity, diabetes, and Alzheimer's disease, *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular basis of disease*, 1863(5), 1037-1045.

- Pusztai, L., Jeong, J.H., Gong, Y., Ross, J.S., Kim, C., Paik, S.,..., Symmans, W.F., 2009, Evaluation of microtubule-associated protein-Tau expression as a prognostic and predictive marker in the NSABP-B 28 randomized clinical trial, *Journal of clinical oncology*, 27, 4287–4292.
- Qingyun, Y., Kato, T., Furuyashiki T., 2016, Genetic interactions among AMPK catalytic subunit Ssp2 and glycogen synthase kinases Gsk3 and Gsk31 in *Schizosaccharomyces pombe*, *The Kobe journal of medical sciences*, 62(3), 70-78.
- Querfurth, H.W., LaFerla, F.M., 2010, Mechanisms of disease, *New England Journal of Medicine*, 362(4), 329-344.
- Rallis, C., Townsend, S., Bähler, J., 2017, Genetic interactions and functional analyses of the fission yeast gsk3 and amk2 single and double mutants defective in TORC1-dependent processes, *Scientific reports*, 7, 44257.
- Reinheckel, T., Grune, T., Davies, K.J., 2000, Stress response: methods and protocols. Ch 5 in: methods in molecular biology: the measurement of protein degradation in response to oxidative stress, Humana Press, Totowa, NJ.
- Rossi, G., Dalpra, L., Crosti, F., Lissoni, S., Sciacca, F.L., Catania, M.,..., Tagliavini, F., 2008, A new function of microtubule-associated protein tau: Involvement in chromosome stability, *Cell Cycle*, 7, 1788–1794.
- Ruotolo, R., Giorgio, G.D., Minato, I., Bianchi, M.G., Bussolati, O.,..., Marmiroli, N., 2020, Cerium Oxide Nanoparticles Rescue α -Synuclein-Induced Toxicity in a Yeast Model of Parkinson's Disease, *Nanomaterials*, 10(2), 235.
- Saitoh, S., Mori, A., Uehara, L., Masuda, F., Soejima, S., Yanagida, M., 2014, Mechanisms of expression and translocation of major fission yeast glucose transporters regulated by CaMKK/phosphatases, nuclear shuttling, and TOR, *Molecular biology of the cell*, 26(2), 373–386.
- Schaffert, L.N., Carter, W.G., 2020, Do Post-Translational Modifications Influence Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review, *Brain sciences*, 10(4), 232.

- Scholz, T., Mandelkow, E., 2014, Transport and diffusion of Tau protein in neurons, *Cellular and molecular life sciences*, 71, 3139–3150.
- Sengupta, A., Kabat, J., Novak, M., Wu, Q., Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., 1998, Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules, *Archives of biochemistry and biophysics*, 357, 299–309.
- Sergeant, N., David, J.P., Lefranc, D., Vermersch, P., Wattez, A., Delacourte, A., 1997, Different distribution of phosphorylated tau protein isoforms in Alzheimer's and Pick's diseases, *FEBS letters*, 412(3), 578-582.
- Sergeant, N., Delacourte, A., Buee, L., 2005, Tau protein as a differential biomarker of tauopathies, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1739(2), 179–197.
- Seynnaeve, D., Vecchio, M.D., Fruhmman, G., Verelst, J., Cools, M., Beckers, J.,..., Franssens, V., 2018, Recent insights on Alzheimer's disease originating from yeast models, *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1947.
- Sherrington, R., Rogaev, E.I., Liang, Y.,..., George-Hyslop, P.H., 1995, Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease, *Nature*, 375, 754–760.
- Shieh, J.C.C., Huang, P.T., Lin, Y.F., 2020, Alzheimer's Disease and Diabetes: Insulin Signaling as the Bridge Linking Two Pathologies, *Molecular neurobiology*, 1-12.
- Sin, O., Nollen, E.A.A., 2015, Regulation of protein homeostasis in neurodegenerative diseases: the role of coding and non-coding genes, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72, 4027–4047.
- Smoter, M., Bodnar, L., Grala, B., Stec, R., Zieniuk, K., Kozłowski, W.,..., Szczylik, C., 2013, Tau protein as a potential predictive marker in epithelial ovarian cancer patients treated with paclitaxel/platinum first-line chemotherapy, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 32, 25.

- Song, J.J., Rhee, J.G., Suntharalingam, M., Walsh, S.A., Spitz, D.R., Lee, Y.J., 2002, Role of glutaredoxin in metabolic oxidative stress. Glutaredoxin as a sensor of oxidative stress mediated by H₂O₂, *Journal of Biological Chemistry*, 277, 46566-75.
- Soto, C., 2003, Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases, *Nature Reviews Neuroscience*, 4, 49–60.
- Souter, S., Lee, G., 2009, Microtubule-associated protein tau in human prostate cancer cells: isoforms, phosphorylation, and interactions, *Journal of cellular biochemistry*, 108, 555–564.
- Spitz, D.R., Sim, J.E., Ridnour, L.A., Galoforo, S.S., Lee, Y.J., 2000, Glucose deprivation induced oxidative stress in human tumor cells. A fundamental defect in metabolism?, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 349-62.
- Spillantini, M.G., Goedert, M., 2013, Tau pathology and neurodegeneration, *The Lancet Neurology*, 12(6), 609-622.
- Suraweera, A., Munch, C., Hanssum, A., Bertolotti, A., 2012, Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition, *Molecular cell*, 48, 242–253.
- Sydow, A., Van der Jeugd, A., Zheng, F.,..., Mandelkow, E.M., 2011, Tau-induced defects in synaptic plasticity, learning, and memory are reversible in transgenic mice after switching off the toxic Tau mutant, *Journal of Neuroscience*, 31, 2511–2525.
- Syrovatkina, V., Fu, C., Tran, P.T., 2013, Antagonistic spindle motors and MAPs regulate metaphase spindle length and chromosome segregation, *Current Biology*, 23(23), 2423-2429.
- Šimic, G., Gnjdjic, M., Kostovic, I., 1998, Cytoskeletal changes as an alternative view on pathogenesis of Alzheimer's disease, *Periodicum biologorum*, 100, 165–173.
- Šimic, G., Leko, M.B., Wray, S.,..., Hof, P.R., 2016, Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's Disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies, *Biomolecules*, 6, 6.

- Tepper, K., Biernat, J., Kumar, S.,..., Mandelkow, E., 2014, Oligomer formation of tau protein hyperphosphorylated in cells, *Journal of Biological Chemistry*, 289(49), 34389–34407.
- Toone, W.M., Kuge, S., Samuels, M., Morgan, B.A., Toda, T., Jones, N., 1998, Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1, *Genes & development*, 12(10), 1453-1463.
- Xie, Z., Klionsky, D.J., 2007, Autophagosome formation: core machinery and adaptations, *Nature cell biology*, 9, 1102–1109.
- Vandebroek, T., Terwel, D., Van Helmont, T., Winderickx, J., Van Leuven, F., 2005, Phosphorylation and aggregation of protein tau in humanized yeast cells and in transgenic mouse brain, *New Trends in Alzheimer and Parkinson Related Disorders*, 256, 15–19.
- Vega, I.E., Traverso, E.E., Ferrer-Acosta, Y., Matos, E., Colon, M., Gonzalez, J.,..., Yen, S.H., 2008, A novel calcium-binding protein is associated with tau proteins in tauopathy, *Journal of neurochemistry*, 106, 96-106.
- Vembar, S.S., Brodsky, J.L., 2008, One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation, *Nature reviews Molecular cell biology*, 9, 944–957.
- Vivancos, A.P., Jara, M., Zuin, A., Sansó, M., Hidalgo, E., 2006, Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways, *Molecular Genetics and Genomics*, 276(6), 495-502.
- Walker, G., 1998, *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons, UK.
- Walker, L.C., Diamond, M.I., Duff, K.E., Hyman, B.T., 2013, Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases, *JAMA neurology*, 70(3), 304-310.
- Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Kruger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.M.,..., Mandelkow, E., 2009, Tau fragmentation, aggregation and clearance: The dual role of lysosomal processing, *Human molecular genetics*, 18, 4153–4170.
- Wang, Y., Mandelkow, E., 2016, Tau in physiology and pathology, *Nature reviews neuroscience*, 17(1), 22.

- Wangler, M.F., Yamamoto, S., Chao, H.T., Posey, J.E., Westerfield M.,..., Bellen, H.J., 2017, Model organisms facilitate rare disease diagnosis and therapeutic research, *Genetics*, 207, 9–27.
- Webers, A., Heneka, M.T., Gleeson, P.A., 2020, The role of innate immune responses and neuroinflammation in amyloid accumulation and progression of Alzheimer's disease, *Immunology and cell biology*, 98(1), 28-41.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., Kirschner, M.W., 1975, A protein factor essential for microtubule assembly, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 1858–1862.
- Winderickx, J., Delay, C., DeVos, A., Klinger, H., Pellens, K., Vanhelmont, T.,..., Zabrocki, P., 2008, Protein folding diseases and neurodegeneration: lessons learned from yeast, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1783, 1381–1395.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream M.A., Lyne, M., Lyne, R.,..., Nurse, P., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415, 871–880.
- Wood, V., 2006, How to get the most from fission yeast genome data: a report from the 2006 European Fission Yeast Meeting computing workshop, *Yeast*, 23, 905–912.
- World Health Organisation News Release: Dementia cases set to triple by 2050 but still largely ignored, 2012, WHO, Geneva.
- Wosnitzer, M.S., Domingo-Domenech, J., Castillo-Martin, M., Ritch, C., Mansukhani, M., Petrylack, D.P.,..., Cordon-Cardo, C., 2011, Predictive value of microtubule associated proteins tau and stathmin in patients with nonmuscle invasive bladder cancer receiving adjuvant intravesical taxane therapy, *The Journal of urology*, 186, 2094–2100.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2009, An overview of the molecular mechanism of autophagy, *Autophagy in infection and immunity*, 1–32.
- Yang, Z., Klionsky, D.J., 2010, Eaten alive: a history of macroautophagy, *Nature cell biology*, 12, 814–822.

- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., Eskelinen, E.L., 2014, 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum, *Autophagy*, 5, 1180–1185.
- Zabrocki, P., Pellens, K., Vanhelmont, T., Vandebroek, T., Griffioen, G., Wera, S.,..., Winderickx, J., 2005, Characterization of α -synuclein aggregation and synergistic toxicity with protein tau in yeast, *FEBS journal*, 272, 1386-1400.
- Zhang, W.L., Tsuneishi, S., Nakamura, H., 2001, Induction of heat shock proteins and its effects on glial differentiation in rat C6 glioblastoma cells, *Kobe Journal of Medical Sciences*, 47, 77-95.
- Zhang, J.Y., Liu, S.J., Li, H.L. Wang, J.Z., 2005, Microtubule associated protein tau is a substrate of ATP/Mg²⁺-dependent proteasome protease system, *Journal of neural transmission*, 112, 547–555.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve Yilmazer
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	.
Uyruğu	☐ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	
Web Adresi	-

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji /Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü (Çift Anadal)
Mezuniyet Yılı	Haziran 2011/Haziran 2012

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

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

Makale ve Bildiriler	
Yilmazer, M., Uzuner, S.K., 2020, Heterologous expression of tau protein in fission yeast as a disease model, <i>Fresenius Environmental Bulletin</i> , 29(10), 9218-9225.	
Bayrak, B., Yilmazer, M., Palabiyik, B., 2020, Artificial food sweetener aspartame induces stress response in model organism <i>Schizosaccharomyces pombe</i> , <i>International Food Research Journal</i> , 27(2).	
Yilmazer, M., Kartal, B., Tarhan, Ç., Özarabacı, İ., Akcaalan, S., Özkan, E.,..., Palabiyik, B., 2019, A Genome-Wide Screen for Wortmannin-Resistant Mutants in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : The Phosphorylation-Impaired Mutants Are Resistant to Signaling Defect, <i>DNA and Cell Biology</i> , 38(12), 1427-1436.	

- Özkan, E., Kartal, B., Yilmazer, M., Palabiyik, B., 2019, Iron regulates hexose transporters in *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Basic Microbiology*, 59, 458-464.
- Yılmaz, D., Yilmazer, M., Tümkaya, T., Karaer Uzuner, S., 2018, Chemically induced oxidative stress decreases homologous recombination rate and Rec12 gene expression in fission yeast, *Fresenius Environmental Bulletin*, 27, 4995-5000.
- Ekimler, S.S., Yilmazer, M., Arican, E., 2017, The Silencing of Septin 1 via Synthetic siRNAs in *Schizosaccharomyces pombe*, *Online Journal of Biological Science*, 17, 18-25.
- Yilmazer, M., Palabiyik, B., Topal Sarıkaya, A., Karaer Uzuner, S., 2017, Generation of *gua1* deletion using polymerase chain reaction (PCR)-mediated gene disruption method in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*, *African Journal of Biotechnology*, 27, 1501-1506.
- Yilmazer, M., Kartal, B., Tarhan, C., Ozarabaci, I., Palabiyik, B., A genome-wide screen for wortmannin and hydrogen peroxide resistant mutants in *Schizosaccharomyces pombe*, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Eylül 2019, 43(5), 163.
- Kartal, B., Yilmazer, M., Palabiyik, B., A genome-wide screening of fluconazole resistant mutants in *Schizosaccharomyces pombe*, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Eylül 2019, 43(5), 87.
- Bayrak, B., Yilmazer, M., Palabiyik, B., Investigation of the relationship between aspartame and *Swi6* in *Schizosaccharomyces pombe*, 7th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey, İSTANBUL, TÜRKİYE, 27-29 Eylül 2019, 43(5), 30.
- Yilmazer, M., Palabiyik, B., Identification of *Schizosaccharomyces pombe ird* mutants resistant to glucose suppression and oxidative stress, 6th International Congress on Molecular Biology and Biotechnology, AFYON, TÜRKİYE, 22-23 Aralık 2017, 25.
- Yilmazer, M., Karaer Uzuner, S., Palabiyik, B., Topal Sarıkaya, A., *Schizosaccharomyces pombe*'de *Gua1* Geninin Knock-Out Tekniği ile Delesyona Uğratılması, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, KONYA, TÜRKİYE, 18-19 Aralık 2015, 258.
- Arda, E.Ş.N., Karaer Uzuner, S., Topal Sarıkaya, A., Yilmazer, M., Kiraz, Y., Böke Sarıkahya, N., Kırmızıgül, S., Inhibitory Effect Of Scoposide C, A Triterpene Glycoside On Impdh Activity In *Schizosaccharomyces pombe*, EMBO Conference Pombe 2013 7th International Fission Yeast Meeting, INGiltere, 24-29 Haziran 2013, 118.
- Tarhan, Ç., Şatir, T.M., Yilmazer, M., Karaer Uzuner, S., Hydrocortisone effect on *Schizosaccharomyces pombe*'s *rad17+* gene expression, EMBO Conference Pombe 2013 7th International Fission Yeast Meeting, Londra, INGiltere, 24-29 Haziran 2013, 185, 323.