



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**WORTMANNİN'E DİRENÇLİ *Schizosaccharomyces pombe*
MUTANTLARINA TUNİKAMİSİN'İN ETKİSİ**

Merve YEMENİCİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

Haziran, 2020

İSTANBUL

Bu alışma, 26.06.2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

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

Doç. Dr. Bedia PALABIYIK
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Fen-Edebiyat 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 33470 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Tezden Üretilmiş Yayınların Künye Bilgileri

--

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER'e çok teşekkür ederim. Çalışmalarım boyunca desteğini asla esirgemeyen Bedia PALABIYIK'a ve İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'deki tüm öğretim üyelerine içtenlikle teşekkür ederim.

Tüm deneylerim süresince yanımda olan ve tecrübeleriyle yol gösteren Araştırma Görevlisi Merve YILMAZER'e, araştırma bulgularının istatistiksel değerlendirmelerinde katkıda bulunan ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Araştırma Görevlisi Burcu KARTAL ve çalışmanın gerçekleşmesinde maddi destek sağlayan İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve ekibine çok teşekkür ederim.

Çalışmamda kullandığım floresans mikroskop görüntülerinin elde edilmesinde katkısı olan Dr. Öğr. Üyesi Hızlan Hıncal AĞUŞ ve öğrencisi sevgili Ahsen ÇETİN'e çok teşekkür ederim. Ayrıca tez yazma sürecim boyunca tecrübeleriyle yardımlarını esirgemeyen iş arkadaşım Uzman Nazlı ERTÜRK'e de çok teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca ve eğitimim süresince benden desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme ve bu süreçte en büyük destekçim olan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2020

Merve YEMENİCİ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	x
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ	4
2.2. WORTMANNİN.....	7
2.3. TUNİKAMİSİN	7
2.4. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	10
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	13
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN <i>Schizosaccharomyces pombe</i> IRKLARI	13
3.2. BESİ ORTAMLARI	14
3.3. <i>S. pombe</i> MUTANT IRKLARININ ÜRETİMİ VE SAKLANMASI	15
3.4. WORTMANNİN'E DİRENÇLİ MUTANT IRKLARATUNİKAMİSİN ETKİSİ	16
3.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ	16
3.6. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN SPOT EKİM YÖNTEMİYLE TAKİP EDİLMESİ	17
3.7. HÜCRELERDE PROTEOZOMAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ	17
3.8. HÜCRELERDE CANLILIK VE APOPTOZ MİKTARININ BELİRLENMESİ	19
3.9. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ	20
3.10. BİYOİSTATİSTİKSEL ANALİZLER	21
4. BULGULAR.....	22
4.1. TUNİKAMİSİNİN WORTMANNİN DİRENÇLİ <i>S. pombe</i> MUTANT IRKLARININ CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ.....	22
4.2. TUNİKAMİSİNİNİN HÜCRE CANLIĞI ÜZERİNE ETKİSİ	28
4.3. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE İÇİ OKSİDASYONA ETKİSİ	30

4.4. TUNİKAMİSİNİN HÜCRELERDEKİ PROTEOZOMAL AKTİVİTEYE ETKİLERİ	32
4.5. TUNİKAMİSİNİN APOPTOZA ETKİSİ	34
4.6. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİ	44
4.7. TUNİKAMİSİNE YÜKSEK DİRENÇLİLİK SAĞLAYAN GENLERİN BİYOLOJİK SÜREÇLERDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	72



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Tunikamisinin GPT enzimini inhibe etmesi	3
Şekil 2.1: Endoplazmik retikulumun yapısı (micro.magnet.fsu.edu).....	4
Şekil 2.2: Tunikamisinin yapısı (Varki ve diğ., 1999).....	8
Şekil 2.3: Tunikamisinin ER’de GPT’yi inhibe etme mekanizması (biochem4.okstate.edu).....	9
Şekil 2.4: Bölünme için nukleusunu iki katına çıkarmış olan <i>S. pombe</i> görüntüleri	11
Şekil 2.5: <i>S.pombe</i> ’nin Yaşam Döngüsü (tr.redsearch.org)	12
Şekil 4.1: Parental hücreye ait spot ekim görüntüleri	28
Şekil 4.2: Tunikamisine yüksek dirençli hücrelere ait spot ekim görüntüleri.....	29
Şekil 4.3: Tunikamisine orta ve düşük dirençli hücrelere ait spot ekim görüntüleri.	30
Şekil 4.4: TM içeren besi ortamında üretilen parental ırk ve tunikamisine yüksek dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak hücre içi oksidasyon düzeyleri (TM: Tunikamisin).	31
Şekil 4.5: TM içeren besi ortamında üretilen tunikamisine orta ve düşük düzeyde dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak hücre içi oksidasyon düzeyleri (TM: Tunikamisin).	32
Şekil 4.6: Tunikamisine yüksek dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak proteozomal aktivite yüzdeleri (TM:Tunikamisin).	33
Şekil 4.7: Tunikamisine orta ve düşük seviyede dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak proteozomal aktivite yüzdeleri (TM:Tunikamisin).	34
Şekil 4.8: Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri.(TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 µm’dir.).....	41
Şekil 4.9: Tunikamisine yüksek dirençli olan mutant ırklara ait kontrol ve deney gruplarındaki apoptoz oranları (%).	43
Şekil 4.10: Tunikamisine orta ve düşük dirençli mutant ırklara ait kontrol ve deney gruplarındaki apoptoz oranları (%).	44
Şekil 4.11: Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nukleus görüntüleri. (TM: Tunikamisin, Her bir fotoğrafın boyutu 20 µm’dir.).	48

Şekil 4.12: Tunikamisine orta ve düşük direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nukleus görüntüleri. (TM: Tunikamisin, Her bir fotoğrafın boyutu 20 µm'dir.).53

Şekil 4.13 : Tunikamisine yüksek direnç gösteren 10 ayrı ırk arasındaki ilişki.....58



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1 : Wortmannin'e direnç gösteren <i>S. pombe</i> tek gen delesyonlu mutant ırklar.....	15
Tablo 3.2 : Yeast Extract Liquid (YEL) besi ortamı içeriği.....	16
Tablo 3.3 : Yeast Extact with Supplements” (YES) zenginleştirilmiş sıvı besi ortamı.....	17
Tablo 3.4 : Hücre parçalama tamponu.....	20
Tablo 3.5 : Lowry çözeltileri (Çözelti A:B:C =100:1:1).....	21
Tablo 3.6 : Proteozomal aktivite deney tamponu.....	22
Tablo 3.7 : Mounting solüsyonunun içeriği.....	23
Tablo 4.1 : Wortmannin'e direnç gösteren <i>S. pombe</i> tek gen delesyonlu mutant ırkların tunikamisinli besi ortamında 24. saatteki üreme miktarları.....	25
Tablo 4.2: Tunikamisine dirençli olduğu belirlenen <i>S. pombe</i> mutant ırkları.....	27
Tablo 4.3 : Tunikamisine yüksek dirençli <i>S. pombe</i> mutant ırkları.....	28
Tablo 4.4 : Tunikamisine orta seviyede dirençli <i>S. pombe</i> mutant ırkları.....	29
Tablo 4.5 : Tunikamisine düşük seviyede dirençli <i>S. pombe</i> mutant ırkları.....	30
Tablo 4.6: Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası hücrel farklılıkları.....	51
Tablo 4.7: Tunikamisine düşük direnç gösteren ırkların DAPI boyaması sonrası hücrel farklılıkları.....	56

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler

Açıklama

°C	: Santigrad
Ca ⁺²	: Kalsiyum
KCl	: Potasyum klorür
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
CuSO ₄ .5H ₂ O	: Bakır sülfat pentahidrat
Mg ⁺²	: Magnezyum
MgOAc	: Magnezyum asetat
NaCl	: Sodyum klorür
μ	: Mikro

Kısaltmalar

Açıklama

AO	: Akridin orange
ALS	: Amiyotrofik lateral skleroz
DCFH	: Diklorofluoresein
DCFH-DA	: Diklorofluoresein diasetat
DTT	: Ditiotreitol
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ER	: Endoplazmik retikulum
ERAD	: ER aracılı degradasyon
ERSE	: ER stres yanıt elementi
EtBr	: Etidyum bromür
G	: Gram
GlcNAc	: N-Asetilglukozamin
L	: Litre
Mb	: Megabaz
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
Mm	: Milimolar
mm ²	: Milimetrekare
mRNA	: Mesajcı RNA
Na-K tartarat	: Sodyum potasyum tartarat
nm	: Nanometre
PBS	: Fosfat tampon tuz çözeltisi
PI3K	: Fosfaditil inositol-4, 5-bifosfat 3-kinaz
ROT	: Hücre içi oksidasyon (reaktive oxygen species)
Suc-LLVY-AMC	: Süksinoil-Leu-Leu-Val-Tyr-amino-4-metilkumarin
SD	: Standart sapma (Standard deviation)

SMA	: Spinal Musküler Atrofi
TM	: Tunikamisin
UPR	: Katlanmamış protein yanıtı
UV	: Ultraviyole
YEL	: Maya özütü sıvı besi ortamı
YES	: Zenginleştirilmiş maya özütü sıvı besi ortamı



ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

WORTMANNİN'E DİRENÇLİ *Schizosaccharomyces pombe* MUTANTLARINA TUNİKAMİSİN'İN ETKİSİ

Merve YEMENİCİ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Semian KARAER UZUNER

Tunikamisin, proteinlerdeki asparagin gruplarının N-glukozilasyonunu inhibe etmesi sonucunda yanlış katlanmış proteinlerin birikimine neden olmaktadır ve endoplazmik retikulum (ER) stresini artırması nedeniyle hücre biyolojisi çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. Tunikamisin, fosforile edilmiş dolikola N-asetilglukozaminil-1-fosfat transfer eden N-asetilglukozaminfosfotransferazın inhibe edilmesi yoluyla N-glukozilasyonu engelleyerek ER stresine yol açmaktadır. Bu çalışmada, Wortmannin'e dirençli olduğu bilinen koleksiyona yine ER stresine neden olduğu bilinen tunikamisin uygulanıp tek gen bakımındandeleasyonlu ilgili genlerin sinyal yolları, etki mekanizması ve fonksiyonları analiz edildi.

Önceki çalışmalarda Wortmannin'e dirençli olduğu tespit edilen her biri tek bir gen bakımından delesyonlu olan 111 ayrı mutant *Schizosaccharomyces pombe* ırklarına, yarı öldürücü dozu 0,5 µg/mL olarak belirlenmiş olan tunikamisin uygulandı. Tunikamisine dirençli ve dirençsiz olan 20 mutan ırk belirlendi. Tunikamisin ile muamele edilmiş olan hücrelerle kontrol gruplarının hücre içi oksidasyon (ROT seviyeleri, reaktif oksijen türleri) farklılıkları, DAPI boyama yöntemiyle nükleuslarındaki değişiklikler, akridin orange/etidyum bromür (AO/EtBr) boyama tekniği ile hücrelerdeki canlılık ve apoptoz seviyeleri ölçüldü. Ayrıca spot ekim yöntemi ile hücrelerin canlılık seviyeleri ve dirençlilik oranları ve 20S

proteozom aktivite ölçümü ile proteozomal aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler, hem kendi kontrol gruplarıyla hem de parental ırk ile karşılaştırmalı olarak gösterildi. Kontrol ve tunikamisinli besi ortamında üreyen gruplar kıyaslandığında, tunikamisin eklenen besi ortamında daha az sayıda ürediği, morfolojik olarak daha büyük oldukları, nukleus yapılarının belirgin ölçüde değiştiği, hücre içi oksidasyon seviyelerinin arttığı, proteozomal aktivitelerinde ciddi miktarlarda değişimlerin olduğu ve hücrelerin apoptoza yöneldiği görüldü.

Elde edilen sonuçlar bazı insan hastalıklarının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasına yardımcı olacaktır.

Haziran 2020, 87 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Schizosaccharomyces pombe*, tunikamisin, Wortmannin, ER stresi.



SUMMARY

M.Sc. THESIS

THE EFFECT OF TUNICAMYCIN ON WORTMANNIN RESISTANT *Schizosaccharomyces pombe* MUTANTS

Merve YEMENİCİ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor : Assist. Prof. Dr. Semian KARAER UZUNER

Tunicamycin causes accumulation of incorrectly-folded proteins by inhibiting N-glycosylation of asparagine groups, and is an antibiotic used extensively in cell biology studies because it increases endoplasmic reticulum (ER) stress. Tunicamycin causes ER stress by blocking N-glycosylation vice inhibiting of N-acetylglucosaminphosphotransferase, the enzyme that transfers N-acetylglucosamin-1-phosphate to phosphorylated dolichol. In this study, tunicamycin, known to cause ER stress, was applied to the collection known to be resistant to Wortmannin and signaling pathway, mechanism of action and functions of related genes with single gene deletions were investigated.

111 haploid strains with different mutations in each, which were found Wortmannin-resistant in our previous study, were treated by a semi-lethal dose of tunicamycin (0.5 µg/mL). Twenty mutant strains were identified as tunicamycin-resistant or sensitive. The differences in intracellular oxidation (ROT levels, reactive oxygen species) of the control groups and tunicamycin-treated cells, the changes in nucleus with DAPI method, the viability and apoptosis levels in the cells with acridine orange/ethidium bromide (AO/EtBr) technique were measured. In addition, the viability and resistance levels of strains with the spot assay method

and the changes occurring in proteosomal activities with 20S proteasome activity measurement were shown in comparison with both their control groups and parental strain. When comparing the groups grown in the media with or without tunicamycin, it was observed that the cells grow fewer in tunicamycin-containing media and were morphologically larger size, nucleus structures changed significantly, intracellular oxidation levels increased, proteosomal activities changed significantly and the cells were directed to apoptosis.

The results will help to clarify the molecular mechanism of some human diseases.

June 2020, 87 pages.

Keywords: *Schizosaccharomyces pombe*, Tunicamycin, Wortmannin, ER stress.



1. GİRİŞ

Ökaryotik hücrelerde bulunan endoplazmik retikulum (ER), nukleus ile bitişik membran vesiküllerinden oluşan bir ağ olarak tanımlanmıştır (Palade, 1956). Tüp benzeri yapılar ve düzleşmiş keselerden oluşan membranöz ağ yapısı, sitoplazma boyunca yayılır ve hücrenin yaklaşık olarak yarısını kaplamaktadır (Kaufman, 1999).

ER, aynı zamanda hücresel Ca^{+2} homeostazının korunmasını sağlayan büyük bir Ca^{+2} deposudur (Knupp ve diğ., 2019). ER stresi sırasında Ca^{+2} , ER'den serbest bırakılır ve mitokondriye girer. Mitokondriye Ca^{+2} hareketi, oksidatif fosforilasyonu (ROT, Reactive oxygen species) arttırdığı için ER stresine karşı ilk yanıtlardan biri olarak nitelendirilmektedir. Yapılan çalışmalarla ER stresinin hücresel mitokondriyal ROT birikimi ile hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Bravo ve diğ., 2011).

Hücre içerisinde veya dışında ihtiyaç duyulan proteinin üretilmesi için gereken süreçlerde rol alan ER, salgı yolağında yer almaktadır. Nukleus zarından sitoplazmaya ve hücre zarına kadar hücre içerisinde birbiri ile bağlantılı bir kanal sistemi oluşturur. Bu kanal sistemi, hücre bölünmesi esnasında kaybolmaktadır. Yapısına bakıldığında granüllü ve granülsüz olmak üzere iki farklı tipi bulunmaktadır. Granülsüz ER (Smooth ER)'de membran üzerinde ribozom yoktur. Lipid sentezi ve steroid depolama gibi görevleri vardır. Granüllü ER (Rough ER)'nin üzerinde ise ribozom vardır. Proteinlerin translayonel değişikliklere uğradığı ve hedef bölgeye gönderildiği önemli bir organeldir. Proteinler sentezlendikten sonra ER'de çeşitli düzenlenme, katlanma ve olgunlaşma gibi aşamaları gerçekleşir. mRNA, endoplazmik retikuluma bitişik ribozomlara ulaştığında granüllü ER lümeni içerisinde protein translayonu ve bunun sonucunda çeşitli modifikasyonlar (örneğin, N-glukozilasyon, disülfid bağ oluşumu gibi) gerçekleşmektedir. ER, proteinlerin golgiye ulaşmalarında yer alan önemli bir geçiş organelidir (Schwarz ve Blower, 2016).

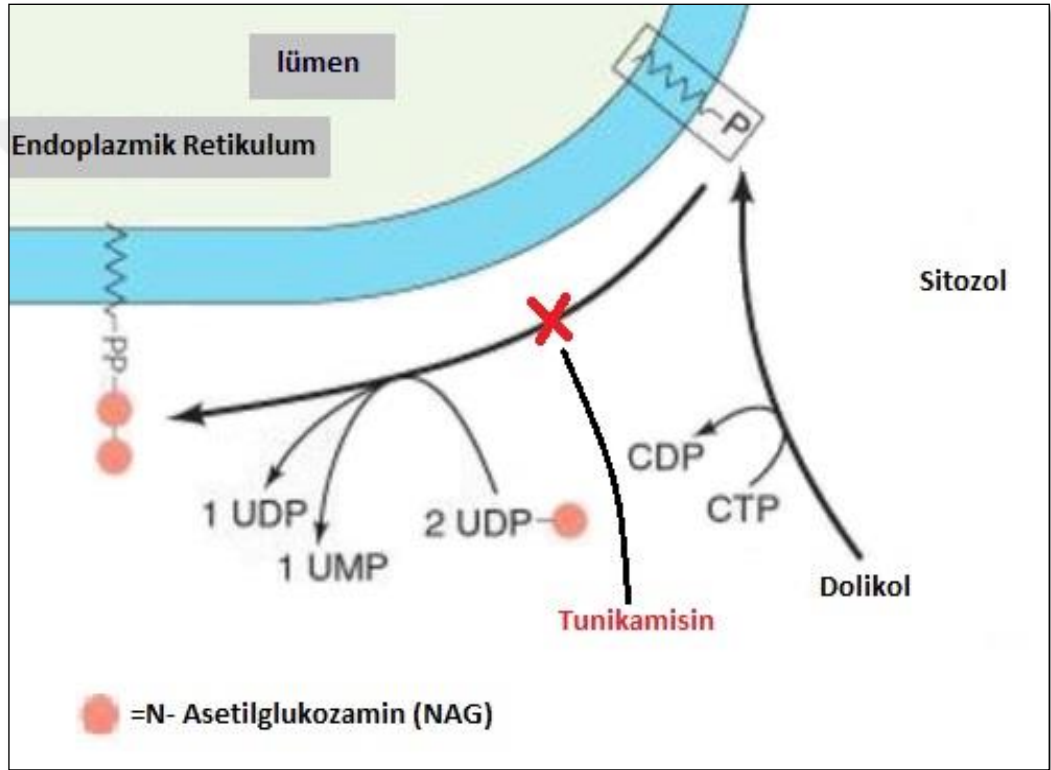
Proteinlerin biyosentezi, katlanması, geliştirilmesi, modifikasyonu, taşınması ve yıkımını içeren protein homeostazı ER tarafından düzenlenir (Kaufman, 1999). Proteinler hedef bölge için ER'den çıkarken ya katlanmış protein şeklinde ya da yanlış katlanmamış proteinler şeklindedir. Proteinin katlanması düzgün bir şekilde devam ettiğinde golgiye giderek fonksiyonel işlevini sürdürmektedir, ancak yanlış katlanmış proteinler ER'de birikir, ER

fonksiyonunu gerçekleştiremeyecek duruma gelir. ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimi sonrasında ER homeostazını sağlamak için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan birkaç hücre içi sinyal iletim yolunun aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu yanıtın gerçekleşmediği durumlarda ise ER stresi nedeniyle proteinler üst üste birikerek hücreye toksik zararlar vermektedir.

Schizosaccharomyces pombe (*S. pombe*), tek hücreli bir fisyon mayasıdır. 3 kromozoma sahiptir ve I. kromozomu 5,7 Mb, II. kromozomu 4,6 Mb ve III. kromozomu ise 3,5 Mb boyutundadır (Hoffman ve diğ., 2016). 5132 adet genden 5118'i protein kodlamaktadır (pombase.org). Genom boyutu 12,57 Mb olan *S. pombe* organizmasında genellikle haploid evre baskındır. *S. pombe* genomu 2002 yılında tamamlanmıştır (Wood ve diğ., 2002) ve genom dizilemesi tamamlanmış olan altıncı model organizmadır (Matsuyama ve diğ., 2006). Hücresel yüzeyde tam ortadan ikiye ayrılma şeklinde bir bölünme göstererek iki eşit yavru hücre meydana getirmektedir (Klar ve Bonaduce, 2013). Kolaylıkla manipüle edilebilen genomları sayesinde hücre bölünmesi, DNA replikasyon, metabolizma, protein katlanması ve hücre içi transport gibi temel hücresel süreçlerin anlaşılmasında tercih edilen bir model organizma olmaktadır (Fields ve Johnston, 2005). Çok yüksek transformasyon kapasitesine sahip olan *S. pombe*, homolog rekombinasyon yolları açısından da zengindir (Sabatinos ve Forsburg, 2010). Hücre bölünmesi insan dahil diğer ökaryotlarda da benzer mekanizmalarla gerçekleştiğinden bu süreçle ilgili *S. pombe*'de yapılan keşifler insana kolaylıkla uygulanabilmekte ve yapılan çalışmalar farmakolojik açıdan önemli katkılar sağlamaktadır. Genomunun kolaylıkla manipüle edilebilmesi sayesinde moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi çalışmalarında sıklıkla kullanılan, oldukça önemli bir ökaryotik model organizmadır. Genom dizilerine bakıldığında *S. pombe*'de bulunan *trm10*, *hxx2*, *gad8*, *gut2*, *pyp2*...vb. gibi genlerin insanlarda diyabete; *cds1*, *ras1*, *git5*, *byr1*, *gad8*...vb. gibi genlerin kanser ve *hnt3*, *smn1*, *tbp1*, *sen54*, *ppk3*...vb. gibi genlerin de nörodejeneratif hastalıklara neden olduğu bilinmektedir.

Talaromyces wortmanni mantarından izole edilen “Wortmannin”, hidrofobik östrojen-yapılı fungal bir metabolittir (Ui ve diğ., 1995). Wortmannin, G-proteinine bağlı reseptörlerin hücresel yanıtlarını durdurması ve kinaza etki etmesi nedeniyle hücre yapısını bozan bir ajan olarak kullanılmaktadır. Proteinlerin hücre içi transportunu inhibe etmektedir.

Tunikamisin, protein glukozilasyonunu inhibe eden bir antibiyotiktir. GlcNAc (N-asetilglukozamin) fosfotransferaz (GPT)'ı inhibe eder ve Şekil 1.1'de gösterildiği üzere glukoprotein sentezinin ilk basamağında N-asetilglukozamin-1-fosfatın UDP-N-asetilglukozaminden dolikol fosfata transferini önler. N bağlı glukozilasyonu inhibe ederek ve N-glukozidik protein-karbonhidrat bağlantılarının oluşumunu bloke ederek hücrel stresin oluşmasına neden olur (Cummings ve diğ., 2015).



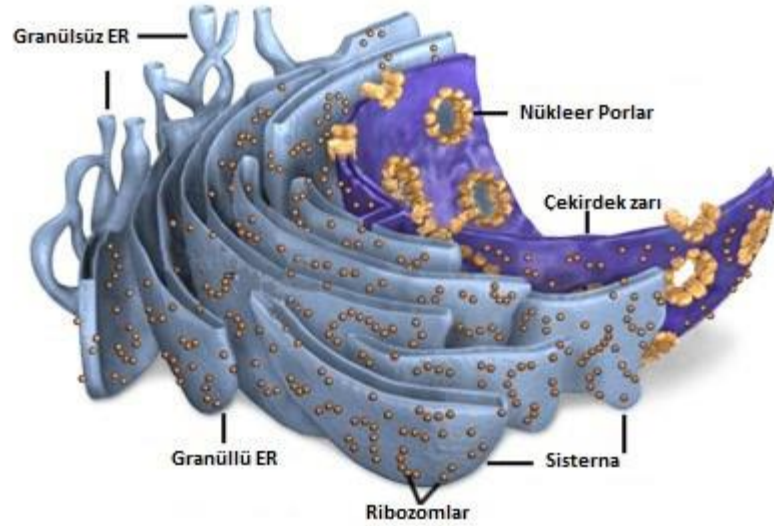
Şekil 1.1: Tunikamisin GPT enzimini inhibe etmesi (CTP: Sitidin trifosfat, CDP: Sitidin difosfat, P: Fosfat, slideplayer.com).

Bu çalışmanın amacı, Wortmannin'e direnç gösteren 111 tane mutant *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) suşundan tunikamisine dirençli ve dirençsiz olanlarının tespit edilmesi ve spot ekim, hücre içi oksidasyon, nükleus boyama, AO/EtBr boyama ve proteozomal aktivite ölçülerine bakılarak hücredeki değişikliklerin gözlenmesidir. Çalışmadan sağlanacak bulgular çeşitli nörodejeneratif hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmanın aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRESİ

Ökaryotlarda salgılayıcı ve transmembran proteinlerin büyük çoğunluğu endoplazmik retikulumda (ER) katlanır. Bu transmembran proteinleri ve salgı proteinleri, salgı yolundaki diğer bölgelere veya plazma zarına verilmeden önce ER içerisinde katlandıktan sonra olgunlaşır. Tüm ER organellerinin içerisinde katlanan proteinlerin katlanma yükü bakımından belli bir homeostazi bulunmaktadır (Guydosh ve diğ., 2017). Sıcaklık, çift katlı lipid katmanı, şaperonlar, tuz konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler proteinlerin katlanmasında önemli rol oynamaktadır. ER’de, protein biyosentezi ve katlanmasının yanı sıra, lipid biyosentezi ve kalsiyum homeostazi gibi çeşitli fonksiyonlar da yer alır. Yalnızca doğru katlanmış bir protein, salgı yolağında yer alan bu organelden kusursuz bir şekilde çıkarak ilerler. Doğru katlanmamış proteinler ise birikerek homeostazi bozar ve ER stresine yol açar (Schwarz ve Blower, 2016).



Şekil 2.1: Endoplazmik retikulumun yapısı (micro.magnet.fsu.edu).

ER içerisinde katlanan proteinlerin çeşitli nedenlerle birikmesi ve ER’nin protein katlama işlevini gerçekleştirmesi için gereken katlanma yükü arasındaki dengenin bozulması

sonucunda ER stresi olarak adlandırılan katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesi söz konusudur. Bu durum, katlanmamış protein yanıtını (UPR, ‘Unfolded protein response’) tetikler (Çetinkaya ve Dursun, 2016). ER stres yanıtı ya da katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak adlandırılan bu hücrel cevap mekanizması ilk olarak maya çalışmaları ile ortaya çıkarılmıştır. UPR, ER içerisinde protein katlama homeostazını korur. ER stresi durumunda proteinlerin sentezinin inhibisyonu, ER’de yanlış katlanmış proteinlerin birikmesini engelleyerek hücrenin sağkalımı için oldukça önemli bir mekanizmadır (Walter ve Ron, 2011).

Hücrede belirli bir süre içinde düzgün bir şekilde katlanamayan proteinler, ER’den sitosole geçerek ‘ER ile ilişkili degradasyon’ (ERAD: Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation) aracılığıyla uzaklaştırılır (Smith ve diğ., 2011). Ancak ER’de katlanan yeni proteinlerin kendi doğal konformasyonlarına ulaşamadığı ve yanlış katlanma süreci ile baş edemediği durumlarda, proteozom inhibitörleri ERAD yolağını bloke ederek UPR olarak adlandırılan bir sinyal kaskadını uyarır. Hücrenin kaderini belirlemedeki merkezi rolü nedeniyle UPR, günümüzde birçok çalışmanın temelini oluşturmaktadır. UPR’nin aktivasyonu, üç ER stres sensörü proteinine (Ire1, PERK ve ATF6) bağlıdır (Gardner ve diğ., 2013; Knupp ve diğ., 2019).

Saccharomyces hücrelerinde, ER’de bulunan transmembran proteini Ire1 (Inositol-requiring enzyme 1), bir endoribonükleaz görevi görür ve daha sonra UPR’den sorumlu olan bir transkripsiyon faktörü proteinine çevrilen mayalardaki *HAC1*’e (memelilerde *XBP1*) ait mRNA’nın kırılmasına katkıda bulunur. UPR hedef genleri, ER’de biriken katlanmamış proteinlerle başa çıkacak kodlayıcı faktörlerin yanı sıra, membran lipid metabolizması proteinlerini kodlayan enzimleri içerir. UPR’yi indükleyen hücrel koşulların tamamı, ER stresi olarak adlandırılır (Tran ve diğ., 2019).

Endoplazmik retikulumda katlanmamış protein birikiminin PERK (Pankreatik ER kinaz, PKR-like endoplasmic reticulum kinase) aracılığı sinyal yolağına bakıldığında ise, ER’de katlanmamış protein birikimi ile karşılaşıldığında BiP/Grp78 şaperonları devreye girmektedir. Katlanmamış proteinler PERK’in homodimerize olmasına ve buna bağlı olarak ökaryotik başlama faktör 2 (eIF2alfa)’nın Ser51’i fosforillemesine neden olmaktadır. Fosforile olmuş eIF2alfa, translasyonu inhibe eder. Sonuç olarak PERK, hücrel siklusun durması, apoptozis ve ERAD ile ilişkili genleri aktive ederek ER stresinde protein sentezi kontrolünde rol

almaktadır (Tashiro, 2019). Tip I transmembran proteinleri olan Ire1 ve PERK'in hemen hemen aynı büyüklükteki ER-lümenal alanlara sahip olması nedeniyle, ER stresini algılamak için ortak bir mekanizma paylaştıkları varsayılmaktadır (Çetinkaya ve Dursun, 2016).

Ökaryotik hücrelerdeki UPR sinyalizasyonunda rol alan bir diğer protein olan ATF6 (Activating transcription factor 6) ise tip II ER transmembran proteindir. Endoplazmik retikulumda (ER) katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin birikmesi transkripsiyonel olarak ER şaperonları, BiP ve GRP94'ü indükler (Kimata ve Kohno,2011). ER membranında yer alan ATF6, stres durumunda BİP şaporununa bağlanarak golgiye taşınır. Golgide ATF6'nın N-terminal sitosolik domaini, BiP, XBP1 ve Grp94 gibi hedef genlerin transkripsiyonunu uyuracak olan CRE (ATF/cAMP response element) ve ERSE (ER stres yanıt elementi)'ye bağlanmak için nukleusa geçmektedir.

Programlanmış hücre ölümü anlamına gelen “apoptoz”, Yunanca“apo (ayrı)” ve “ptozis (düşen)” kelimelerinden oluşmaktadır (Tomatır, 2003). Hücrelerde Na, K, Cl gibi elementlerin taşınmasında meydana gelen aksaklıklar nedeni ile hücre içine ve dışına taşınmanın bozulmasına bağlı olarak morfolojik olarak büzülme, hacimsel olarak küçülme ve çeşitli biyokimyasal değişimlerin beraberinde çevrede bulunan diğer hücrelerle olan temasın kaybolmasını takip eden bir süreç izlenmektedir (Munoz ve diğ., 2012; Sousa ve diğ.,2019). Hücreler apoptoza uğradığında çevrelerine zarar vermez ve bu süreç oldukça hızlıdır (Kerr ve diğ., 1972). Mitokondrial reaktif oksijen birikiminin neticesinde meydana gelen ER stresi sonucunda hücre sağ kalımı başaramazsa apoptoza sürüklenmektedir (Knupp ve diğ., 2019). Apoptoz, hücrelerde genetik belleklerinde yer alan bu programlı intihar olayını tetikleyen birtakım sinyalleri başlatan stres koşulları gibi durumlarla aktive olduğu bilinmesine rağmen moleküler mekanizması henüz tam anlamı ile bilinmemektedir. Günümüzde Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejenaratif bozukluklar ile ilgili hastalıkların temeline inildiğinde programlanmış hücre ölümlerindeki artış ile karşılaşılmaktadır (Sousa ve diğ., 2019). Bu mekanizmaların anlaşılması ve beraberinde yapılacak çalışmalarla apoptozun engellenmesiyle günümüzde karşılaştığımız pek çok hastalığın önüne geçilebilecektir.

Bu çalışmada ER stresi gibi stres koşulları ile karşılaşan tek gen delesyonlu *S. pombe* organizmalarında apoptoz artmaktadır. ER stresine sebep olan tunikamisin antibiyotiği gibi stres koşulları ile muamele olan organizmaların kontrol gruplarına göre daha fazla sayıda ve daha hızlı apoptotik sürece girdikleri gösterilmiştir.

2.2. WORTMANNİN

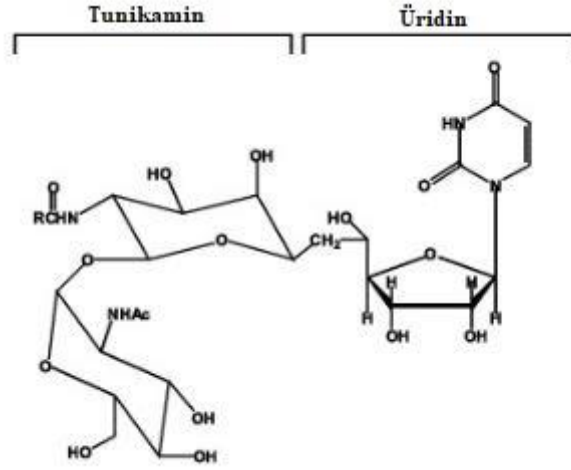
Fosfatidil inositol-4,5-bifosfat 3-kinaz (PI3K) yolağı başta olmak üzere sinyal iletim yollarının güçlü bir inhibitörü olan Wortmannin, *Talaromyces wortmanni* mantarının hidrofobik östrojen ile ilişkili bir mantar metabolitidir. Ayrıca G-protein-bağı reseptörler uyarıldığında meydana gelen hücresel tepkileri de inhibe etmektedir. Bunun bir örneği bazofilik lösemi hücreleri tarafından çeşitli ligandlar histamin salgılanmasını engellemesidir. Buna ilaveten Wortmannin ($C_{23}H_{24}O_8$), adipositlerde glukoz alımının insülin uyarımını da engellemektedir

Wortmannin, hem *S. cerevisiae* gibi tomurcuklanan hem de *S. pombe* gibi bölünen mayalar için toksik bir maddedir (Cardenas ve diğ., 1999).

2.3. TUNİKAMİSİN

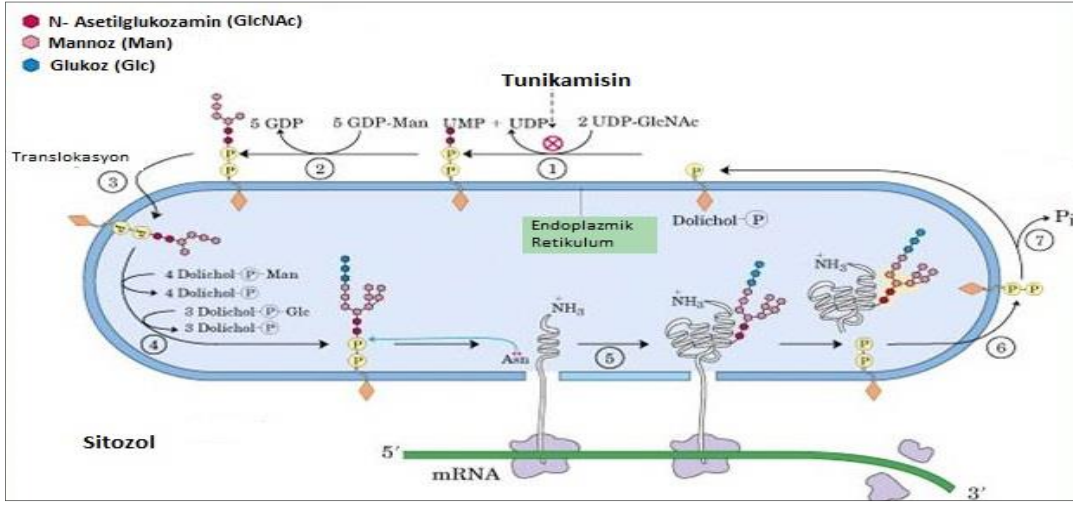
Tunikamisin, gram-pozitif bir bakteri türü olan *Streptomyces clavuligerus* tarafından üretilen bir sekonder metabolittir. 1970’li yıllarda keşfedilen tunikamisin, Takatsuki ve ekibinin antibiyotikler üzerine yaptığı ilk çalışmalarında *Streptomyces lysosuperificus*’ten izole edilmiştir (Takatsuki ve diğ, 1971) ve daha sonraki çalışmalarda aynı sekonder metabolitin *Streptomyces clavuligerus* ve *Streptomyces chartreusis* tarafından da üretildiği gösterilmiştir (Wyszynski, 2010).

Tunikamisin, aminodeoksidialdoz (tunikamin) olarak adlandırılan 11-karbonlu bir disakkarit olan üridin ve değişken uzunluktaki (13-17 karbonlu) bir yağ asidinden oluşan bir nükleozit antibiyotik sınıfına aittir (Varki ve diğ., 1999). Tunikamisinin yapısı Şekil 2.2’de verilmiştir:



Şekil 2.2: Tunikamisinin yapısı (Varki ve diğ., 1999).

GlcNAc fosfotransferazı (GPT) enzimini inhibe eden tunikamisin, oldukça önemli bir homolog nükleozit antibiyotığıdır. Şekil 2.3'te gösterildiği üzere GPT, asparagine bağlı glikoproteinlerin sentezini bloke eden dolikol fosfata N-asetilglukosamin-1-fosfatın UDP-N-asetilglukozaminden transferini kataliz etmektedir. Glikozasyonu inhibe etmek için gereken tunikamisin miktarı; fosfotransferaz ekspresyonundaki farklılıklar, kültür şartları, gen delesyonları gibi durumlara bağlı olarak hücreden hücreye farklılık göstermektedir. Tunikamisin sitotoksik bir maddedir ve dirençli mutantlar, GPT'yi aşırı üretebilmektedir (Wyszynski, 2010).



Şekil 2.3: Tunikamisinin ER’de GPT’yi inhibe etme mekanizması (biochem4.okstate.edu).

Tunikamisinin antiviral, antibakteriyal ve ökaryotlara ait N-bağlantılı protein glukozilasyonunun inhibisyonu gibi etkileri bulunmaktadır (Wyszynski, 2010). Antiviral etkisine bakıldığında, yapılan ilk araştırmalarda Newcastle Hastalık virüsünün çoğalmasını engellediği tespit edilmiştir (Takatsuki ve diğ., 1971). Aynı zamanda tunikamisin, virüsün neden olduğu tip 1 diyabet modelinde diyabet insidansını geciktirdiği gösterilmiştir (Shaabani ve diğ., 2012).

Tunikamisinin antibakteriyal etkisi açısından ise, bakterilerde hücre duvarı sentezini inhibe ettiği bilinmektedir. Tunikamisin, bakterilerde hücre duvarı temel bileşenleri olan peptidoglikanların yapısını oluşturan undekaprenil-pirofosforil-N-asetilmüramil pentapeptidin (Lipit I) oluşumunu katalize eden MraY’i bloke ederek hücre duvarı oluşumunu engellemektedir (Yamamoto ve Ichikawa, 2019).

Tunikamisinin ökaryotik etkisine bakıldığında ise, N-glikanların sentezini inhibe ettiği ve ER stresine neden olduğu gösterilmiştir. Hücre bölünmesini inhibe ederek hücrelerin homeostazını bozmaktadır. Tunikamisin ile muamele edilmiş olan ökaryotik hücrelere bakıldığında hücresel döngüyü G1 evresinde durdurduğu ve hücrenin apoptoza yöneldiği gösterilmiştir (Shaabani ve diğ., 2012; Xiao ve diğ., 2016). Hücresel döngüyü etkileyen ve ER stresine neden olan tunikamisin ile ilgili, diyabet (Diabetes mellitus vb. gibi), kanser (kolorektal, meme vb. gibi), nörodejeneratif hastalıkların (Alzheimer, Parkinson, ALS, SMA,

motor nöron hastalığı vb. gibi) ve birçok otoimmün hastalığın tedavisi için çalışmalar yapılmaktadır (Shaabani ve diğ., 2012).

2.4. *Schizosaccharomyces pombe*

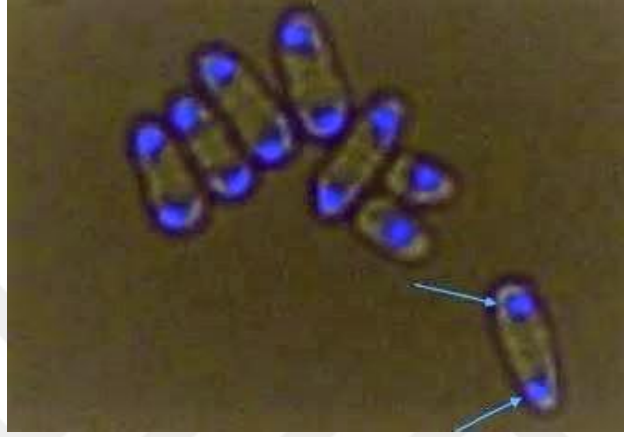
S. pombe fisyon mayası, ilk olarak Afrika'da 1893 yılında P. Lindner tarafından çeşitli Afrika biralardan izole edilmiştir. Daha sonra A. Osterwalder, 1921'de Fransa'nın güneyinde yetişen üzüm suyundan minimal besiyortamında yaklaşık olarak %90'ının konjugasyon yaptığı ve sporlar oluşturduğu için h^{90} olarak adlandırdığı suşları izole etmiştir. *S. pombe*'nin h^{90} suşu ilk olarak, 1940'lı yıllarda U. Leupold tarafından karakterize edilmiştir ve günümüzde 972 suşu olarak bilinmektedir. Heterotallik h^+ 972 ve h^- 972 suşları, h^{90} 972'den izole edilmiştir ve maya biyoteknolojisi laboratuvarında en yaygın olarak kullanılan suşlardan biridir (Hoffman, 2015).

Dünya çapındaki çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen *S. pombe*'nin kelime kökeni, bira benzeri fermente bir içecek anlamına gelen 'Svahili' sözcüğüdür. Bilim insanlarının 1940'lı yıllardaki ilk çalışmaları, yaşam döngüsünü içeren bölünme ve buna bağlı olarak üreme mekanizmalarını araştırma konuları üzerinde olmuştur (Leupold, 1950).

Normal şartlar altında *S. pombe*, haploid yapıda bulunan ascomycete grubuna ait mantarlardandır. Bir ascomycete'nin belirleyici özelliği, sporların ascus olarak adlandırılan özel bir yapı içinde oluşturulmasıdır. Hücreler, silindirik formdadır. Haploid yapıdaki serbest yeni bir hücrenin çapı 3-4 μm iken, bölünmek üzere olan hücreler 12-15 μm boyutlarındadır. Tüm fungal hücrelerde olduğu gibi hücre için ozmotik koruma sağlayan, hücre bütünlüğünü koruyan ve hayatta kalmak için gerekli olan hücre duvarına sahiptir. Hücre duvarı, monopolar veya bipolar büyüme, medial fisyonla sitokinez, zigot oluşumu ve spor gelişimi gibi yaşam döngüsü boyunca meydana gelen morfolojik değişikliklere izin veren dinamik bir yapıdır (Durán ve Pérez, 2004).

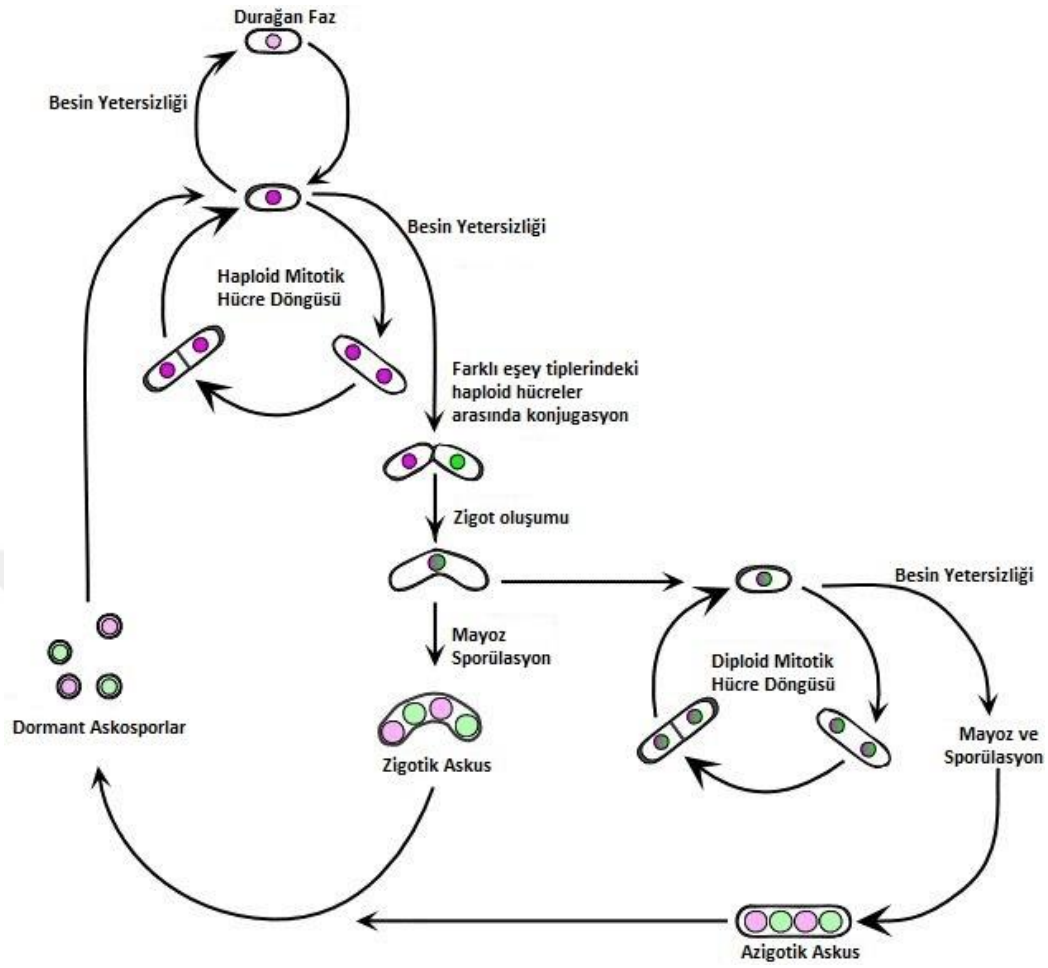
Bir *S. pombe* 'nin yaşam döngüsü, eşeyli üreme ve vejetatif üremelerden meydana gelmektedir. Fisyon mayası ("fission yeast") grubunda yer alan *S.pombe* model organizması, vejetatif üreme ile Şekil 2.5'te görüldüğü üzere nukleus sayısını ikiye katlayarak ve uzun eksene dik bir septum oluşumu gerçekleştirerek bölünmektedir. Eşeyli üreme ise h^+ ve h^- olarak bilinen iki farklı eşey tiplerinde olan ırklar arasında meydana gelmektedir, bu süreçte meydana gelen zigottan diploid hücreler oluşabilir veya mayoz bölünme geçirerek içerisinde

dört tane haploid askosporun bulunduğu zigotik askuslar meydana getirebilir. *S. pombe* hücrelerinin genellikle bulunduğu form haploid olmasına rağmen açlık gibi dış faktörler, h^+ ve h^- suşlarının haploid hücrelerini eşeyli üremeye teşvik eder ve (h^+ / h^-) heterozigot olan diploid zigotlar oluşturur (Egel, 2004). *S. pombe*'lerde jenerasyon süresi 2-4 saat arasında değişmektedir (Sharifmoghadam, 2009).



Şekil 2.4: Bölünme için nukleusunu iki katına çıkarmış olan *S. pombe* görüntüleri.

Normal büyüme koşulları altında ökaryotik hücreler, G1, S, G2 ve M fazlarını içeren tipik bir hücre döngüsü gösterirken *S. pombe*, diğer organizmalardan farklı olarak çok kısa bir G1 fazı göstermektedir (Sharifmoghadam, 2009). Besin eksikliği olan ortamlarda hücreler, hücre döngüsünün G1 fazında (azot yoksa) veya G2 fazında (glukoz yoksa) tutuklanır. Farklı eşey tipindeki hücreler azotsuz ortamda inkübe edilirse konjugasyon sürecine ve ardından diploid zigot oluşumuna yol açan bir dizi morfolojik değişime maruz kalırlar (Egel, 1994). Oluşan zigotlar kararsızdır ve genellikle hemen mayoz geçirir ve bu da dört haploid çekirdeğin oluşumuna yol açar; bunlar birer haploid sporun içinde bulunur ve bu sporlar zigotik bir askusun içindedir.



şekil 2.5: *S. pombe* 'nin Yaşam Döngüsü (tr.redsearch.org).

S. pombe model organizması ile ilgili çalışmalar; transkripsiyon, translasyon, DNA replikasyonu, hücre döngüsü kontrolü ve sinyal iletimi gibi temel mekanizmalarda yer alan oldukça önemli ve üzerinde henüz çalışılmamış birçok genin keşfedilmesine ve tanımlanmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan tek gen delesyonlu mutantlar, tunikamisin antibiyotiğine maruz bırakılarak farklı fonksiyonlara sahip genlerin tanımlanmasına yardımcı olduğu dşnlmektedir. Bu mutantlar ayrıca hücrelerdeki glukozilasyon fonksiyonlarının yanı sıra metabolizma ve hatta insanlarda görülen hastalıklar bakımından modeller sunmaktadır. Bununla birlikte, apoptoz indükleyici aktivitesi nedeniyle birçok kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve obezite gibi hastalığın moleküler düzeyde aydınlatılmasına da katkı sağlamaktadır.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN *Schizosaccharomyces pombe* IRKLARI

Bu tezde, çalışma grubumuz tarafından BAP-51649 No.lu ve “İnsan hastalıklarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında *Schizosaccharomyces pombe*’nin model organizma olarak kullanılmasının optimizasyonu” başlıklı proje çalışmasında *S. pombe* haploid mutant koleksiyonu (BIONEER, Versiyon 5.0) kullanılarak elde edilen wortmannin’e dirençli 111 ırk kullanıldı (Tablo 3.1). Parental ırk olarak *S. pombe* ED666 ırkı (*h+ade6-M210 ura4-D18 leu1-32*) kullanıldı.

Tablo 3.1 : Wortmannin’e direnç gösteren *S. pombe* tek gen delesyonlu mutant ırklar.

SPAC8C9.16c (<i>mug63</i>)	SPBC3E7.02c (<i>hsp16</i>)	SPCC970.06 (<i>erv29</i>)	SPBC1347.08c	SPAC31G5.04 (<i>lys12</i>)	SPAC22E12.01 (<i>pet3</i>)
SPAC17A2.14 (<i>mnr2</i>)	SPBC8D2.18c	SPBC1604.01 (<i>egt1</i>)	SPAC821.10c (<i>sod1</i>)	SPCC1884.02 (<i>nic1</i>)	SPBC19G7.18c
SPAC328.06 (<i>ubp2</i>)	SPBC15C4.01c (<i>oca3</i>)	SPBC2D10.14c (<i>myo51</i>)	SPAC9E9.13 (<i>wos2</i>)	SPAC1B3.01c	SPAC12B10.15c
SPCC1795.06 (<i>map2</i>)	SPCC1682.01 (<i>qcr9</i>)	SPBC4F6.16c (<i>ero11</i>)	SPAP27G11.10c (<i>nup184</i>)	SPBC1773.09c (<i>mug184</i>)	SPBC725.12 (<i>nbl1</i>)
SPAC57A7.09	SPAC1687.15 (<i>gsk3</i>)	SPBC8E4.04	SPBC106.01 (<i>mph1</i>)	SPAC926.03 (<i>rlc1</i>)	SPCC4B3.01 (<i>tum1</i>)
SPCC18.09c (<i>hnt3</i>)	SPAC20G4.03c (<i>hri1</i>)	SPBC4C3.09 (<i>otg3</i>)	SPBC146.10 (<i>mug57</i>)	SPAC3H1.08c	SPBC146.12 (<i>coq6</i>)
SPAC1952.17c (<i>tbc13</i>)	SPAC222.07c (<i>hri2</i>)	SPBC106.08c (<i>mug2</i>)	SPBC16H5.02 (<i>pfk1</i>)	SPBC3B8.08	SPBC23E6.02 (<i>rrp2</i>)
SPAC694.05c (<i>rps2502</i>)	SPBC13G1.08c (<i>ash2</i>)	SPAC227.17c	SPBC18H10.13 (<i>rps1402</i>)	SPBC16G5.09 (<i>kex1</i>)	SPBC1685.11 (<i>rlp1</i>)
SPBC1604.02c (<i>ppr1</i>)	SPBC28E12.03 (<i>rga4</i>)	SPAC688.03c	SPAC1556.05c (<i>cgr1</i>)	SPAC26A3.14c	SPCC622.12c (<i>gdh1</i>)
SPBC17A3.05c	SPAC26F1.03 (<i>pda1</i>)	SPBC18H10.15 (<i>cdk11</i>)	SPBC27.06c (<i>mgr2</i>)	SPAC4D7.01c (<i>sec71</i>)	SPAC3H5.09c
SPCC18B5.11c (<i>cds1</i>)	SPBC27B12.09c (<i>flx1</i>)	SPBC21C3.18 (<i>spo4</i>)	SPCC188.12 (<i>spn6</i>)	SPBC16G5.15c (<i>fkh2</i>)	SPAC824.03c

Tablo 3.1 (devamı) : Wortmannin'e direnç gösteren *S. pombe* tek gen delesyonlu mutant ırklar.

SPCC1322.05c (<i>lap2</i>)	SPBC2D10.06 (<i>rep1</i>)	SPAC11E3.04c (<i>ubc13</i>)	SPBC428.04 (<i>apq12</i>)	SPBC21D10.07 (<i>cmc1</i>)	SPBC1539.03c (<i>arg41</i>)
SPAC24B11.10c (<i>cfh1</i>)	SPAC23D3.13c	SPAC14C4.15c (<i>dpp1</i>)	SPAC4F10.04 (<i>ypa1</i>)	SPBC26H8.01 (<i>thi2</i>)	SPBC29A10.02 (<i>spo5</i>)
SPCC1919.12c (<i>erm2</i>)	SPAC3H8.09c (<i>nab3</i>)	SPAC22A12.11 (<i>dak1</i>)	SPBC577.11	SPBC354.15 (<i>fap1</i>)	SPCC576.02
SPAC1F5.07c (<i>hem14</i>)	SPAC1296.02 (<i>cox4</i>)	SPAC4G8.11c (<i>atp10</i>)	SPBC24C6.10 (<i>dip1</i>)	SPBC3E7.01 (<i>fab1</i>)	SPBPB21E7.05
SPCC1739.08c	SPAC222.05c (<i>mss1</i>)	SPAPB8E5.06c (<i>rpl302</i>)	SPCC63.06	SPBC56F2.09c (<i>arg5</i>)	SPCC1620.12c
SPAC1F5.05c (<i>mso1</i>)	SPBC577.06c (<i>stt4</i>)	SPBC27B12.08 (<i>sip1</i>)	SPAC926.05c (<i>dph4</i>)	SPBC776.04 (<i>sec2302</i>)	SPCC1840.10 (<i>ism8</i>)
SPBC21C3.16c (<i>spt4</i>)	SPAC869.02c (<i>yhb1</i>)	SPBC29A3.10c (<i>atp14</i>)	SPCC11E10.06c (<i>elp4</i>)	SPCC1020.07	SPCC4G3.12c
SPBC1711.03 (<i>emc3</i>)	SPCC1919.13c (<i>bmt5</i>)	SPBP8B7.27 (<i>mug30</i>)			

3.2. BESİ ORTAMLARI

Maya özütü zengin sıvı besi ortamı (YEL) hazırlamak için Tablo 3.2'de belirtilen oranlarda malzemeler bir araya getirildi ve ardından otoklava atılarak sterilizasyon (121 °C, 1.2 atmosfer basınç altında, 15 dk) aşaması tamamlandı. Mutant organizmalar için kullanılacak YEL içerisine 100 mg/mL stok genetisin antibiyotiği eklendi. Parental organizma için YEL içerisine genetisin eklenmedi.

Tablo 3.2: Yeast Extract Liquid (YEL) besi ortamı içeriği.

Glukoz	30 gr
Maya ekstresi (Yeast extract)	5 gr
Distile su	1000 mL

Zenginleştirilmiş sıvı besi ortamı (YES, Yeast Extract with Supplements) oluşturmak için YEL besi ortamının sterilizasyonu yapıldıktan sonra adenin, urasil, histidin, lösin ve lizin metabolitleri (her bir metabolitten 50 mg/L olacak şekilde) ilave edildi (Tablo 3.3) ve besi ortamı +4 °C’de inkübe edildi.

Tablo 3.3: Yeast Extact with Supplements” (YES) zenginleştirilmiş sıvı besi ortamı.

YEL besi ortamı	(200 mL)
Genetisin (100 mg/mL)	0,4 mL (Mutantlar için)
Adenin (50 mg/L)	1 mL
Histidin (50 mg/L)	1 mL
Lizin (50 mg/L)	1mL
Lösin (50 mg/L)	1 mL
Urasil (50 mg/L)	1 mL

Besi ortamına konulması gereken tunikamisin yarı öldürücü dozu (0,5 µg/mL) olarak ayarlanmıştır. Tüm tunikamisin içeren besi ortamlarındaki oran bu şekilde sabitlenmiştir.

3.3. *S. pombe* MUTANT IRKLARININ ÜRETİMİ VE SAKLANMASI

Ticari olarak Bioneer firmasından sağlanan *Schizosaccharomyces pombe* mutant ırkları (Versiyon 5) İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda bulunan Maya Genetiği ve Biyoteknolojisi Laboratuvarı Kültür Koleksiyonunda bulunmaktadır. -70°C’de 200 µL’lik plakalarda %50 (v/v) gliserol stokta saklanan hücrelerden parental ırk YES besi ortamına ekilirken mutant ırklar genetisin içeren YES besi ortamında 30°C’de, 180 dakika/devir çalkalayıcı etüvde (Sartoriusstedium, Certomat® IS), 5 gün, inkübe edilerek canlandırıldı. Çalışma süresince +4 °C’de stoklanan hücreler aynı şartlarda 1 gün inkübe edilerek taze kültürleri elde edildi. Koleksiyonun tamamı (111 ırk) için 96 kuyucuklu 200 µL’lik plakalar kullanılırken çalışmanın devamında kültür ortamının hacmi artırıldı. İlk seçimden sonra 24 kuyucuklu plakalar, ikinci seçim için 5 mL’lik cam tüpler kullanılarak hücrelerin üretimi sağlandı.

3.4. WORTMANNİN'E DİRENÇLİ MUTANT IRKLARA TUNİKAMİSİN ETKİSİ

Bu çalışma kapsamında, Endoplazmik Retikulum (ER) stresi yaratan tunikamisinin yarı öldürücü dozu (IC_{50}) Özarabacı (2017) tarafından tespit edildiği gibi, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak kullanıldı.

Wortmannine dirençli 111 ırkın tunikamisin metabolitine karşı üreme özellikleri, her biri üç deney tekrarı içeren iki basamakta seçildi. Birinci basamakta, logaritmik evrenin ortasına kadar üretilerek taze kültürleri elde edilen her bir ırkın kontrol (tunikamisin içermeyen) ve deney (tunikamisin içeren) grupları, 200 μL 'lik YES besi ortamında, 30°C'de, 180 dakika/devir 24 saat üretildi. Kontrol ırk olarak parental ırk kullanıldı. Kör örnek olarak, YES ve tunikamisin eklenen YES kullanıldı. İnkübasyon başlatılmadan önce ve sonra, spektrofotometre cihazında (EON, Biotek Instruments Inc.) her bir ırkın kontrol ve deney gruplarının 600 nm dalga boyundaki optik yoğunlukları ölçüldü. Buna göre, her bir ırk için üreme durumları, başlangıç ölçümü son ölçümden çıkartılarak hesaplandı.

İkinci basamakta, üreyen ırklar aynı koşullarda fakat 10^7 hücre/mL olacak şekilde 1 mL'lik kültürlerde üretildi. Üç deney tekrarının ortalaması alındı. Üreme miktarlarına bakılarak (Tablo 4.1) seçimleri sağlandı.

3.5. HÜCRE İÇİ OKSİDASYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ

Tunikamisin ile muamele sonrasında seçilen yüksek, orta ve düşük dirençli ırklar ile parental ırkın 30°C, 180 dakika/devir, bir gece üretilerek taze kültürleri elde edildi. Her bir ırkın taze kültüründen 10^7 hücre/mL olacak şekilde 5 mL'lik YES (kontrol) ve YES + 0,5 $\mu\text{g/mL}$ tunikamisin (deney) besi ortamlarına ekimleri yapıldı, 30°C'de, 180 dakika/devir, 24 saat üretildi. Daha sonra, eşit miktarda başlangıç hücre sayısı oluşturabilmek için çalkalayıcıdan alınarak spektrofotometre cihazında absorbans değerleri ölçüldü. Ayrıca, "Malassez" lamında (0.0025 mm^2 , Superior, Marienfeld) hücre sayımı yapıldı. Malassez lamında hücre sayımı aşağıdaki denkleme göre hesaplandı:

$$[\text{Hücre Sayısı} / \text{mL} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırma Katsayısı} \times 10^5]$$

Her bir ırkın kontrol ve deney grupları aynı miktarda hücre sayısı içerecek şekilde mikrosantrifüj tüplerine alındı. Bu tüplerdeki hücreler, 5.000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek

süpernatant uzaklaştırıldı. Elde edilen pellet, 1 mL taze besi ortamında çözündürüldü (Inoue ve diğ., 1999; Pereira ve diğ., 2003). Daha sonra bu tüplerin etrafı alüminyum folyo ile sarıldı. Etanolde hazırlanan “Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate” (DCFH-DA) çözeltisinden son derişimi 4 μ M olacak şekilde her bir tüpe eklendi ve 30°C’da 1 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi. Örnekler, 5.000 rpm’de 5 dk santrifüjlendi. Santrifüjün ardından kalan süpernatant tekrar uzaklaştırıldı ve çöken hücreler deiyonize su ile yıkanarak santrifüjleme işlemi tekrarlandı. Çökelti üzerine 0,4 mL PBS (Fosfat tampon tuz çözeltisi) eklendi ve spektrofloreometre kuyularına aynı örnekten 200 μ L’lik ikişer yükleme yapıldı ve spektrofloreometre cihazına yerleştirildi. Serbest radikallerin etkisiyle oluşacak “diklorofluoresinin” (DCF) yaydığı floresans, spektrofloreometrede (BioTek® Instruments, Inc FLX800 Spektrofloreometre Mikroplate Okuyucu) eksitasyon ve emisyon dalga boylarında (490 ve 524 nm) sırasıyla ölçüldü. Her deney üç defa tekrarlanarak kontrol edildi.

3.6. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİNİN SPOT EKİM YÖNTEMİYLE TAKİP EDİLMESİ

Tunikamisin ile muamele sonrasında seçilen yüksek, orta ve düşük dirençli ırklar ile parental ırkın 30°C, 180 dakika/devirde bir gece üretilerek taze kültürleri elde edildi. Her bir ırkın başlangıç saatinde OD’leri 0,2 olacak şekilde YES (kontrol) ve YES + tunikamisin içeren besi ortamlarına ekimleri yapıldı ve 30°C, 180 devir/dakikada 24 saat inkübe edildi. 24. saatin sonunda her bir ırkın hem kontrol hem de deney grupları sırası ile 10’ar kat sulandırma yapılarak 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 seyreltilti. Ardından mutant ırkların her biri yoğun olandan seyrek olana doğru sırası ile genetsinli katı YES besi ortamına, parental katı YES besi ortamına 5 μ L ekim yapıldı. Her ırkın deney ve kontrol grupları alt alta ekildi. Ekim yapıldıktan sonra petriler 30°C’de iki gece boyunca üremeye bırakıldı.

3.7. HÜCRELERDE PROTEOZOMAL AKTİVİTENİN BELİRLENMESİ

Parental ırk, tunikamisine düşük, orta ve yüksek dirençli mutant ırklar, 30°C, 180 devir/dakika, bir gece inkübe edildi. Her bir ırkın başlangıç saatinde OD’leri 0,2 olacak şekilde YES (kontrol) ve YES + tunikamisin besi ortamlarına ekimleri yapıldı ve 30°C, 180 devir/dakika, 24 saatinkübe edildi. Her bir ırkın kontrol ve deney gruplarından protein izolasyonu yapıldı. Zhang ve arkadaşları (2001) tarafından önerilen protein izolasyonu deneyinin ilk aşaması olarak her bir deney ve kontrol grupları 10 dk 7.000 rpm’de santrifüj

edildi. Daha sonra üst sıvı uzaklaştırılarak pelletin üzerine 400 µL parçalama tamponu (Tablo 3.4), 0,3 g cam boncuk ve 4 tane metal boncuk ilave edilerek dismembratör cihazında (Sartorius Mikro-Dismembratör S) 1 dakika karıştırma 1 dakika buzda tutma olacak şekilde üç kez tekrar edildi. Mikrosantrifüj tüplerinin altları delinerek süpernatant santrifüj ile alttaki tüpe geçirildi. 14.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı alınıp 15.000 rpm'de 15 dakika yeniden santrifüj edildi ve üst sıvı yeni tüplere alınarak -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.4: Hücre parçalama tamponu.

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

Her bir grubun protein izolasyon işlemi tamamlandıktan sonra protein konsantrasyonunu belirlemek için Waterborg (2002) tarafından modifiye edilmiş Lowry yöntemi uygulandı (Lowry ve diğ.,1951) ve proteozomal aktivite ölçümü için deney başlatıldı. İlk olarak, daha önceden hazırlanmış olan 140 µg/mL, 200 µg/mL, 280 µg/mL, 340 µg/mL, 400 µg/mL olan standartlar ile grafik oluşturuldu ve R^2 denklemi elde edildi [R^2 denklemi, $y = mx + b$, (y: absorbans, m: eğim, x: konsantrasyon değeridir ve R^2 mümkün olduğunca 1'e yakın olmalıdır.)]. Her bir deney grubuna ait proteinler 50 kat sulandırıldıktan sonra 0,1 mL örnek ve 0,1 mL 2N NaOH, 100°C'de 10 dk boyunca inkübe edildi. Oda ısısında 10 dk soğuması beklendikten sonra taze hazırlanmış olan 1 mL kompleks oluşturma belirteci (Tablo 3.5) eklenerek 10 dk oda ısısında bekletildi. 0,1 mL folin belirteci vortekslenerek ilave edildikten sonra alüminyum folyo ile kaplanarak 30-45 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 550 nm'de spektrofotometrede OD'leri ölçüldü. Sonuçlar R^2 denkleminde yerine koyularak her bir gruptan alınması gereken miktar belirlendi. Her bir deney üç defa tekrarlanarak kontrol edildi.

Tablo 3.5: Lowry çözeltileri (Çözelti A:B:C =100:1: 1).

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

Flood ve ekibinin (2005) *S. pombe*'lerdeki 20S proteozom aktivitelerinin ölçümüne dayanan yöntemin temelinde, proteozom tarafından kesilen işaretli substrat süksinoil-Leu-Leu-Val-Tyr-amino-4-metilkumarin (Suc-LLVY-AMC)'den ayrılıp serbest kalan amino-4-metilkumarin (AMC)'in flouresan özelliği göstermesi yer almaktadır. Toplam hacmi 100 µL olan assay tamponu (Tablo 3.6) içerisinde 50 µg/mL protein ile 4 mM proteazom substratı Suc-LLVY-AMC, 37°C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 100 µL etanol eklendikten sonra 0,1 M sodyum borat tamponu (1.6 mL, pH 9.0) ile muamele edilerek kuyucuklu plakalarına yüklendi ve açığa çıkan serbest AMC, spektrofotometre cihazında 390 nm ve 470 nm'de ölçüldü (Hamad, 2007). Her deney üç defa tekrarlanarak kontrol edildi.

Tablo 3.6: Proteozomal aktivite deney tamponu.

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

Toplam hacmi 100 mL

3.8. HÜCRELERDE CANLILIK VE APOPTOZ MİKTARININ BELİRLENMESİ

Çalışmada yer alan organizmaların canlılık ve apoptoz durumlarını tespit etmek için akrinin orange uygulaması yapıldı. Pajaniradje ve arkadaşlarının (2014) önerdiği ve Ağuş ve arkadaşlarının (2018) modifiye ettiği yöntem esas alındı. Deneye başlamadan önce akrinin orange/etidyum bromür (AO/EtBr) hazırlandı. AO ve EtBr ayrı ayrı (1 mg/mL) PBS'te çözündürüldü. AO/EtBr (60 µL/mL /100µL/mL) olacak şekilde eklenerek akrinin orange hazırlandı (AO 60 µL +EtBr 100 µL+ 840 µL PBS).

Parental ırk, tunikamisine yüksek, orta ve düşük dirençli mutant ırklar, 30°C, 180 devir/dakika, bir gece inkübe edildi. Her bir ırkın başlangıç saatinde OD₆₀₀'leri 0,2 olacak şekilde YES (kontrol) ve YES + tunikamisin (deney) besi ortamlarına ekimleri yapıldı ve 30°C, 180 devir/dakika, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelere 1,5 mL PBS eklenerek 5 dakika 5.000 g'de santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra 100 µL hücreye (2×10^5) 5 µL AO/EtBr eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Tekrar santrifüj edildikten sonra 1,5 mL PBS eklenerek 5 dakika boyunca 5.000 g'de santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Santrifüjlenme aşaması tekrar edildi. Yıkanan hücreler 100 µL PBS (pH:7.4) ile çözdürüldü ve görüntüleme zamanına kadar alimünyum folyo ile sarılarak -20 °C'de saklandı.

Görüntülemenin yapılacağı gün örneklerin her biri -20 °C'den çıkarılarak polilizinli lamın üzerine 10 µL olacak şekilde bırakıldıktan sonra kuruması için yaklaşık 10 dk bekletildi ve üzerine "mounting" solüsyonu eklenerek lamel kapatıldı. Mounting solüsyonun hazırlanması Tablo 3.7'de gösterildiği şekildedir:

Tablo 3.7: Mounting solüsyonunun içeriği.

100 µl PBS
900 µl gliserol
1 µg p-fenilendiamin

Floresans mikroskopta (Karl-Zeiss, Colibri 7) incelendiğinde canlı hücreler yeşil, apoptoza uğramış hücreler turuncu olarak görüntülendi. Her bir kontrol ve deney grubunun apoptoza uğramış hücreleri sayılarak kıyaslama yapıldı (EtBr için eksitasyon 510 nm, emisyon 595 nm, akridin orange için eksitasyon 500 nm, emisyon 530 nm).

3.9. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ

Parental ırk, tunikamisine yüksek, orta ve düşük dirençli mutant ırklar, 30°C, 180 devir/dakika, bir gece inkübe edildi. Her bir ırkın başlangıç saatinde OD₆₀₀'leri 0,2 olacak şekilde YES (kontrol) ve YES + tunikamisin besi ortamlarına ekimleri yapıldı ve 30°C, 180 devir/dakika, 24 saat inkübe edildi. Bu hücrelerin her birinden 1 mL mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. 7.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Ardından, üst sıvı uzaklaştırıldı. Pellet, 1

mL distile su ile yıkanarak 7.000 rpm'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi ve üst sıvı tekrar uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 1 mL %70 soğuk etanol eklendi. -20 °C'de 15 dakika inkübe edildikten sonra santrifüj edildi ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Distile su ile yıkama işlemi tekrarlandı. Santrifüjlenme aşamasının ardından hücre çökeltisi 200 µL soğuk etanolde süspanse edildi. Son konsantrasyon 1µg/mL olacak şekilde DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) eklendi ve 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra santrifüjleme tekrarlandı. Üst sıvı dökülerek distile su ile yıkama yapıldı. Çökelti üzerine 200 µL PBS eklendi ve -20 °C'de saklandı. Görüntüleme için 10 µL hücre süspansiyonu lam üzerine bırakıldı ve floresans mikroskopta görüntüleme yapıldı.

3.10. BİYOİSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Üç tekrarlı olarak yapılan deneylerin analizi GraphPad Prism 6 yazılımında 'Sidak'ın çoklu karşılaştırma testi' (Sidak's multiple comparisons test) uygulanarak 'çift yönlü varyans analizi' (2-way ANOVA) ile gerçekleştirildi. Standart sapmalar ve varsa duyarlılık miktarları belirtildi.

4. BULGULAR

4.1. TUNİKAMİSİNİN WORTMANNİN DİRENÇLİ *S. pombe* MUTANT İRKLARININ CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Bu tezde, *S. pombe* haploid mutant koleksiyonu (BIONEER, Versiyon 5.0) kullanılarak elde edilen Wortmannin'e dirençli 111 ırk kullanıldı. Bu ırkların tunikamisinli besi ortamında 24 saat sonundaki üreme miktarlarının optik yoğunluğu Tablo 4.1'de verilmiştir:

Tablo 4.1: Wortmannin'e direnç gösteren *S. pombe* tek gen delesyonlu mutant ırkların tunikamisinli besi ortamında 24. saatteki üreme miktarları.

Mutantlar	OD±SD	Mutantlar	OD±SD	Mutantlar	OD±SD
SPAC8C9.16c (<i>mug63</i>)	0,4±0,012	SPCC970.06 (<i>erv29</i>)	0,3±0,049	SPAC31G5.04 (<i>lys12</i>)	0,3±0,02
SPAC17A2.14 (<i>mnr2</i>)	0,7±0,022	SPBC1604.01 (<i>egt1</i>)	0,4±0,05	SPCC1884.02 (<i>nic1</i>)	0,3±0,01
SPAC328.06 (<i>ubp2</i>)	0,7±0,07	SPBC2D10.14c (<i>myo51</i>)	0,3±0,02	SPAC1B3.01c	0,4±0,007
SPCC1795.06 (<i>map2</i>)	0,4±0,03	SPBC4F6.16c (<i>ero11</i>)	0,5±0,01	SPBC1773.09c (<i>mug184</i>)	0,4±0,02
SPAC57A7.09	0,4±0,012	SPBC8E4.04	0,2±0,0007	SPAC926.03 (<i>rlc1</i>)	0,2±0,049
SPCC18.09c (<i>hnt3</i>)	1,13±0,028	SPBC4C3.09 (<i>otg3</i>)	0,4±0,045	SPAC3H1.08c	1,21±0,06
SPAC1952.17c (<i>tbc13</i>)	0,8±0,03	SPBC106.08c (<i>mug2</i>)	0,5±0,05	SPBC3B8.08	0,4±0,04
SPAC694.05c (<i>rps2502</i>)	0,5±0,008	SPAC227.17c	0,4±0,06	SPBC16G5.09 (<i>kex1</i>)	0,3±0,04
SPBC3E7.02c (<i>hsp16</i>)	0,4±0,05	SPAC688.03c	0,3±0,06	SPAC26A3.14c	0,3±0,06
SPBC8D2.18c	1,0±0,017	SPBC1347.08c	0,4±0,02	SPAC22E12.01 (<i>pet3</i>)	0,4±0,01

Tablo 4.1 (devamı): Wortmannin'e direnç gösteren *S. pombe* tek gen delesyonlu mutant ırkların tunikamisinli besi ortamında 24. saatteki üreme miktarları.

SPBC15C4.01c (<i>oca3</i>)	1,1±0,02	SPAC821.10c (<i>sod1</i>)	0,3±0,04	SPBC19G7.18c	0,2±0,02
SPCC1682.01 (<i>qcr9</i>)	0,9±0,04	SPAC9E9.13 (<i>wos2</i>)	0,3±0,07	SPAC12B10.15c	0,5±0,06
SPAC1687.15 (<i>gsk3</i>)	0,3±0,03	SPAP27G11.10c (<i>nup184</i>)	0,5±0,03	SPBC725.12 (<i>nbl1</i>)	0,3±0,03
SPAC20G4.03c (<i>hri1</i>)	0,3±0,05	SPBC106.01 (<i>mph1</i>)	0,6±0,07	SPCC4B3.01 (<i>tum1</i>)	0,5±0,05
SPAC222.07c (<i>hri2</i>)	0,4±0,008	SPBC146.10 (<i>mug57</i>)	0,4±0,03	SPBC146.12 (<i>coq6</i>)	0,4±0,06
SPBC13G1.08c (<i>ash2</i>)	0,3±0,04	SPBC16H5.02 (<i>pfk1</i>)	0,5±0,02	SPBC23E6.02 (<i>rrp2</i>)	0,3±0,049
SPBC1604.02c (<i>ppr1</i>)	0,3±0,02	SPBC18H10.13 (<i>rps1402</i>)	0,4±0,05	SPBC1685.11 (<i>rlp1</i>)	0,3±0,04
SPBC17A3.05c	0,6±0,02	SPBC18H10.15 (<i>cdk11</i>)	0,3±0,02	SPAC4D7.01c (<i>sec71</i>)	0,3±0,007
SPCC18B5.11c (<i>cds1</i>)	0,6±0,04	SPBC21C3.18 (<i>spo4</i>)	0,6±0,04	SPBC16G5.15c (<i>fkh2</i>)	0,4±0,06
SPCC1322.05c (<i>lap2</i>)	0,4±0,005	SPAC11E3.04c (<i>ubc13</i>)	0,5±0,03	SPBC21D10.07 (<i>cmc1</i>)	0,3±0,07
SPAC24B11.10c (<i>cfh1</i>)	0,9±0,1	SPAC14C4.15c (<i>dpp1</i>)	0,3±0,03	SPBC26H8.01 (<i>thi2</i>)	0,5±0,04
SPCC1919.12c (<i>erm2</i>)	0,3±0,02	SPAC22A12.11 (<i>dak1</i>)	0,4±0,03	SPBC354.15 (<i>fap1</i>)	1,0±0,017
SPAC1F5.07c (<i>hem14</i>)	0,3±0,07	SPAC4G8.11c (<i>atp10</i>)	0,3±0,05	SPBC3E7.01 (<i>fab1</i>)	0,6±0,03
SPCC1739.08c	1,2±0,07	SPAPB8E5.06c (<i>rpl302</i>)	0,4±0,06	SPBC56F2.09c (<i>arg5</i>)	0,5±0,03
SPAC1F5.05c (<i>mso1</i>)	0,3±0,03	SPBC27B12.08 (<i>sip1</i>)	0,3±0,007	SPBC776.04 (<i>sec2302</i>)	0,4±0,09
SPBC21C3.16c (<i>spt4</i>)	0,3±0,04	SPBC29A3.10c (<i>atp14</i>)	0,3±0,08	SPCC1020.07	0,3±0,03
SPBC1711.03 (<i>emc3</i>)	1,1±0,02	SPCC1919.13c (<i>bmt5</i>)	0,5±0,03	SPBP8B7.27 (<i>mug30</i>)	0,4±0,04

Tablo 4.1 (devamı): Wortmannin'e direnç gösteren *S. pombe* tek gen delesyonlu mutant ırkların tunikamisinli besi ortamında 24. saatteki üreme miktarları.

SPAC1296.02 (<i>cox4</i>)	0,3±0,1	SPBC24C6.10 (<i>dip1</i>)	0,4±0,07	SPBPB21E7.05	0,3±0,02
SPAC222.05c (<i>mss1</i>)	0,3±0,03	SPCC63.06	0,4±0,005	SPCC1620.12c	0,5±0,02
SPBC577.06c (<i>stt4</i>)	0,6±0,1	SPAC926.05c (<i>dph4</i>)	0,3±0,04	SPCC1840.10 (<i>ism8</i>)	0,5±0,008
SPAC869.02c (<i>yhb1</i>)	0,5±0,03	SPCC11E10.06c (<i>elp4</i>)	0,3±0,007	SPCC4G3.12c	0,5±0,08
SPBC28E12.03 (<i>rga4</i>)	0,3±0,007	SPAC1556.05c (<i>cgr1</i>)	0,3±0,03	SPCC622.12c (<i>gdh1</i>)	0,6±0,04
SPAC26F1.03 (<i>pda1</i>)	0,4±0,09	SPBC27.06c (<i>mgr2</i>)	0,4±0,045	SPAC3H5.09c	0,3±0,04
SPBC27B12.09c (<i>flx1</i>)	0,3±0,007	SPCC188.12 (<i>spn6</i>)	0,3±0,04	SPAC824.03c	0,5±0,008
SPBC2D10.06 (<i>rep1</i>)	0,3±0,04	SPBC428.04 (<i>apq12</i>)	0,3±0,02	SPBC1539.03c (<i>arg41</i>)	0,3±0,04
SPAC23D3.13c	1,1±0,03	SPAC4F10.04 (<i>ypr1</i>)	0,5±0,03	SPBC29A10.02 (<i>spo5</i>)	0,4±0,012
SPAC3H8.09c (<i>nab3</i>)	0,4±0,04	SPBC577.11	0,3±0,007	SPCC576.02	0,3±0,02

S. pombe mutant kitaplığının Wortmannin'e dirençli 111 ırkının 0,5 µg/mL tunikamisin metabolitinin etkisi, Bölüm 3.4'te anlatıldığı gibi, iki basamak halinde yapılan tarama deneyleri ile sınıflandırıldı. Tablo 4.2'de ilk tarama sonucunda tunikamisin varlığında üreyen *S. pombe* mutantları listelenmiştir.

Tablo 4.2: Tunikamisine dirençli olduğu belirlenen *S. pombe* mutant ırkları.

SPCC11682.01 (<i>qcr9</i>)	SPBC17A3.05c	SPAC14C4.15c
SPAC22A12.11 (<i>dak1</i>)	SPCC63.06	SPCC18.09c (<i>hnt3</i>)
SPAC24B11.10c (<i>cfh1</i>)	SPCC1739.08c	SPBC1711.03 (<i>emc3</i>)

Tablo 4.2 (devam): Tunikamisine dirençli olduğu belirlenen *S. pombe* mutant ırkları.

SPBC577.06c	SPBC28E12.03 (<i>rga4</i>)	SPAC26F1.03 (<i>pda1</i>)
SPAC23D3.13c	SPAC3H1.08c	SPAC26A3.14c
SPBC1685.11 (<i>rlp1</i>)	SPBC2D10.14c (<i>myo51</i>)	SPAC24H6.08
SPBC354.15 (<i>fap1</i>)	SPBC8D2.18c	SPBC15C4.01c (<i>oca3</i>)

İlk basamakta seçilen 31 ırkın ikinci basamakta, tunikamisin varlığında üretilerek elde edilen 1 mL'lik kültürlerinin OD₆₀₀ de ölçülen absorbanslarının ortalamaları alındıktan sonra tunikamisine karşı gösterdikleri toleransa göre üç gruba ayrıldı. Buna göre, OD₆₀₀'de ölçülen ortalama absorbans değerleri 0.9'dan büyük olanlar *tunikamisine yüksek dirençli*; 0.9-0.5 arasında olanlar *tunikamisine orta dirençli*; 0.5'den küçük olanlar ise *tunikamisine düşük dirençli* olarak değerlendirildi. İkinci basamaktaki seçim sonucunda tunikamisine yüksek dirençli 10 ırk Tablo 4.3'te; orta dirençli 5 ırk da Tablo 4.4'te; düşük dirençli 5 ırk da Tablo 4.5'te verildi.

Tablo 4.3: Tunikamisine yüksek dirençli *S. pombe* mutant ırkları.

SPCC11682.01 (<i>qcr9</i>)	Hücrede mitokondri organelinde bulunur. Aerobik solunumda, mitokondrial elektron transportu esnasında kompleks III'te meydana gelen ubikinolden sitokrom c'ye elektronların transferinde rol almaktadır. (Phillips ve diğ.,1990).
SPCC18.09c (<i>hnt3</i>)	Hücrede nukleusta yer almaktadır. <i>S. pombe</i> 'de DNA onarımında rol alır ve DNA 5' AMP hidrolazı görevi görür (Daley ve diğ., 2010)
SPAC24B11.10c (<i>cfh1</i>)	Çoğunlukla hücre iskeleti, nukleus ve sitosolde bulunmaktadır. Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ortologları, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da <i>ACK1</i> geni (hücre duvarı bütünlüğüne yardımcı görevi olan protein) ve <i>SHC1</i> geni (Sporülasyon- <i>chs3</i> geninin proteininin spesifik aktivatörü; kitin sentaz III) ve <i>Homo sapiens</i> 'te <i>DELE1</i> (apoptozu indükleyen DAP3'ü bağlayıcı protein) genleridir.
SPCC1739.08c	Karakterize edilmemiş bir oksidoredüktaz olan bu gen hücre içerisinde nukleus ve sitoplazmada bulunmaktadır. CH-OH grubunun elektron ve hidrojen donörü olarak rol aldığı ve NAD ⁺ veya NADP'nin indirgenmesiyle yükseltgenme-indirgenme (redoks) tepkimelerinin katalizlenmesinde rol almaktadır.

Tablo 4.3 (devam): Tunikamisine yüksek dirençli *S. pombe* mutant ırkları.

SPBC1711.03 (<i>emc3</i>)	Hücrede çoğunlukla sitosol ve ER’de yer almaktadır. ER’de protein katlanmasında rol alır (ER membran protein kompleks alt birimi Emc3) (Xiong ve diğ., 2019) ve ER ile mitokondri zarları arasında bir moleküler bağ kurulmasıyla metabolitlerin değişimini sağlar (Shurtleff ve diğ., 2018). İnsanlardaki ortoloğu, <i>EMC3</i> (ER membran protein kompleks alt birimi 3) genidir.
SPAC23D3.13c	Hücrede çoğunlukla golgi, endozom ve sitosolde bulunmaktadır. Guanil-nükleotid değişim faktörü olduğu tahmin edilmektedir. Belirli proteinleri hücrenin belirli bölgelerine iletiminde etkin rolü olan genidir. Ayrıca, vesikül aracılı taşımada da rol oynar.
SPAC3H1.08c	Hücrede çoğunlukla mitokondride bulunmaktadır. Kalsiyum iyonunun (Ca^{2+}) sitosolden mitokondriyal matrikse taşınmasında rol aldığı düşünülmektedir. Membran transportunda yer alan bu gen, bir lipit çift katman boyunca membranın bir tarafından diğerine madde taşımada rol almaktadır.
SPBC354.15 (<i>fap1</i>)	L-pipekolat oksidaz proteinini oluşturan bu gen, L-pipekolat ve L-prolin’i oksitler ($L\text{-pipekolat} + O_2 = H^+ + H_2O_2 + L\text{-1-piperidine-6-karboksilat}$) (Yoshida ve diğ., 2007). Hücresel aminoasit metabolik sürecinde rol oynamaktadır. Hücrelerin ürettiği bir veya daha fazla amino grubu içeren karboksilik asitleri ve amino asitleri içeren kimyasal reaksiyonlar ve yollarda rol almaktadır (Yoshida, 2004).
SPBC8D2.18c	Adenosilhomosisteinaz proteinini oluşturan bu gen, hücrede sitosolde bulunur. Tripeptid glutatyon, sistein ve metiyonin gibi sülfür içeren bileşikler veya nonmetalik sülfür elementi içeren yolaklarda ve aynı zamanda, hücresel aminoasit metabolik sürecinde rol oynamaktadır. Adenosilhomosistein, S-adenosil-L-metiyonin bağımlı metil transferaz reaksiyonlarının rekabetçi bir inhibitörüdür, bu nedenle adenosilhomosisteinaz, adenosilhomosisteinin hücre içi konsantrasyonunun düzenlenmesi yoluyla metilasyonların kontrolünde önemli bir rol oynayabilir (Hayashi, 2018). İnsanlardaki ortoloğu <i>AHCY</i> (adenosilhomosisteinaz) geninin fonksiyonuna inhibe edildiğinde, DNA hasarına ve hücre döngüsü durmasına neden olduğu görülmüştür (Belužić ve diğ., 2018).
SPBC15C4.01c (<i>oca3</i>)	Hücrede çoğunlukla nukleus, ER ve sitoplazmada bulunmaktadır. Hücre döngüsünde ve endoplazmik retikulumda protein katlanmasında rol alır. ER ve mitokondri zarları arasında bir moleküler bağlanma kurulmasıyla metabolitlerin değişimini sağlamaktadır.

Tablo 4.4: Tunikamisine orta seviyede dirençli *S. pombe* mutant ırkları.

SPAC17A2.14 (<i>mnr2</i>)	Transmenbran transportunda görev alır. Vaküolar CorA ailesinden magnezyum iyonunun membran transporter rolünü üstlenmektedir. Vakuol membranında bulunan <i>mnr2</i> geninin magnezyum depolamada rol aldığı bilinmektedir. Bu genin aktive edildiği çalışmalarda, Mg transferinin engellendiği ve maya hücrelerinde Mg içeriğinde artış saptanmıştır (Pisat, 2009). Bu genin ortoloğu, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 'da <i>MNR2</i> (hücrel magnezyum homeostazı için gerekli vakuolar membran proteini) genidir (Hanner ve diğ., 2019). Enzim metabolizması için oldukça önemli bir kofaktör olan Mg^{+2} 'un enerji üretimi, iyon metabolizması ve hücre döngüsü düzenlemesinde rol aldığı ve 300'den fazla metabolik reaksiyona katıldığı bilinmektedir.
SPAC1952.17c (<i>tbc13</i>)	Hücrede çoğunlukla sitosolde bulunur. Vesikül aracılı taşınımında rol alan GTPaz aktive edici protein gen ürünüdür. Vesikül aracılı taşınımında rol oynar.
SPAC328.06 (<i>ubp2</i>)	Proteinlerin katabolik sürecinde rol oynar. Bir veya daha fazla ubikuitin veya ubikuitin benzeri proteinler gibi küçük protein gruplarının bir hedef proteine kovalent olarak eklendiği veya çıkarıldığı protein modifikasyonlarında görev almaktadır.
SPBC17A3.05c	Tek zincirli polipeptitlerin ve çok üyeli komplekslerin kovalent veya kovalent olmayan bağında üçüncül yapıya yardımcı olarak proteinlerin katlanmasında rol oynamaktadır.
SPCC18B5.11c (<i>cds1</i>)	Replikasyon kontrol noktası kinazı kodlayan <i>cds1</i> geninin; DNA replikasyonu, sinyal iletimi, nükleositol plazmik taşınım ve mitotik hücre döngüsü faz geçişinin düzenlenmesinde rolleri bulunmaktadır (Xu ve Kelly, 2009). Serin/treonin kinaz olan <i>cds1</i> , <i>S. pombe</i> 'lerde hücre siklusunun S-M kontrol noktasında rol alır ve çoğalma için gereklidir ancak <i>cds1</i> 'in bu işlevleri nasıl gerçekleştirdiği büyük ölçüde bilinmemektedir (Boddy ve diğ., 2000; Paparatto ve diğ., 2009). DNA replikasyonunu stres durumunda yavaşlatır. Örneğin, UV ışınmasından zarar gören DNA'nın replikasyonunu yavaşlatmak için <i>cds1</i> gereklidir.

Tablo 4.5: Tunikamisine düşük seviyede dirençli *S. pombe* mutant ırkları.

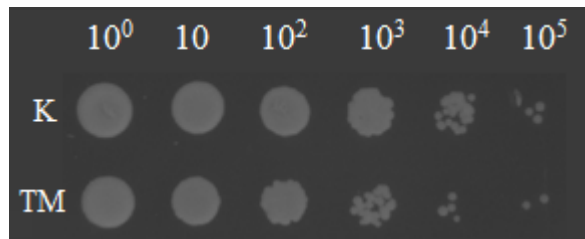
SPBC19G7.18c	'Schizosaccharomyces spesifik protein'i kodlayan SPBC19G7.18c geni, henüz tam olarak karakterize edilememiştir. İnsanlardaki transkripsiyon ve hücre döngüsü ilerlemesinin bir düzenleyicisi olan Melanom Antijen D1'e homoloji göstermektedir. Ancak bu homolojinin önemi henüz tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir (Deshpande ve diğ., 2009).
SPBC8E4.04	'Alditol NADP ⁺ 1-oksidoredüktaz aktivitesi'ni kodlayan, nukleusta ve sitoplazmada bulunan SPBC8E4.04 geni karbonhidrat metabolik sürecinde rol alır. Karbonhidratların dahil olduğu kimyasal reaksiyonlar ve yolaklarda rol alır. Arabinoz ve D-ksiloz katabolik sürecinde yer alır.

Tablo 4.5 (devam): Tunikamisine düşük seviyede dirençli *S. pombe* mutant ırkları.

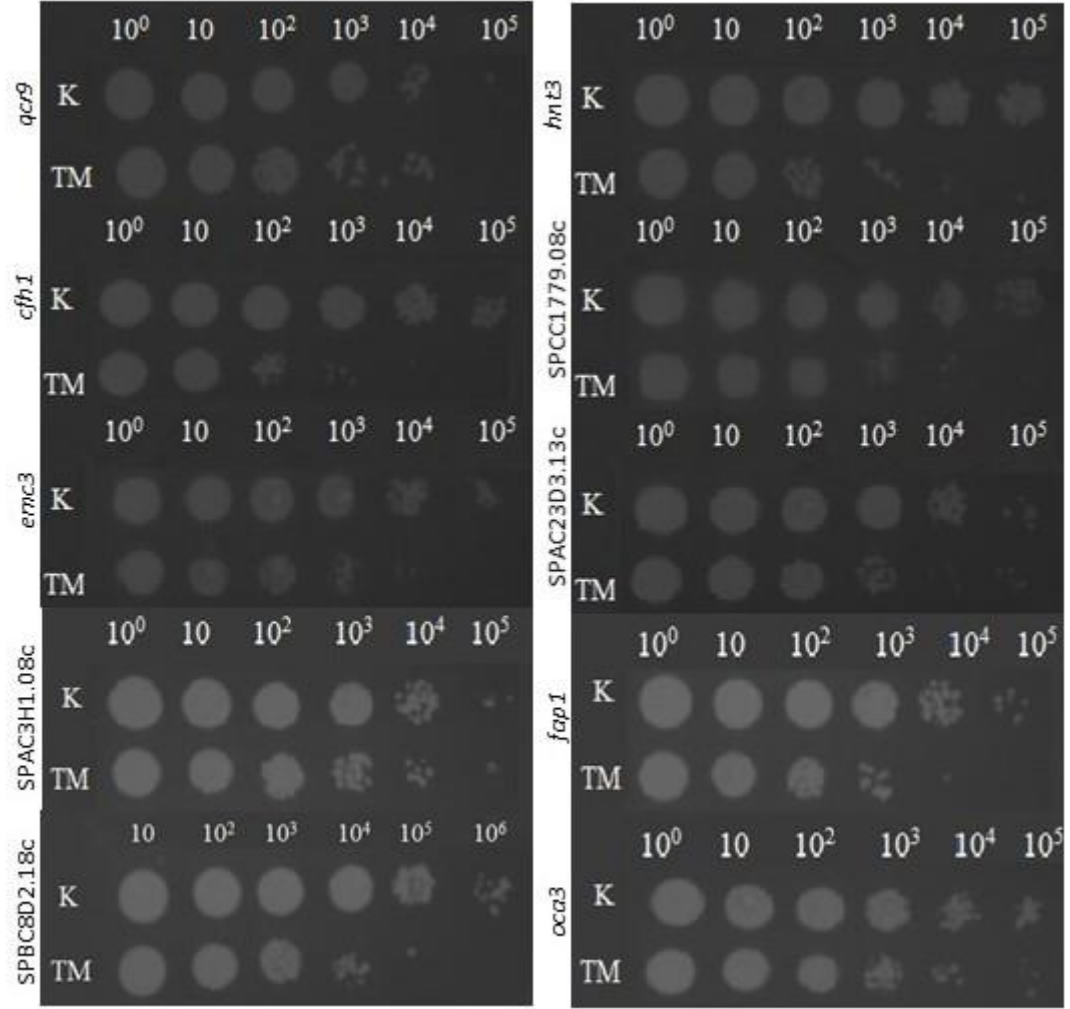
SPAC926.03 (<i>rlc1</i>)	‘Miyosin II düzenleyici hafif zincir Rlc1’ gen ürünüdür. Mitotik sitokineze ve aktin filamentleriyle ilişkili proteinleri içeren hücre iskeleti organizasyonunda rol alır (Goff ve diğ., 2000).
SPAC688.03c	‘Human AMMECR1 homolog’ gen ürünüdür.
SPAC4D7.01c (<i>sec71</i>)	Vesikül aracılı taşınma olarak adlandırılan ve taşınan maddelerin zara bağlı vesiküllerde hareket ettiği hücrel bir taşıma işleminde de rol alır. Taşınan maddeler vesikül lümeni içine alınır veya vesikül zarında bulunur. Vesiküller daha sonra bir alıcı membranı hedef alır ve yerleşir. İnsanlardaki ortologları olan <i>ARFGEF1</i> ve <i>ARFGEF2</i> (ADP ribozilasyon faktörü guanin nükleotit değişim faktörü 1-2) genleri, hücre içi vesiküler taşımada rol almaktadır (https://www.pombase.org/gene/SPAC4D7.01c).

4.2. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE CANLIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

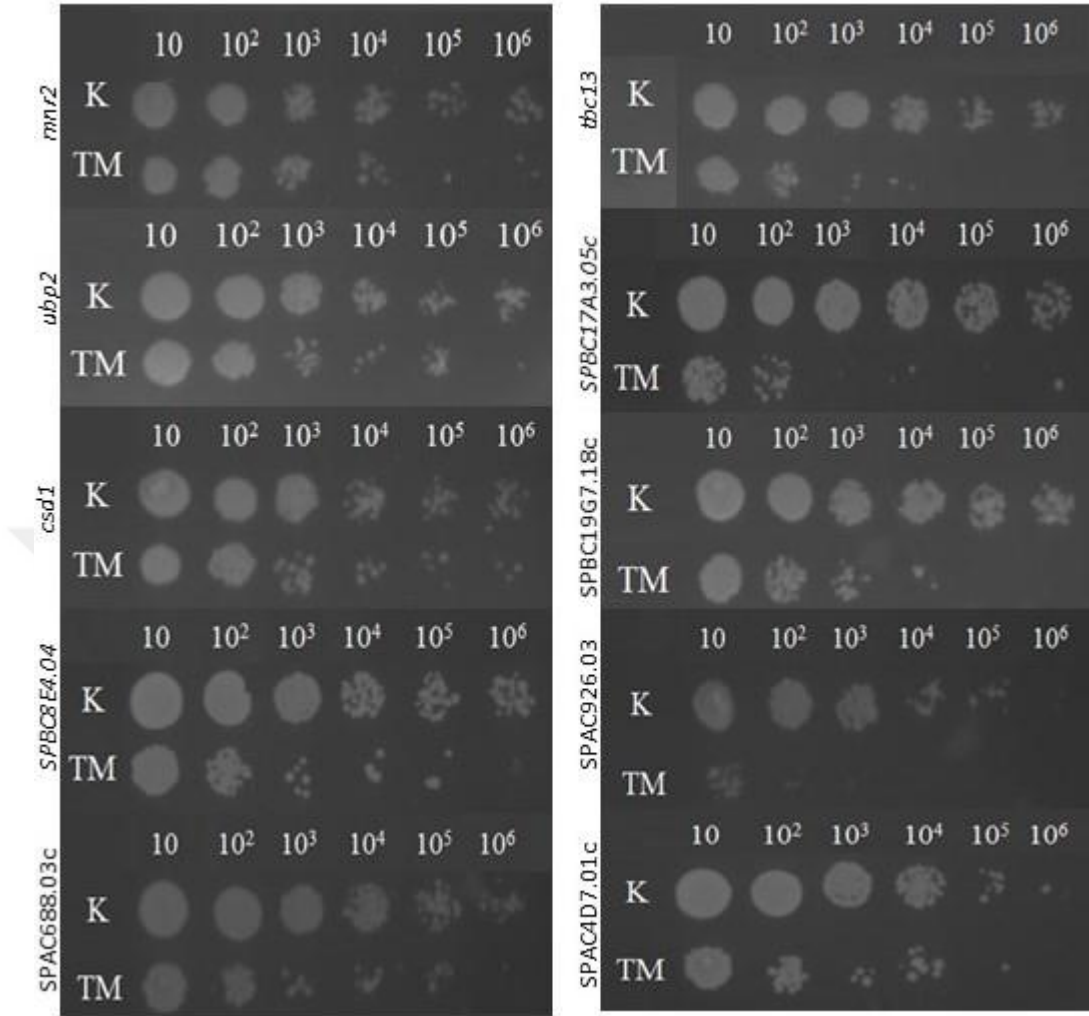
Bölüm 4.1’de belirlenen Wortmannin’e ve tunikamisine dirençli ve dirençsiz toplam 20 mutant ırk ile parental ırkın Bölüm 3.6’da açıklandığı şekilde, kontrol ve deney gruplarının seri sulandırılmaları yapıldıktan sonra tunikamisin içermeyen zengin katı besi ortamlarına spot ekimleri yapıldı. Parental ırkın spot üreme sonuçları, Şekil. 4.1’de verildi. Buna göre, parental ırkta 0,5 µg/mL tunikamisinin öldürücü etkisi %50 olarak tespit edildi.

**Şekil 4.1:** Parental hücreye ait spot ekim görüntüleri.

Tunikamisine karşı tolerans gösteren mutantların, tunikamisine maruz bırakıldıktan sonra, tunikamisin içermeyen katı ortamdaki spot üremeleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’te verildi. Tunikamisine maruz bırakılan hücrelerin tunikamisin içermeyen ortamlardaki spot üremeleri, bu ırkların Bölüm 4.1’de yapılan gruplandırmalarına (yüksek, orta ve düşük düzey dirençlilik) paralel bir sonuç olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2: Tunikamisine yüksek dirençli hücrelere ait spot ekim görüntüleri.



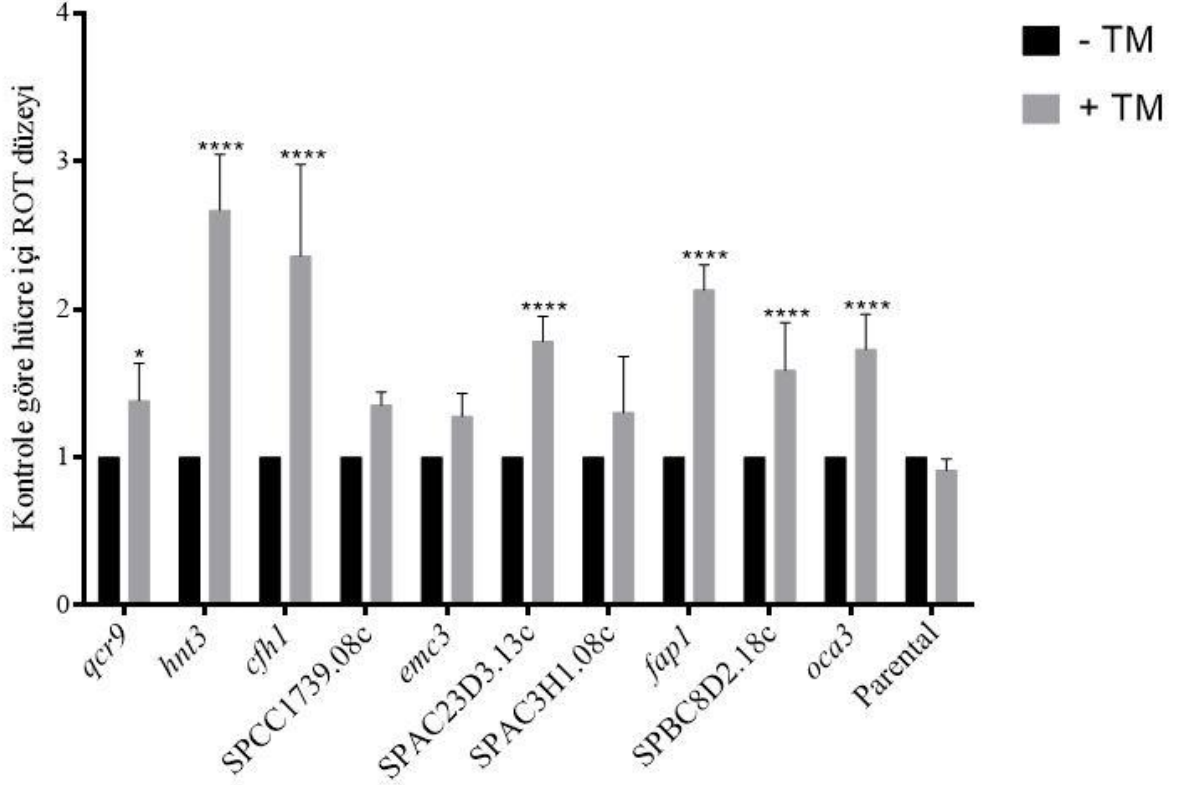
Şekil 4.3: Tunikamisine orta ve düşük dirençli hücelere ait spot ekim görüntüleri.

4.3. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE İÇİ OKSİDASYONA ETKİSİ

Hücre içi oksidasyon (ROT) deneyinde her bir ırkın deney grupları ile kontrol grupları karşılaştırılarak sonuçlar analiz edildi. Şekil 4.4'te görüldüğü üzere, tunikamisine maruz kalan her bir ırkın kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak ROT içerdiği tespit edildi.

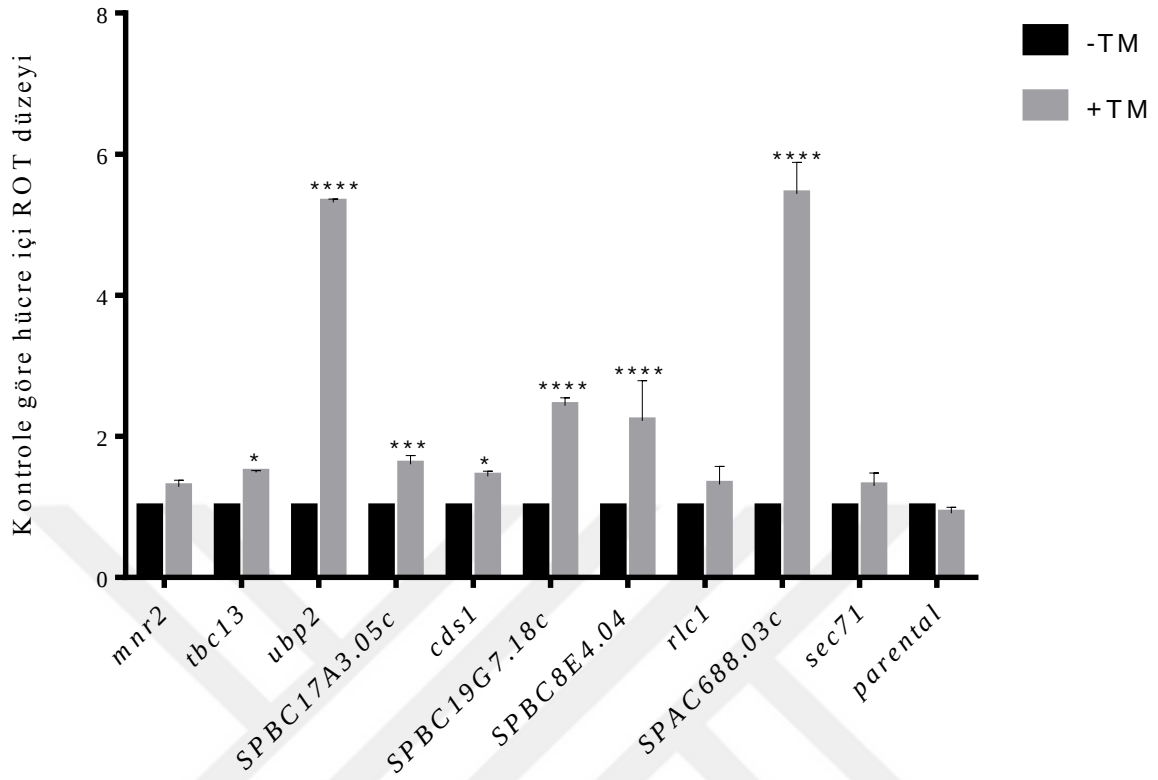
Hücre içi oksidasyon düzeylerinin istatistiksel veri analizi GraphPad Prism 6 programı ile yapıldı. Bölüm 3.5'te açıklandığı üzere en az üç tekrarlı ve her biri duplike olarak yapılan deneylere ait ortalama değerler kullanılarak çizilen grafikler Şekil 4.4'te verildi. *S. pombe* *qcr9*, *cfh1*, *hnt3*, SPCC1739.08c, *emc3*, SPAC23D3.13c, SPAC3H1.08c, *fap1*, SPBCD2.18c ve *oca3* mutantlarının tunikamisine maruz kaldıktan sonra hücre içi oksidasyon düzeylerinin

kontrollerine göre arttığı tespit edildi. Bu mutantlardan *S. pombe qcr9*, *hnt3*, *cfh1*, SPAC23D3.13c, *fap1*, SPBCD2.18c ve *oca3* mutantlarında 2 ila 3 kat seviyelerinde gözlenen ROT artışı istatistiki olarak anlamlı bulundu. Tunikamisin uygulanan *S. pombe* parental ırkında ise kontrole göre ROT miktarında bir değişiklik belirlenmedi.



Şekil 4.4: TM içeren besi ortamında üretilen parental ırk ve tunikamisine yüksek dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak hücre içi oksidasyon düzeyleri (TM: Tunikamisin).

Tunikamisine orta ve düşük düzeyde tolerans gösteren hücrelerde de kontrollerine göre ROT seviyelerinde artış tespit edildi (Şekil 4.5). Ancak burada, *S. pombe ubp2* ve SPAC688.03c ırklarında kontrollerine göre oldukça fazla (yaklaşık 6 kat) ROT artışı gözlemlendi. Diğer 5 ırkta 1,5-2 kat artış tespit edildi.

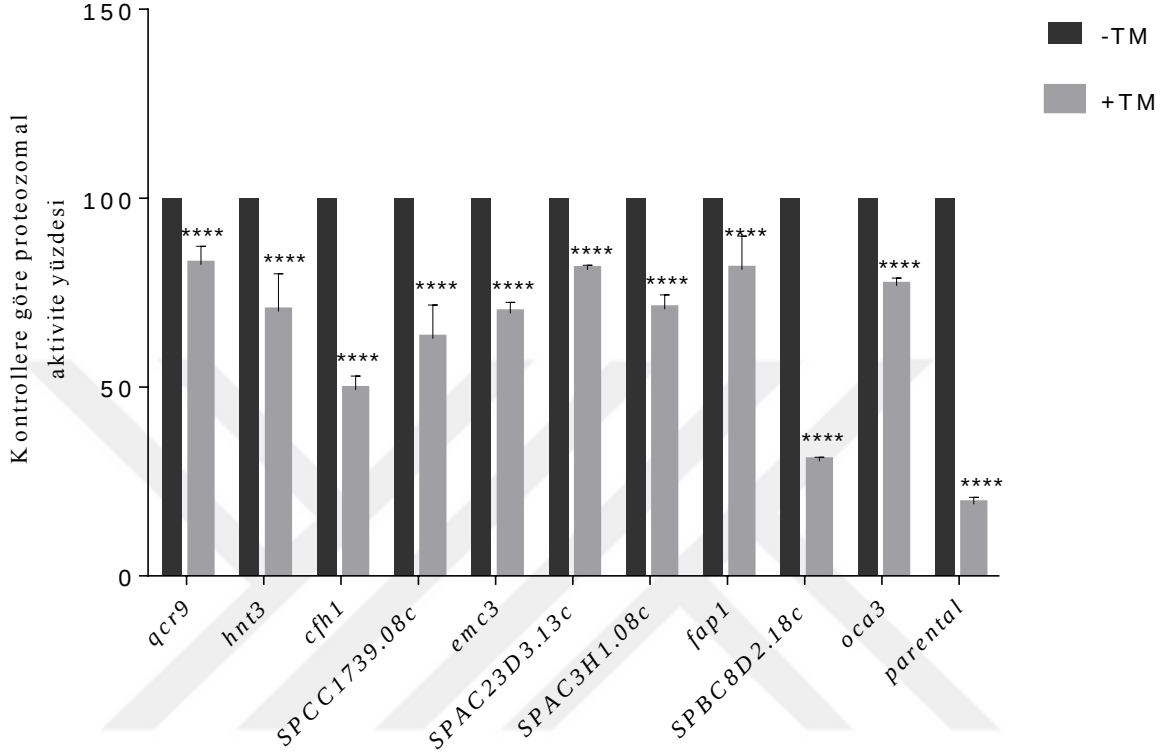


Şekil 4.5: TM içeren besi ortamında üretilen tunikamisine orta ve düşük düzeyde dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak hücre içi oksidasyon düzeyleri (TM: Tunikamisin).

4.4. TUNİKAMİSİNİN HÜCRELERDEKİ PROTEOZOMAL AKTİVİTEYE ETKİLERİ

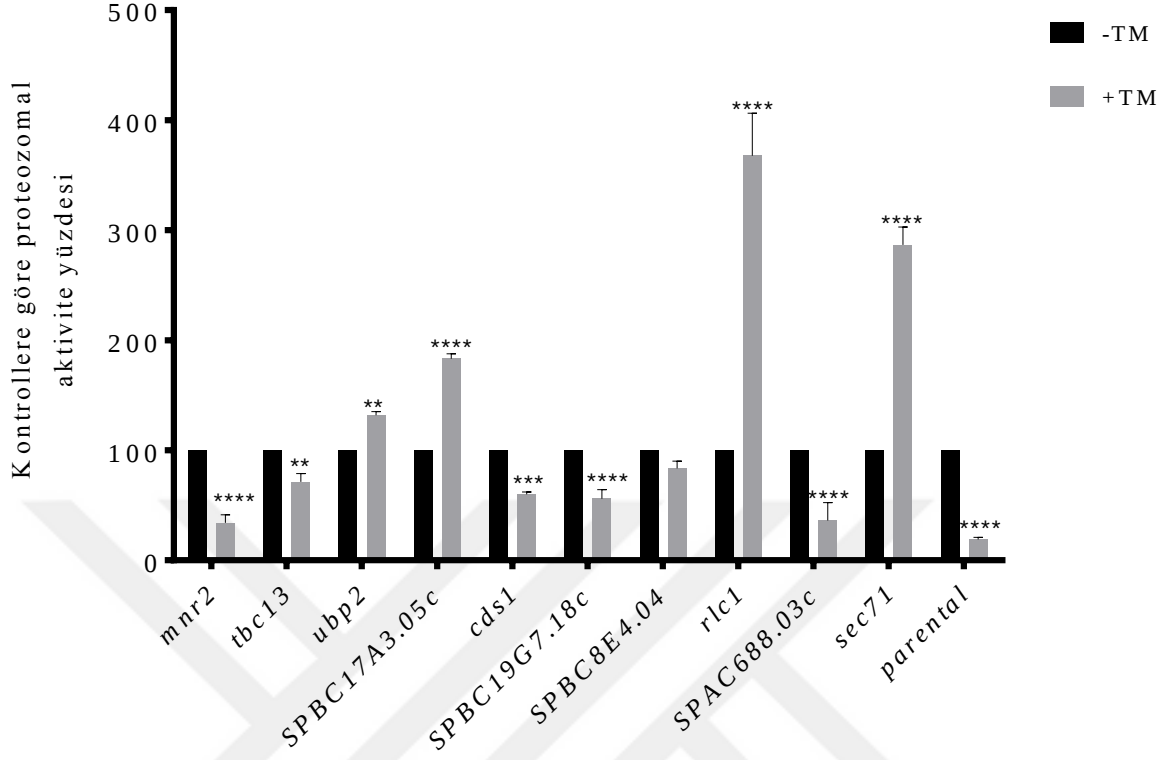
Bu çalışmada tunikamisin rekabetinin tetiklediği ER stresi ile proteozomal aktivite arasındaki ilişki, parental ırk ile tunikamisine yüksek, orta ve düşük dirençli ırklarda ölçülen proteozomal aktivite ile araştırıldı. Bölüm 3.7’de anlatıldığı gibi ve 3 tekrarlı yapılan proteozomal aktivite deney verileri GraphPad Prism 6 programı kullanılarak, hem istatistiki olarak hem de grafik oluşturularak analiz edildi. Tunikamisine muamele edilmiş olan deney gruplarında tunikamisin eklenmemiş olan kontrol gruplarına göre tunikamisine bağlı olarak proteozomal aktivitelerin düştüğü görüldü (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7). *S. pombe* mutant hücrelere göre parental ırkta kontrol ve deney grupları arasındaki proteozomal aktivite farkının daha fazla olduğu görüldü. *S. pombe qcr9*, *hnt3*, *emc3*, SPAC23D3.13c, SPAC3H1.08c, *fap1* ve

oca3 mutantlarında yaklaşık %75 ve üzeri; *cfh1*, SPCC1739.08c ırklarında yaklaşık %50; SPBCD2.18c ırkı ile parental ırkta %50'nin altında proteozomal aktivite tespit edildi.



Şekil 4.6: Tunikamisine yüksek dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak proteozomal aktivite yüzdeleri (TM:Tunikamisin).

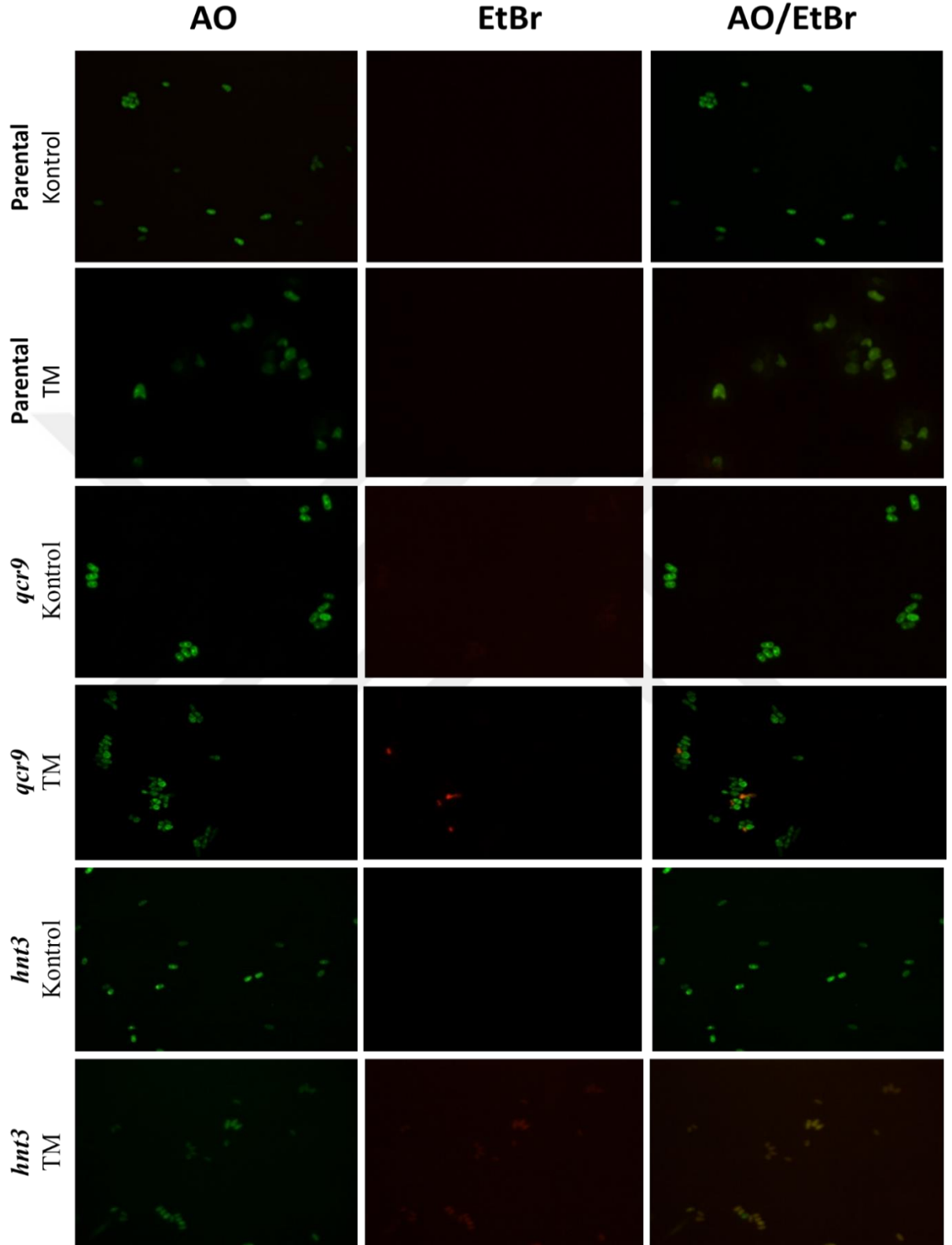
Tunikamisine orta ve düşük toleranslı *S. pombe* ırklarında kontrole göre ve deney gruplarında proteozomal aktivitenin bazı hücrelerde arttığı bazılarında da azaldığı tespit edildi (Şekil 4.7). Buna göre, *S. pombe rlc1* ve *sec71* ırklarında proteozomal aktivite %300'ün üzerinde; *S. pombe ubp2*, SPBC17A3.05c ırklarında ise %100-200 arasında ölçülürken, diğer ırklarda (*mnr2*, *tbc13*, *cds1*, SPBC19G718c ve SPAC688.03c) %50-75 arasında olduğu belirlendi. SPBC8E404 ırkındaki proteozomal aktivitenin kontrole göre değişmediği gözlemlendi.



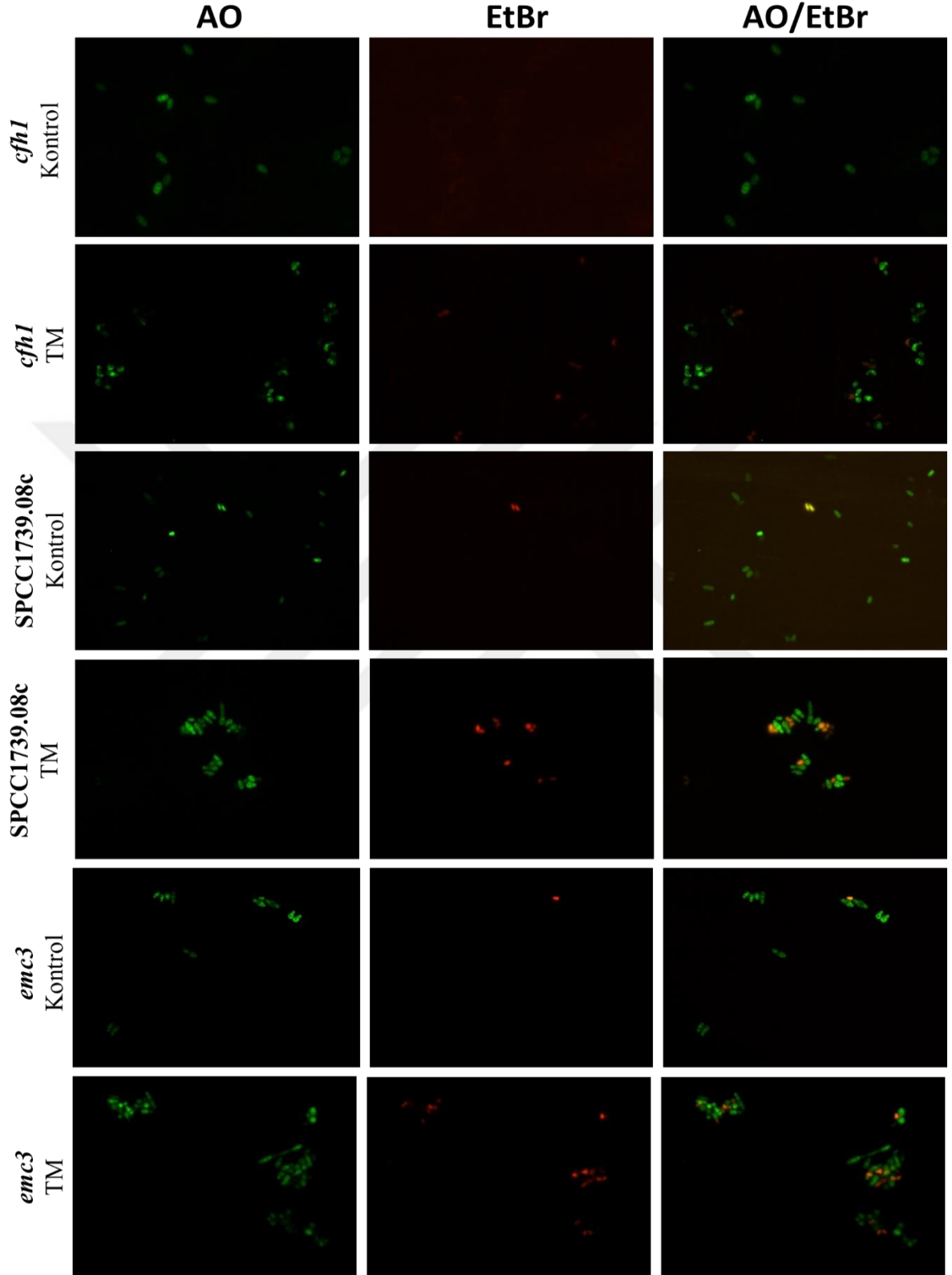
Şekil 4.7: Tunikamisine orta ve düşük seviyede dirençli mutant ırkların kendi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak proteozomal aktivite yüzdeleri (TM:Tunikamisin).

4.5. TUNİKAMİSİNİN APOPTOZA ETKİSİ

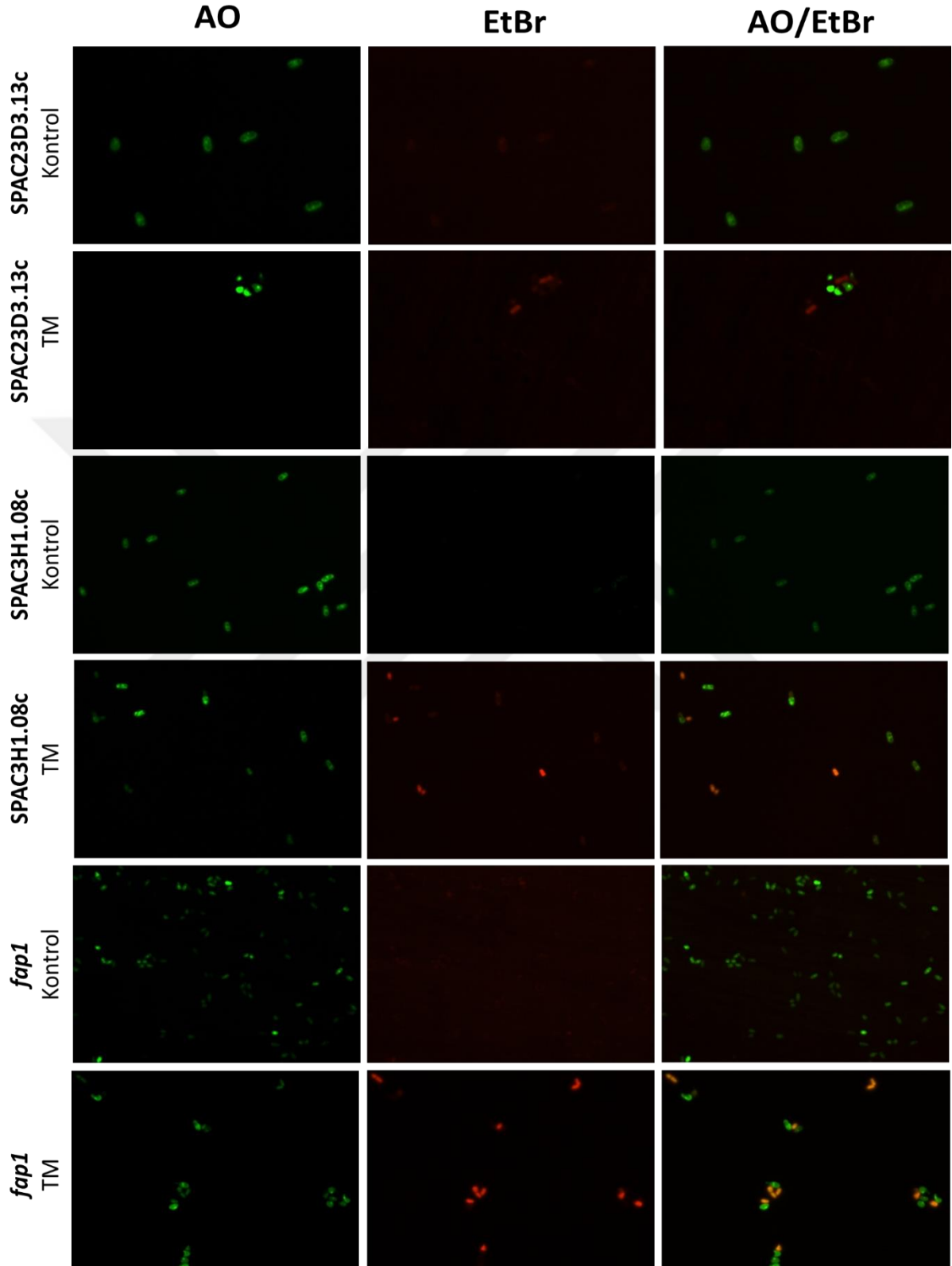
Tunikamisin ile tetiklenen ER stresinin apoptoza etkisini belirlemek için *S. pombe* parental ırk ile tunikamisine yüksek, orta ve düşük tolerenastlı 20 mutant ırkın Bölüm 3.8’de anlatıldığı gibi kontrol ve deney gruplarının her biri floresans mikroskopta (Karl-Zeiss, Colibri 7) AO/EtBr filtrelerinde görüntülendi. Canlı hücreler yeşil, apoptoza uğramış hücreler ise turuncu renkte gözlemlendi (Şekil 4.8).



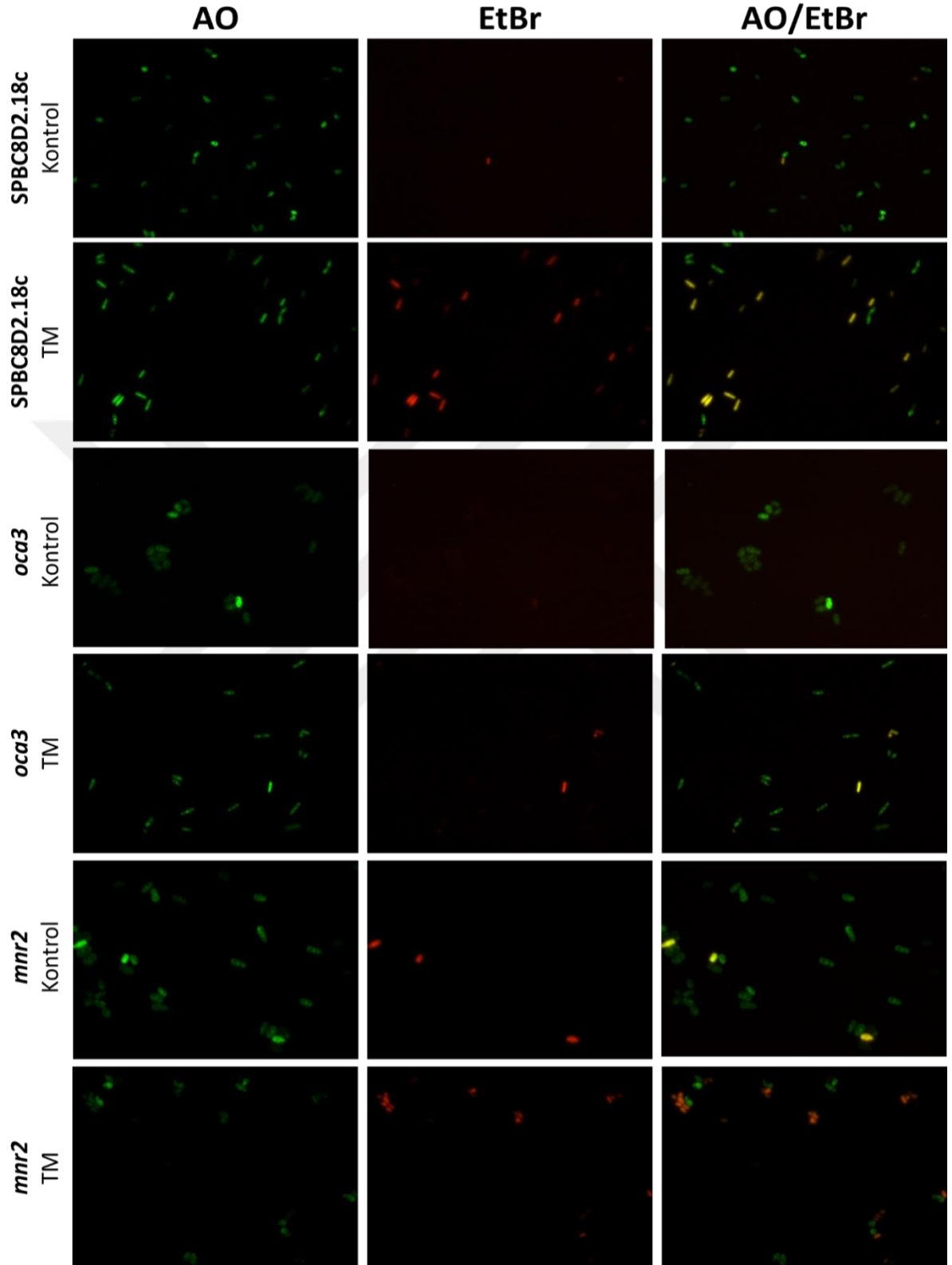
Şekil 4.8: Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



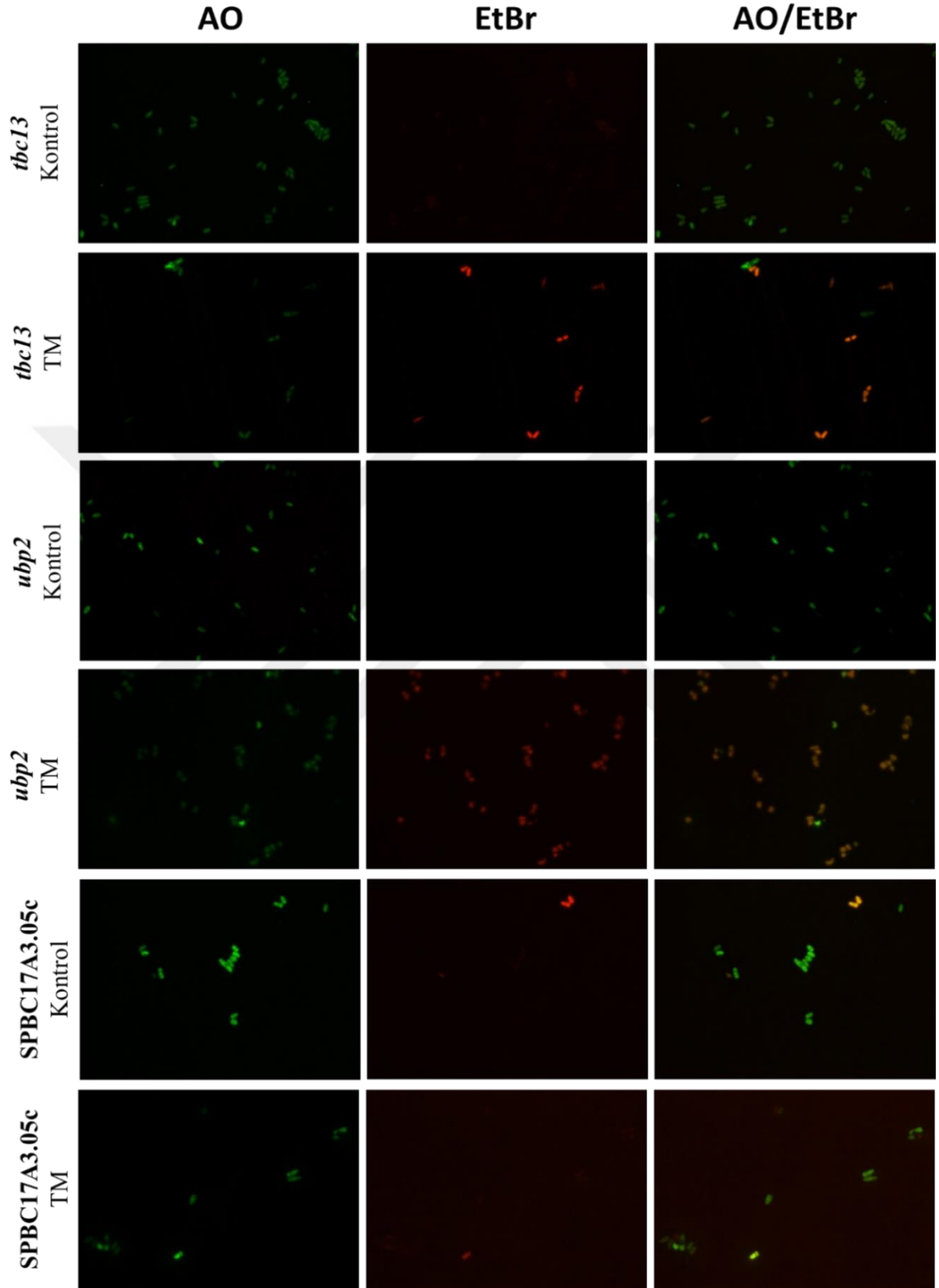
Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



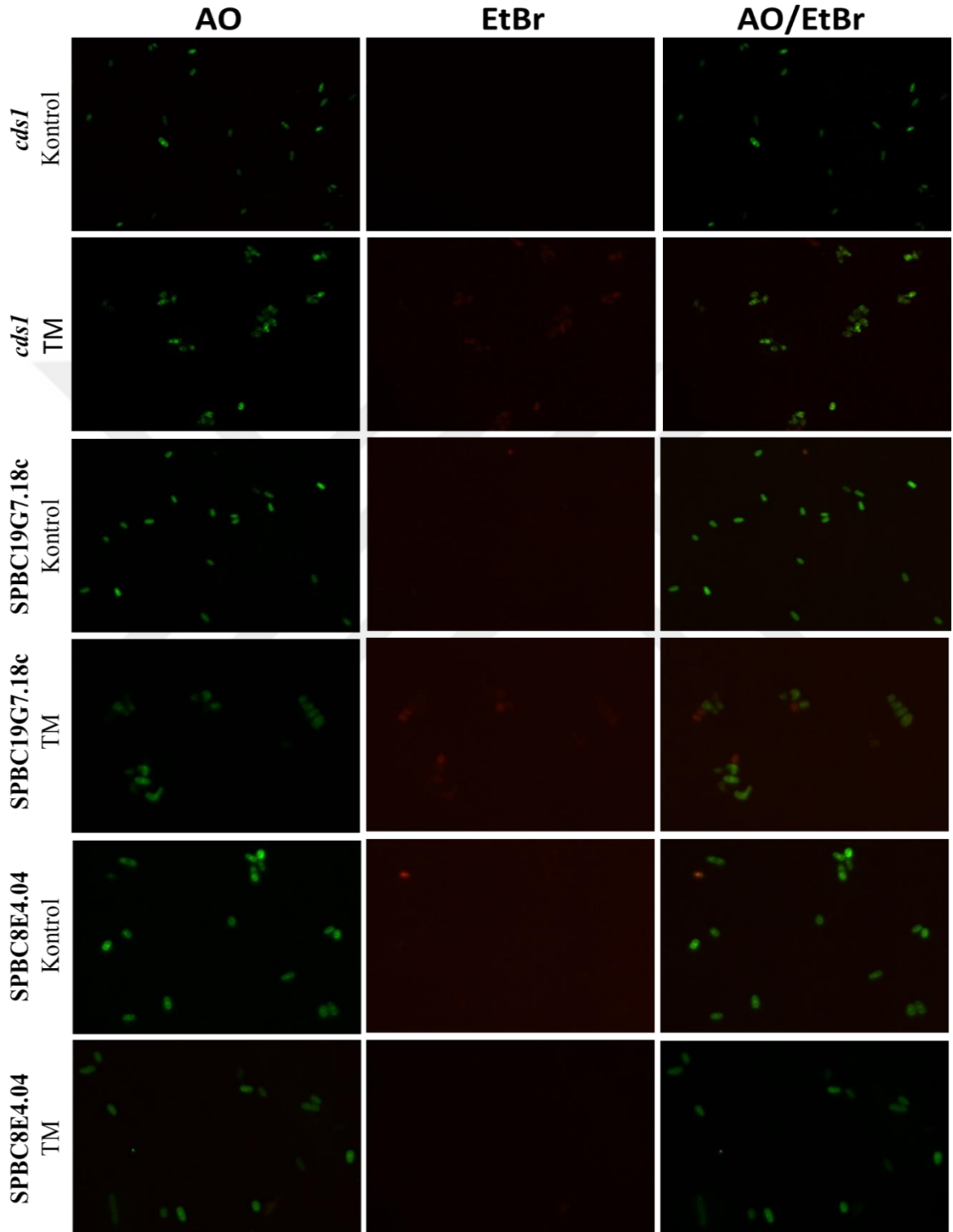
Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 µm'dir).



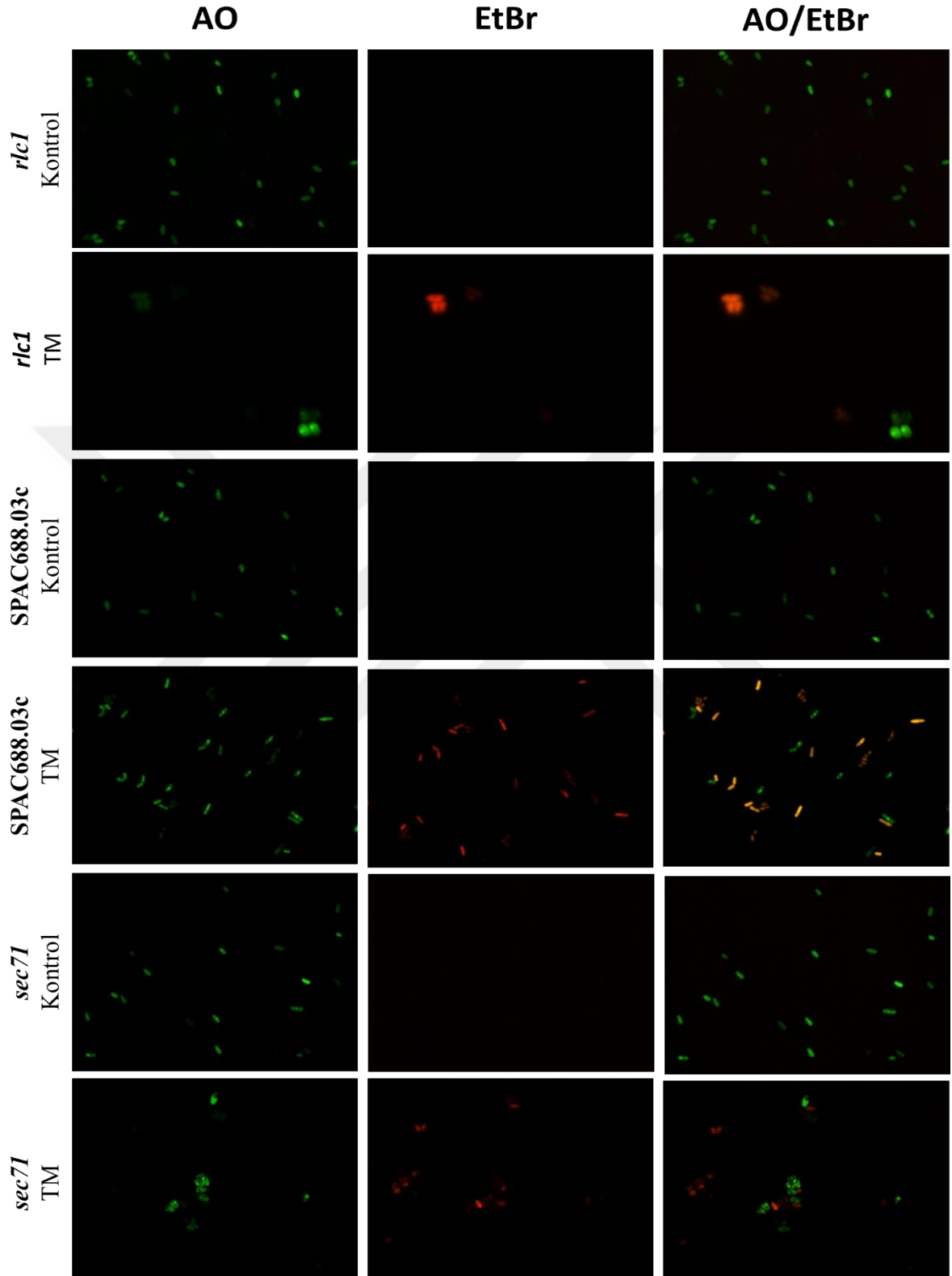
Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 µm'dir).



Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).

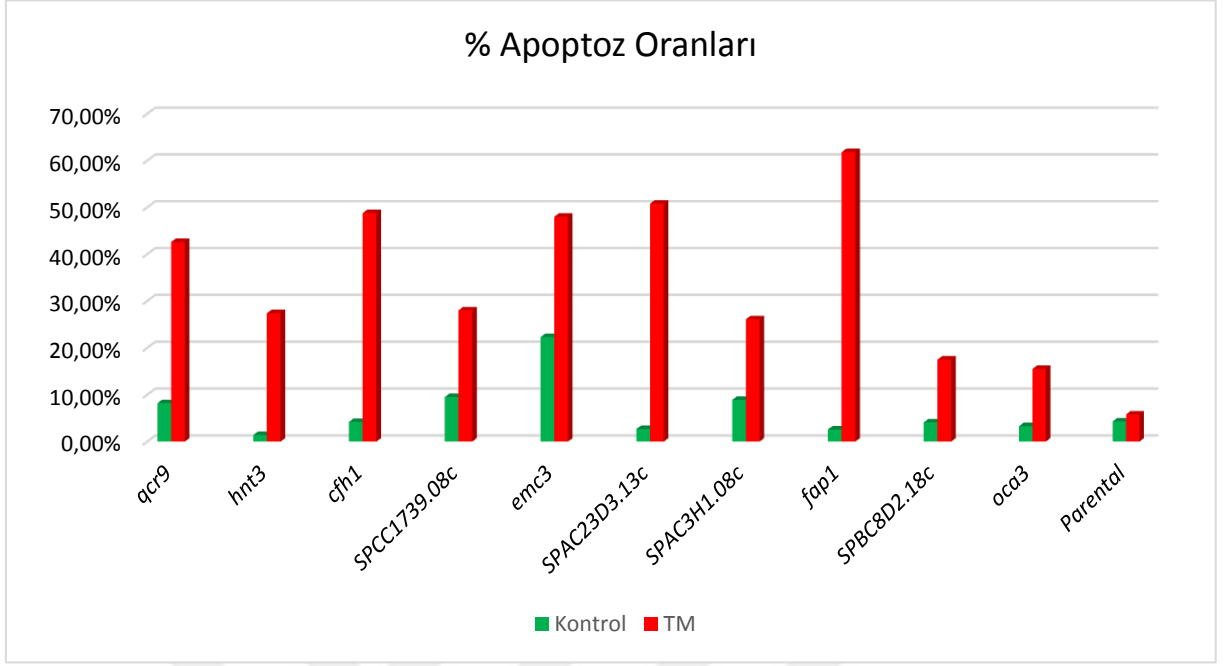


Şekil 4.8 (devam): Tunikamisine dirençli tüm grupların AO/EtBr boyama görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).

Başlangıçta eşit sayıda hücre ile başlatılan kültürlerin 24. saat sonundaki üreme ve sağkalım farklılıkları tespit edildi. AO/EtBr boyama deneyinde, tunikamisine dirençli tüm grupların birim alandaki kontrol ve tunikamisin eklenmiş besi ortamındaki hücre grupları sayıldıktan sonra apoptotik hücreler belirlendi. Tunikamisli besi ortamında üreyen mutant ırklar arasında hem apoptotik hücre bakımından hem de üreme miktarı bakımından farklılıklar tespit edildi. Buna göre, deney gruplarında, tunikamisine yüksek direnç gösteren hücrelerde, tunikamisine düşük direnç gösteren ırklara göre daha fazla üreme gözlemlendi. Ayrıca, tunikamisinli besi ortamında üretilen tüm grupların kontrol gruplarına kıyasla daha çok apoptoza uğradığı belirlendi.

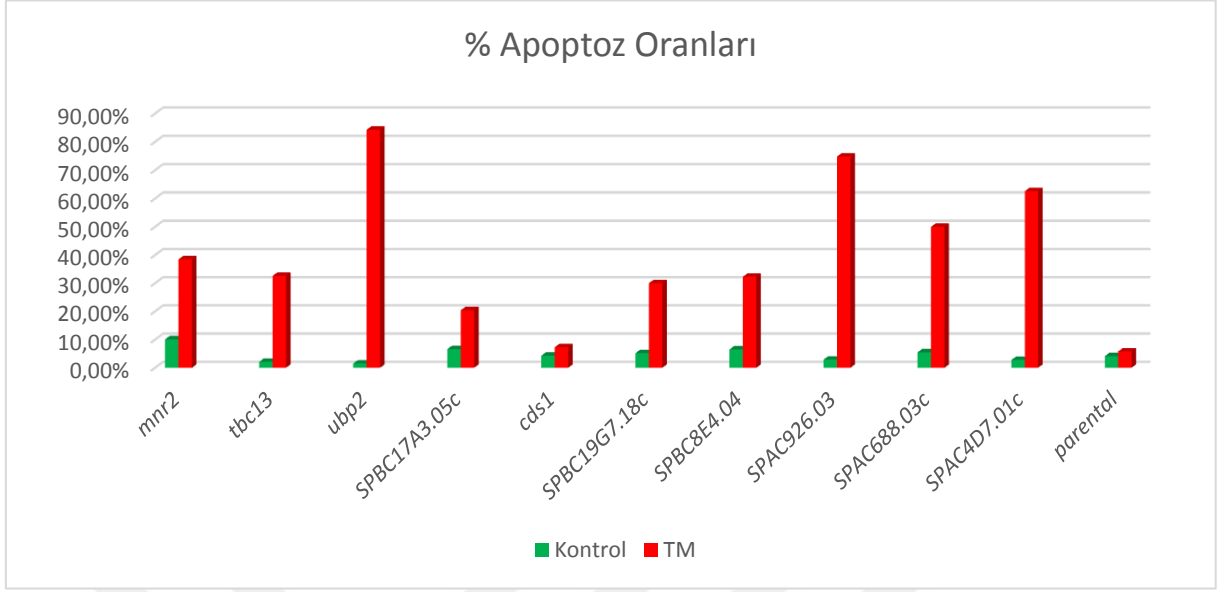
Çalışmada kullanılan tunikamisine dirençli ve dirençsiz tüm ırkların apoptoz oranlarını belirleyebilmek için her bir örnek için üç tekrarlı olarak farklı alanlardan alınan floresans görüntülerdeki tüm hücreler içerisindeki apoptotik hücreler tek tek sayılarak ortalamaları alındı. Aynı gen delesyonlu ırka ait verilerin yüzdesel apoptoz oranları kıyaslandı (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10) ve kontrol gruplarına göre deney gruplarında daha çok apoptoza uğramış hücreler olduğu tespit edildi.

S. pombe qcr9, cfh1, hnt3, SPCC1739.08c, emc3, SPAC23D3.13c, SPAC3H1.08c, fap1, SPBCD2.18c ve oca3 mutantlarının tunikamisine maruz kaldıktan sonra deney gruplarının tümünde kontrollerine göre apoptotik hücre sayılarının daha çok olduğu tespit edildi. Bu mutantlardan en çok apoptoza uğrayan grup olan *S. pombe fap1*'de yaklaşık 6 kat; *SPAC23D3.13c* ve *cfh1*'de 5 kat; *qcr9* ve *hnt3*'te yaklaşık 3-4 kat; *SPCC1739.08c, emc3, SPAC3H1.08c, SPBCD2.18c* ve *oca3* mutantlarında yaklaşık 2-3 kat seviyelerinde gözlenen apoptotik hücre miktarı istatistiki olarak da anlamlı bulundu. Tunikamisin uygulanan *S. pombe* parental ırkında ise kontrole göre apoptotik hücre miktarında çok fazla bir değişiklik belirlenmedi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Tunikamisine yüksek dirençli olan mutant ırklara ait kontrol ve deney gruplarındaki apoptoz oranları (%).

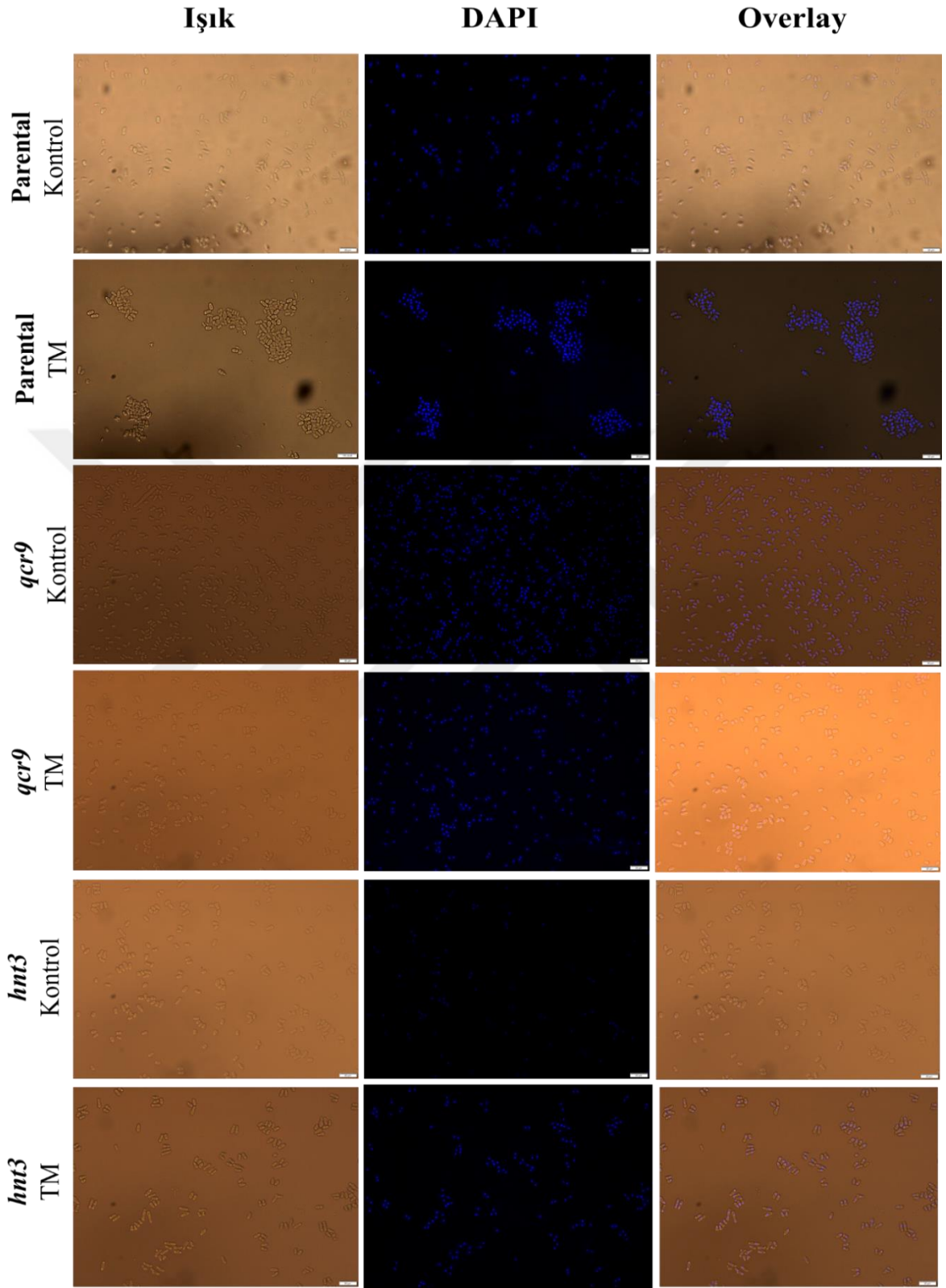
S. pombe *mnr2*, *tbc13*, *ubp2*, SPBC17A3.05c, *cds1*, SPBC19G7.18c, SPBC8E4.04, *rlc1*, SPAC688.03c mutantlarının tunikamisine maruz kaldıktan sonra deney gruplarının tümünde kontrollerine göre apoptotik hücre sayılarının daha çok olduğu tespit edildi. Bu mutantlardan en çok apoptoza uğrayan gruplar olan *S. pombe* *ubp2* ve *rlc1* mutantlarında yaklaşık 7-8 kat; *sec71* mutantında yaklaşık 6 kat; *mnr2* ve SPAC688.03c mutantlarında yaklaşık 4-5 kat; *tbc13*, SPBC19G7.18c, SPBC8E4.04 ve SPBC17A3.05c mutantlarında yaklaşık 2-3 kat seviyelerinde gözlenen apoptotik hücre miktarı istatistiki olarak da anlamlı bulundu. Tunikamisin uygulanan *S. pombe* *cds1* ırkında ise kontrole göre apoptotik hücre miktarında çok fazla bir değişiklik belirlenmedi (Şekil 4.10).



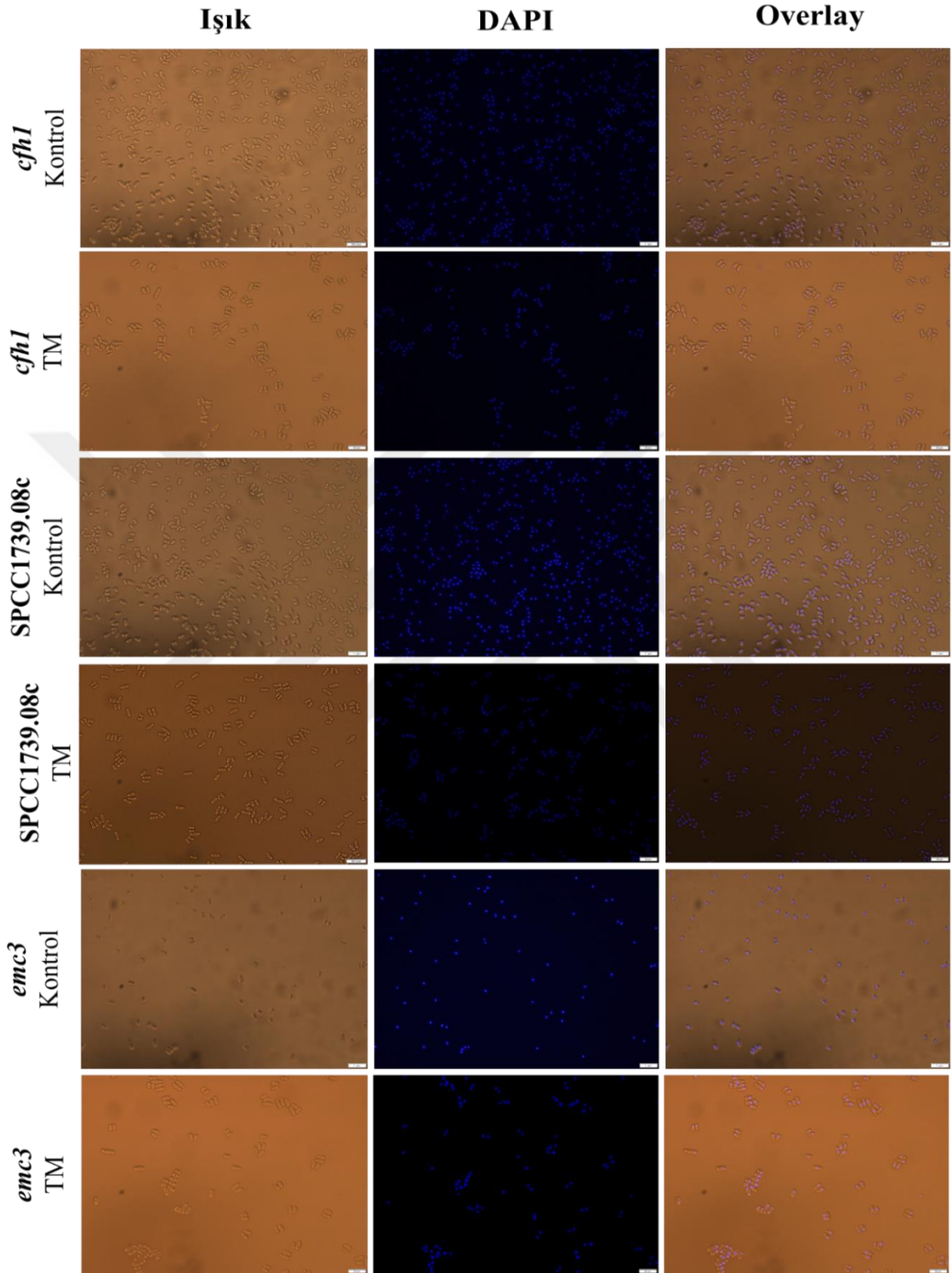
Şekil 4.10: Tunikamisine orta ve düşük dirençli mutant ırklara ait kontrol ve deney gruplarındaki apoptoz oranları (%).

4.6. TUNİKAMİSİNİN HÜCRE MORFOLOJİSİNE ETKİSİ

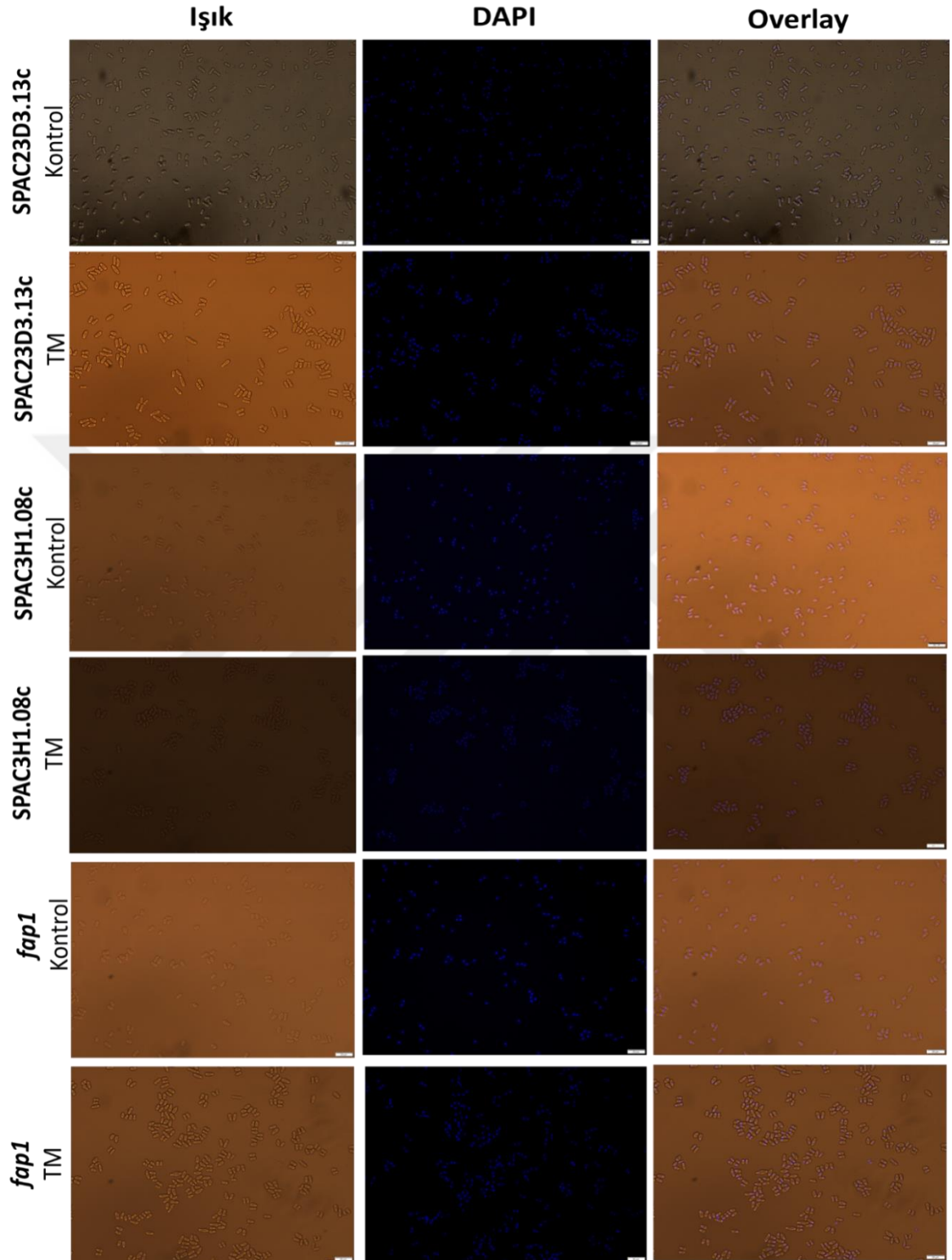
Tunikamisine ile indüklenen ER stresinin hücre morfolojisi ve nukleus üzerindeki etkisini ölçmek için Bölüm 3.9’da anlatıldığı gibi tüm ırkların kontrol ve deney gruplarına ait hücre örnekleri DAPI ile boyandıktan sonra floresan mikroskopta görüntüleri alındı. Burada, tunikamisine yüksek, orta ve düşük direnç gösteren ırklara ait *S. pombe* mutant ırkları ile parental ırkın kontrol ve deney gruplarının toplam hücre sayıları, morfolojileri ve nukleus yapılarındaki farklılıkları Şekil 4.11 ve 4.12’de verildi. Tunikamisinli besi ortamında üretilen ırklara ait hücrelerin nukleuslarında ve hücrenin genel morfolojisinde yapısal bozulmalar ve değişiklikler görüldü (Şekil 4.11 ve 4.12).



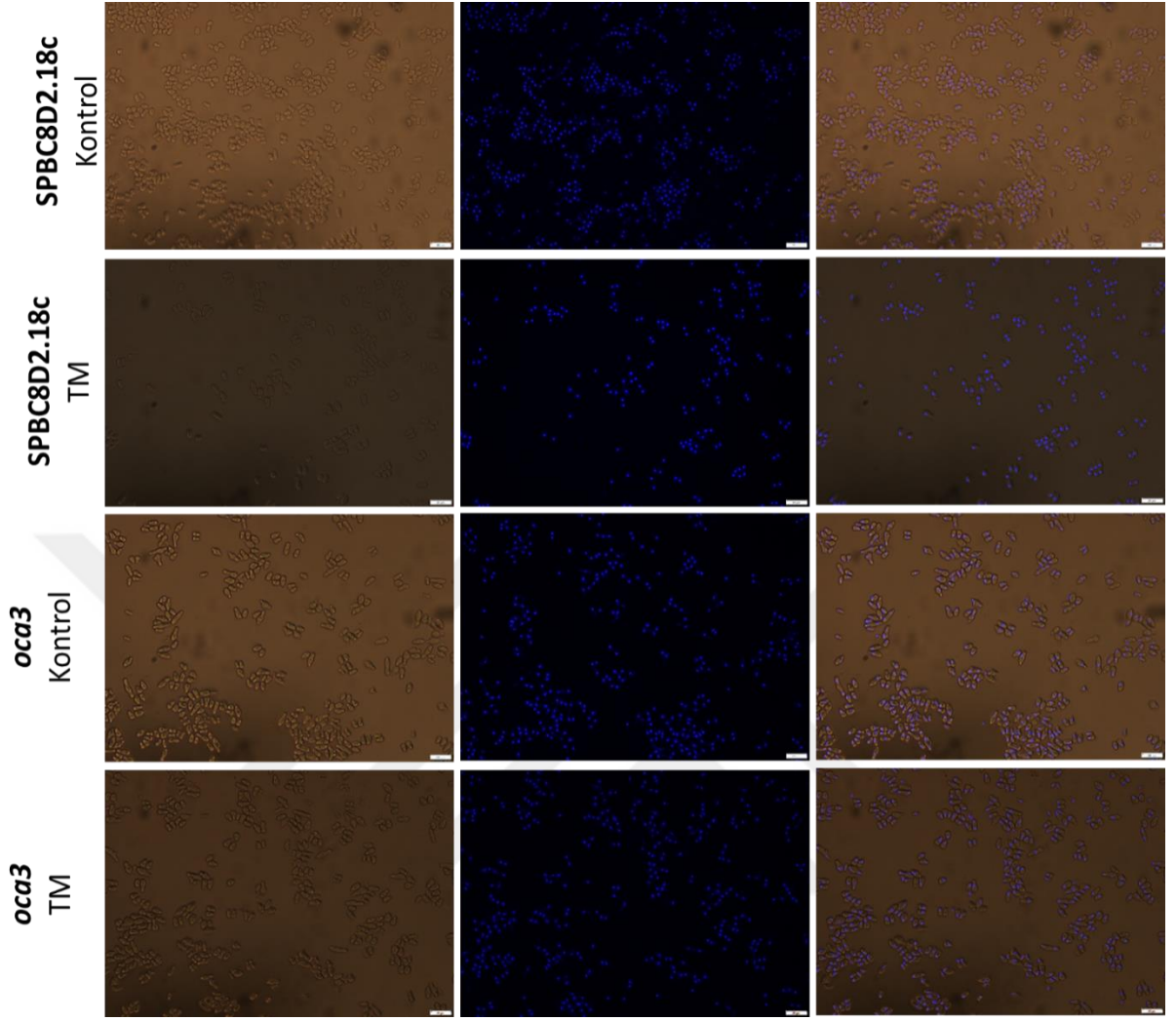
Şekil 4.11: Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nükleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.11 (devam): Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nükleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.11 (devam): Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nükleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



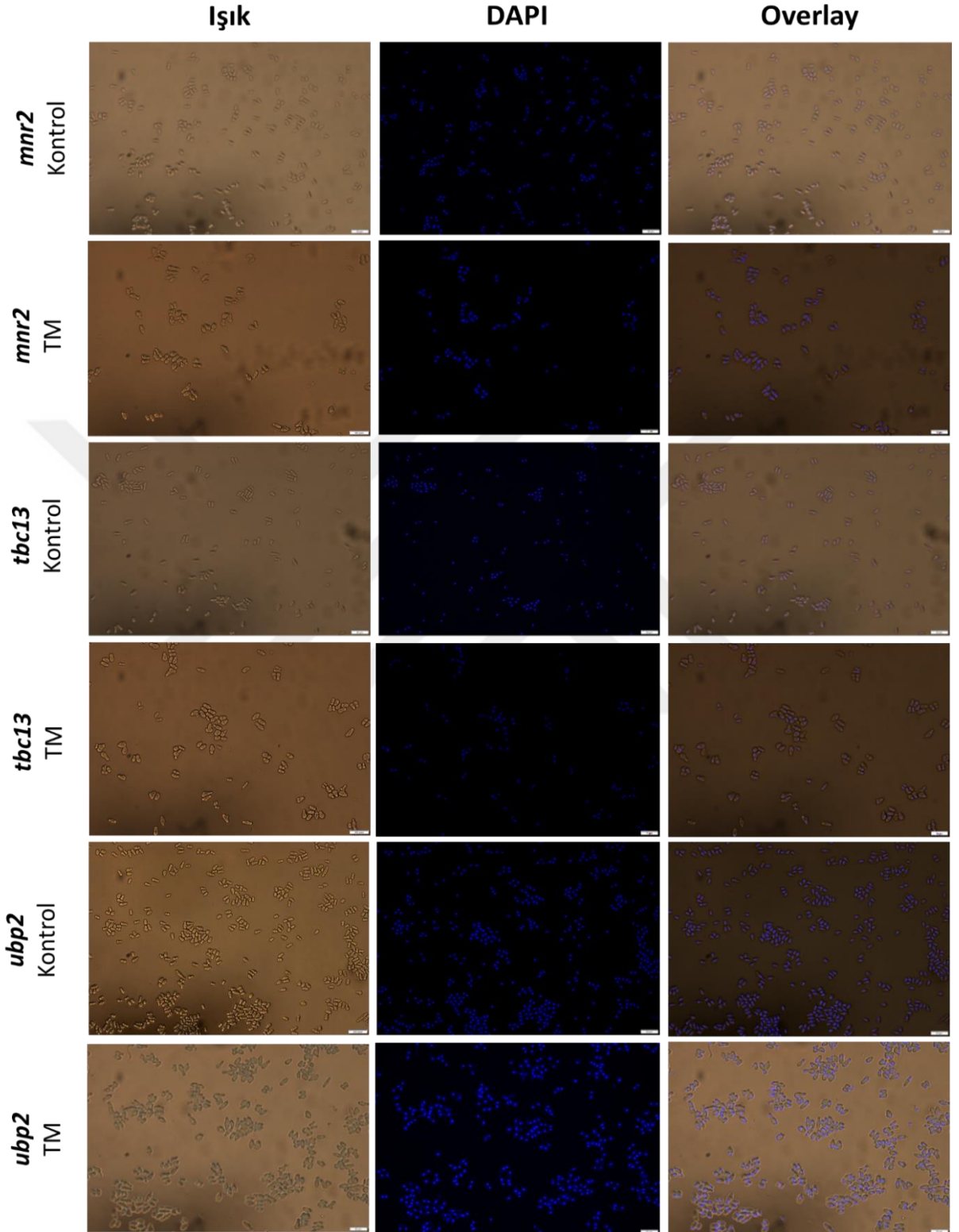
Şekil 4.11 (devam): Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nükleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).

Tablo 4.6: Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası hücresel farklılıkları.

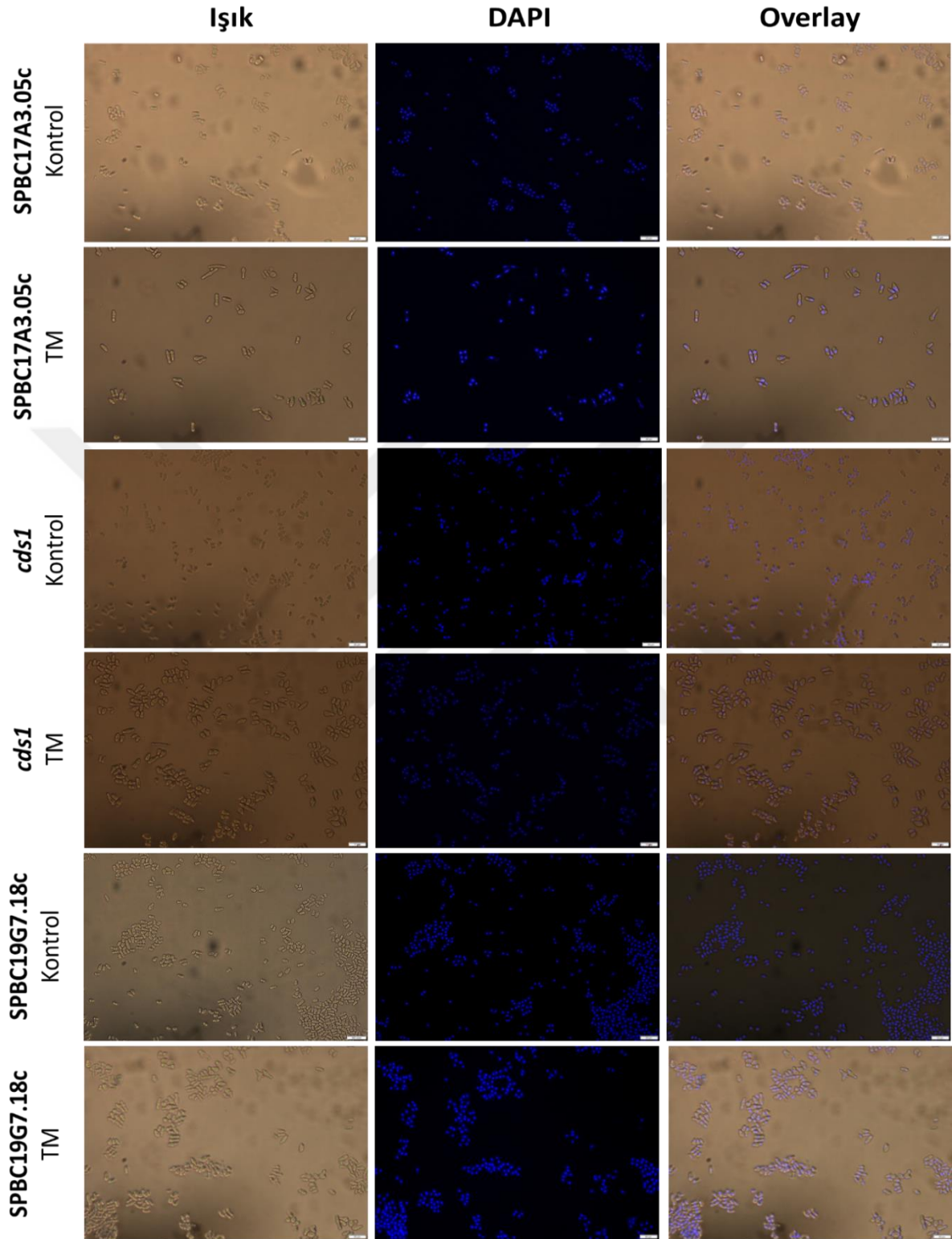
		Hücre Morfolojisi	Nükleusun Konumu	Nükleusun yapısı
Parental	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	normal, hücreler arası agregat oluşumu	hücre merkezi	normal
<i>qcr9</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	normal	hücre merkezi	normal

Tablo 4.6 (devam): Tunikamisine yüksek direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası hücresel farklılıkları.

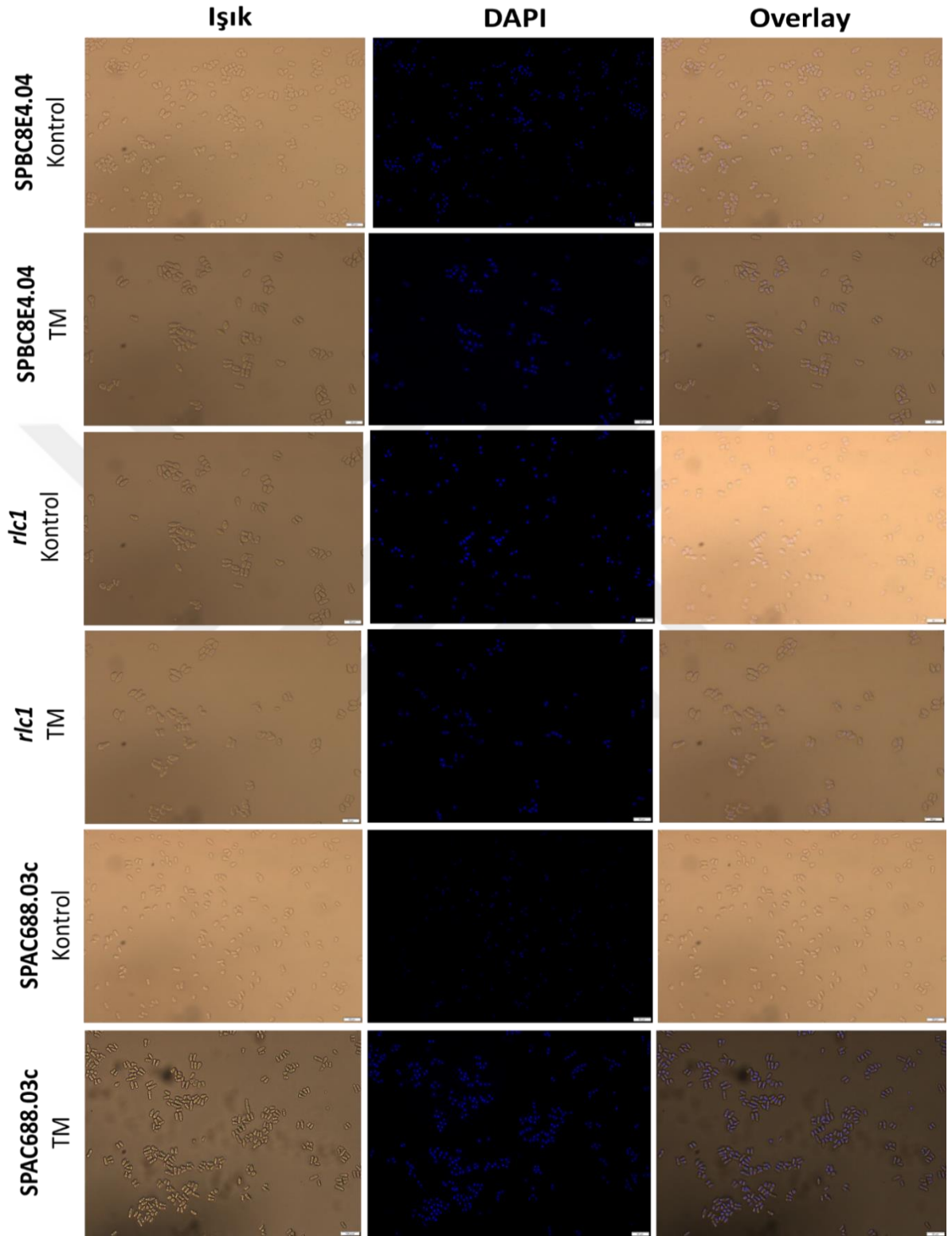
<i>hnt3</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha uzun	hücre merkezi	normal
<i>cfh1</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	normal	kutba yakın	normal
SPCC1739.08c	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha uzun	kutba yakın	çok sayıda çift nukleuslu hücre
<i>emc3</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	normal	kutba yakın	bozuk
SPAC23D3.13c	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha uzun	kutba yakın	çok sayıda çift nukleuslu hücre
SPAC3H1.08c	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	şişmiş hücreler	hücre merkezi	normal
<i>fap1</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha uzun ve koni şeklinde yapı	kutba yakın	normal
SPBC8D2.18c	K	şekilsiz ve kısa hücre yapısı	kutba yakın	normal
	TM	daha korunmuş hücre yapısı	kutba yakın	normal
<i>oca3</i>	K	bozuk	kutba yakın	iki nukleuslu hücreler çoğunlukta
	TM	bozuk	kutba yakın	bulanık



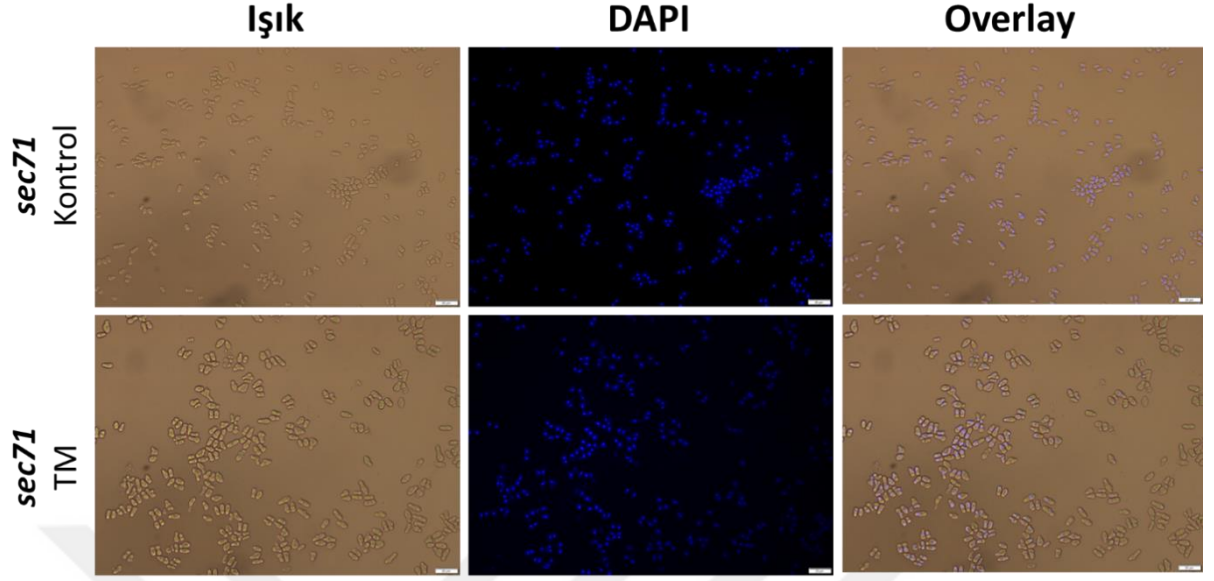
Şekil 4.12: Tunikamisine orta ve düşük direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nükleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.12 (devam): Tunikamisine orta ve düşük direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nukleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.12 (devam): Tunikamisine orta ve düşük direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nukleus görüntüleri (TM: Tunikamisin. Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).



Şekil 4.12 (devam): Tunikamisine orta ve düşük direnç gösteren ırkların ve parental ırkın DAPI boyaması sonrası nukleus görüntüleri (TM: Tunikamisin, Her bir fotoğrafın boyutu 20 μm 'dir).

Tablo 4.7: Tunikamisine düşük direnç gösteren ırkların DAPI boyaması sonrası hücresel farklılıkları.

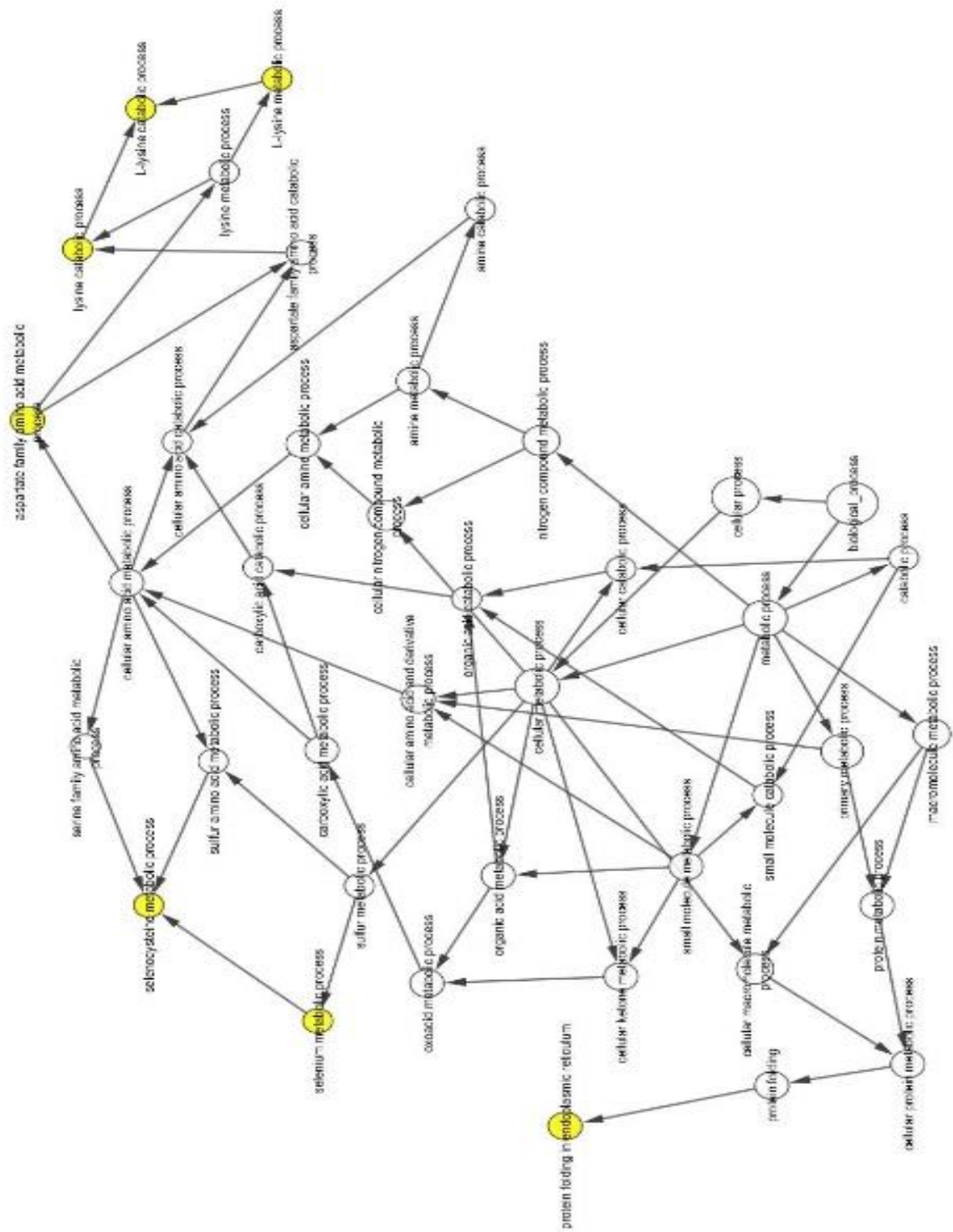
		Hücre Morfolojisi	Nukleusun Konumu	Nukleusun yapısı
<i>mnr2</i>	K	bozuk	hücre merkezi	normal
	TM	daha bozuk	hücre merkezi	bulanık
<i>tbc13</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	şişe ve üçgen şekillere benzer yapı	hücre merkezi	bulanık
<i>ubp2</i>	K	zayıf hücre yapısı	hücre merkezi	normal
	TM	şişe ve üçgen şekillere benzer yapı	kutba yakın	bulanık
SPBC17A3.05c	K	normal	kutba yakın	normal
	TM	daha uzun ve şekilsiz	kutba yakın	bulanık
<i>cds1</i>	K	daha küçük hücre yapısı	hücre merkezi	normal
	TM	bozulmuş hücre yapısı	kutba yakın	bulanık

Tablo 4.7 (devam): Tunikamisine düşük direnç gösteren ırkların DAPI boyaması sonrası hücresel farklılıkları.

SPBC19G7.18c	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	bozuk	kutba yakın	bulanık
SPBC8E4.04	K	normal	kutba yakın	normal
	TM	daha büyük	kutba yakın	bulanık
<i>rlc1</i>	K	bozuk	hücre merkezi	normal
	TM	bozuk ve daha büyük	kutba yakın	bulanık
SPAC688.03c	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha uzun	hücre merkezi	çok sayıda iki nukleuslu hücre yapısı
<i>sec71</i>	K	normal	hücre merkezi	normal
	TM	daha büyük ve koni şeklinde yapı	hücre merkezi	bulanık

4.7. TUNİKAMİSİNE YÜKSEK DİRENÇLİLİK SAĞLAYAN GENLERİN BİYOLOJİK SÜREÇLERDEKİ ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Tunikamisine dirençli olduğunu tespit ettiğimiz organizmaların birbirleri ile ilişkisi BiNGO (Biological Networks Gene Ontology) programında incelenerek Şekil 4.13'te verilen genler arasındaki ortak biyolojik fonksiyonlar ve ilişkiler gözlemlendi. SPBC15C4.01c (*oca3*) ve SPBC1711.03 (*emc3*) şuşlarının her ikisi de ER'de protein katlamalarında görev almaktadır. SPBC354.15 (*fap1*) ve SPBC8D2.18c şuşları, aspartat ailesi aminoasit metabolizmasında görev aldığı bilinmektedir.



Şekil 4.13 : Tunikamisine yüksek direnç gösteren 10 ayrı ırk arasındaki ilişki.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tunikamisinin ökaryotik hücrelerde N-glikan sentezini bloke ederek ER stresine neden olduğu, hücre bölünmesini inhibe ettiği ve hücreleri apoptoza sürüklediği bilinmektedir (Xiao ve diğ., 2016). Organizmaların tunikamisin antibiyotiğine maruz kaldıktan sonra meydana gelen ER stresi nedeniyle programlanmış hücre ölümüne gittiği bilinse de ER stresi kaynaklı apoptozis hakkındaki bilgiler her soruya tam olarak cevap verebilecek yeterlilikte değildir. Hücrenin apoptotik sürece girmesi ve bunu sağlayan mekanizmaya ait kontrolündeki mekanizmayla mı veya birkaç pro-apoptotik yolla mı olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Kaspazlardan hangilerinin ER stres kaynaklı hücre ölümü ile ilişkisinin olup olmadığı da henüz aydınlatılabilmiş değildir. Proteinlerin yanlış katlanmış formlarını tanımlamada kullanılan belirgin özellikler ve protein yarı ömürlerini düzenlemedeki mekanizmalar hakkındaki bilgiler henüz oldukça kısıtlıdır (Smith ve diğ., 2011).

Çalışmada, parental ırk olarak kullanılan *S. pombe* ED666 ırkında (h+ade6-M210 ura4-D18 leu1-32) yarı öldürücü doz seviyesinde tunikamisin antibiyotiği muamele edilen ve 24 saat üretilen hücrelerin kontrol grubunun deney grubuna göre daha fazla yoğunlukta olduğu görülmüştür. Apoptoz miktarı açısından ele alındığında her iki grupta da apoptotik hücre miktarı açısından ciddi bir fark görülmemesi bu genlerin tunikamisine direnç gösterme açısından etkin bir rol oynamadığını göstermektedir. Parental hücrelerde ROT miktarına bakıldığında kontrol ve deney grupları arasında da önemli bir fark gözlemlenmemesi bu genlerin hücresel reaktif oksijen üretiminde etkin bir rol almadığını göstermektedir. Ayrıca hem kontrol hem de tunikamisin içeren besi ortamında üretilen iki grupta da hücre yapılarının normal olması, tunikamisin yarı öldürücü dozunun parental hücre için hücre şekillerinde etkisinin olmadığını göstermektedir.

Araştırmada kullanılan genlerden biri olan *qcr9* geni bakımından delesyonlu *S. pombe* mutantlarının tunikamisin bulunan besi ortamında üreyenlerde kontrol hücrelerine kıyasla daha çok apoptotik hücre görülmesi ve spot ekimler dikkate alınarak değerlendirildiğinde deney grubundaki canlı hücre sayısının kontrole göre daha az olması bu genin canlılık üzerine etkisinin bir göstergesi sayılabilmektedir. ER’de meydana gelen apoptoz olayında mitokondride rol oynayan *qcr9* geninin delesyonlu mutantında elde edilen bu sonuçlar ER-

mitokondri ilişkisini de açıkça gözler önüne sermektedir (Phillips ve diğ., 2016). ATP sentazını, özellikle NARP (nöropati, ataksi ve retinitis pigmentosa) sendromunu etkileyen insan kalıtsal mitokondriyal hastalıklarına karşı aktif ilaçların taranması çalışmalarında *S.pombe*'lerdeki *qcr9* geninin *S. cerevisiae*'daki ortoloğu (*QCR9* geni) kullanılmıştır (Couplana ve diğ., 2011). Hücre içi oksidasyon miktarına ait istatistiksel verilerin anlamlı bulunduğu bu ırkta, deney gruplarında kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi tunikamisinin mitokondride elektron transfer mekanizmasını bozarak hücre fonksiyonunu olumsuz etkilediğini göstermektedir. Ancak buna rağmen hücre şekillerinin her iki grupta da normal ve nukleusların hücre merkezi olması hücre morfolojik yapının korunduğunu ortaya koymaktadır.

hnt3 geni (Daley ve diğ., 2010) bakımından delesyonlu deney grubu hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine oranla daha fazla apoptotik hücre görülmesi ve spot ekimlere bakıldığında deney grubunun daha az üreme göstermesi, hücrelerin canlılığı hakkında fikir verebilmektedir. Deney grubundaki hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre daha çok reaktif oksijen birikmesi ve hücrelerin morfolojik olarak daha uzun olması, DNA onarımı gerçekleşmeyen mutantlarda tunikamisinin hücre fonksiyonları değiştirdiğini düşündürmektedir. Kontrol grubundaki hücre şekillerinin normal yapılarda iken, deney grubundakilerin daha uzun hücre şekillerine sahip olması tunikamisinin hücrenin morfolojik yapısını bozduğunu göstermektedir.

cfh1 geninin *S. pombe*'de fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Hücrede ER stresine neden olan tunikamisin antibiyotiğine maruz bırakılan deney grubundaki hücrelerde kontrol hücrelerine kıyasla daha fazla apoptoz görülmesi hücre canlılığında önemli bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel açıdan da oldukça anlamlı bulunan bu ırkta daha yüksek oranda reaktif oksijen birikimi görülmesi, tunikamisin ile muamele edilmiş hücrelerde hücre duvarı bütünlüğünde rol aldığı düşünülen bu genin fonksiyonunu aydınlatmaya katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Nukleusların kontrol grubunda hücre merkezinde iken deney grubunda kutba daha yakın bölgede konumlandığı fakat hücre morfolojik yapının bozulmadığı görülmüştür. Spot ekim görüntüleri değerlendirildiğinde deney grubuna kıyasla kontrol grubundaki hücrelerde daha fazla canlı hücre görülmesi, bu genin hücre canlılığı üzerindeki etkisini gösterdi.

SPCC1739.08c geni bakımından delesyonlu ırkların deney grubundaki apoptoz miktarının kontrol grubuna kıyasla kadar fazla olması, hücre içi oksidasyon miktarına bakıldığında kontrol grubuna göre daha çok reaktif oksijen birikimi görülmesi ve spot ekim görüntülerinde tunikamisin ile muamele olmuş kültürlerin daha az yoğunlukta bulunması hücre canlılık hakkında fikir vermektedir. Kontrol grubuna ait hücreler normal morfolojik yapıya sahip, ayrıca nukleusları hücre merkezinde konumlanmış durumdadır fakat deney grubuna ait hücreler daha uzun, nukleus kutba yakın ve çok fazla sayıda çift nukleuslu hücreler bulunmaktadır. Hücrelerin uzun, nukleusların kutba yakın ve çift sayıda olması hücrelerin bölünmek üzere olduğu veya bölünemediği için bu formda kaldıklarını düşündürmektedir.

emc3 geni bakımından delesyonlu olan mutant *S. pombe* ırklarında hücre üremesi bakımından çok düşük bir fark görülmesi, bu genin hücre üremesinde çok etkili olmadığını düşündürmüş olup apoptotik hücre miktarı olarak bakıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücreler bulunması hücre canlılığını etkileyen bir rolü üstlendiğini göstermiştir. Deney gruplarındaki kontrol grubuna göre daha yüksek oranda reaktif oksijen birikimi görülmesi ve nukleusun kutba daha yakın bulunması tunikamisinin hücrede oluşturduğu stresi göstermektedir. Hem deney hem de kontrol hücrelerinin morfolojileri değişmemiştir ancak kontrol grubunda nukleus hücre merkezinde yer almış durumda iken deney grubunda kutba yakındır. Ayrıca spot ekimler incelendiğinde tunikamisinli besi ortamında üretilen kültürlerin tunikamisin eklenmemiş besi ortamında üretilenlere kıyasla daha az üremesi, tunikamisinin hücre canlılığına etkisi hakkında bir ön bilgi vermektedir.

SPAC23D3.13c geninin delesyonlu olduğu ırklar tunikamisin içeren besi ortamında üretildiğinde kontrol grubuna göre apoptotik hücrelerin daha fazla bulunması, bu genin hücre canlılığında önemli bir rolü üstlendiğini gösterdi. Spot ekim görüntülerine bakıldığında, kontrol grubundaki hücrelerin deney grubuna ait kültürlerden daha çok üremiş olması hücre canlılığının göstergesi olarak düşünülebilmektedir. Deney gruplarında kontrol grubuna göre fazla reaktif oksijen bulunması ve bunun istatistiki açıdan da anlamlı olması, tunikamisinin hücre fonksiyonunu etkilediğini göstermektedir.

SPAC3H1.08c geni bakımından delesyonlu olan ırklarda kontrol ve deney grupları apoptoz miktarı açısından karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre yüksek oranda apoptotik hücre gözlemlenmiş olması bu genin, hücre ölümündeki rolünü göstermektedir. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarına bakıldığında, kontrol grubuna göre daha

çok reaktif oksijenin birikmesi ve aynı zamanda hücrelerin daha büyük ve şişmiş yapıda olması tunikamisinin hücresel yapıyı bozduğunu göstermektedir. Spot ekimler dikkate alınarak değerlendirildiğinde canlı hücre sayısının kontrol grubuna kıyasla deney grubunda daha az görülmesi, canlılık üzerine etkisi hakkında bilgi vermektedir.

fap1 geni bakımından delesyonlu mutantların deney gruplarında apoptoz miktarı açısından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre daha yüksek oranda apoptotik hücre gözlemlenmiş olması bu genin, hücre canlılığında etkin bir rolü olduğunu göstermiştir. Hücrelerin spot ekimleri dikkate alındığında, kontrol gruplarının tunikamisinli besi ortamında üretilen deney gruplarına kıyasla daha fazla üremiş olmaları hücrelerin canlılığı ve çoğalmaları hakkında ön bilgi oluşturdu. Ayrıca deney grubunda hücre içi oksidasyon miktarının yüksek olması, aynı zamanda kontrol grubunda normal yapıda iken deney grubunda daha uzun ve koni şeklinde bir hücre morfolojisinde bulunması ve nukleusun kutba yakın konumlanması tunikamisinin yarattığı hücresel stresi gösterdi.

SPBC8D2.18c geni bakımından delesyonlu ırklarda kontrol ve deney grupları apoptoz oranı açısından karşılaştırıldığında deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücre gözlemlendi. Spot ekimlerde kontrol grubundakilerin deney grubu kültürlerden daha yoğun olmaları, bu genin canlılık üzerine etkisinin bir göstergesi sayılabileceğini göstermektedir. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel açıdan da anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre reaktif oksijen birikimi görülmesi tunikamisinin hücre fonksiyonunu bozduğunu işaret etmektedir. Diğer genlerin aksine kontrol grubundaki hücrelerin deney grubundakilere kıyasla daha şekilsiz ve kısa bulunması ve ayrıca nukleusların hücre kutbuna yakın lokalizasyonda bulunması, SPBC8D2.18c geninin hücre morfolojisi bakımından oldukça önemli olduğunu düşündürmektedir. Metil metabolizma yolğunın bloke edilmesiyle hücrelerde oksidatif stres oluştuğu ve morfolojik yapılarının bozulduğu görülmektedir.

oca3 bakımından delesyonlu ırklarda kontrol ve deney grupları apoptoz miktarı açısından ele alındığında, deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre bulunması, bu genin hücre canlılığında etkin bir rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiki açıdan da anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre daha çok reaktif oksijen birikimi görülmesi tunikamisinin hücre fonksiyonunu değiştirdiğini işaret etmektedir. Ayrıca hem kontrol hem de deney grubunda hücre

morfolojisinin bozuk ve nukleusun kutba yakın olması, protein katlanma mekanizmalarının hücresel metabolizmadaki rolünü gösterdi. Spot ekimler karşılaştırıldığında deney grubundakilerin kontrol grubundan daha az üremesi, tunikamisin hücre canlılığındaki etkisinin göstergesi sayılabilmektedir.

mnr2 geni bakımından delesyonlu ırklar apoptoz miktarı açısından ele alındığında deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla apoptotik hücre bulunması bu genin, hücre canlılığında etkin bir rolü olduğunu göstermektedir. Reaktif oksijen türleri açısından deney grubu ile kontrol grubu arasında az fark olması, tunikamisinin *mnr2* bakımından delesyonlu ırklarda hücresel reaktif oksijen miktarını çok fazla etkilemediğini göstermektedir. Ancak deney grubu hücrelerinin kontrol grubundakilere göre daha bozuk şekillerde olması, hücrede Mg^{+2} transportu üzerinde rol alan bu genin delesyonlu olduğu durumda, hücre morfolojisinin bozulmasına neden olduğunu göstermektedir. Kontrol ve deney grubuna ait spot ekimler karşılaştırıldığında tunikamisinli besi ortamında üretilmiş olan deney grubunun daha az üremesi, hücre canlılığı üzerine etkisinin bir göstergesi sayılabilmektedir.

tbc13 geni bakımından delesyonlu ırklarda apoptoz miktarına bakıldığında deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre görüldüğünden dolayı bu genin, hücre canlılığında etkin bir rolü olduğunu göstermiştir. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel olarak anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi, ayrıca kontrol grubunda normal yapıda iken deney grubuna ait hücrelerin şişe ve üçgen şekillere benzer yapılarda olması nedeniyle, *tbc13* geninin hücresel metabolizma ve özellikle morfolojik yapının korunması için oldukça önemli olduğunu ifade etmektedir. Spot ekimlerde kontrol grubu hücrelerinin daha fazla üremiş olması, tunikamisinin hücre canlılığında etkisini daha da destekler niteliktedir.

ubp2 geni bakımından delesyonlu ırklar apoptoz miktarı açısından ele alındığında; deney grubunda kontrol grubuna kıyasla çok fazla apoptotik hücre bulunması, hücre canlılığındaki önemli rolü olduğunu kanıtlamaktadır. *ubp2* geni bakımından delesyonlu olan *S. pombe*'ler tunikamisinli besi ortamında üretildiğinde hücrelerin şekilleri oldukça bozulmakta ve nukleus kutba yakın lokalize olmaktadır. *ubp2* geninin delesyonlu olduğu hücreler tunikamisinli besi ortamında bulunduğunda, hücre morfolojilerinin oldukça değiştiği ve hücrelerin bu stresten çok fazla etkilendiği görüldü. Ayrıca deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel açıdan oldukça anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre hücresel reaktif

oksijen miktarının ciddi miktarda artması, bu genin ROT metabolizmasındaki rolünü göstermektedir. Spot ekimlerde bu gene ait kontrol grubunda deney grubuna kıyasla canlı hücre sayısının daha çok bulunması, tunikamisinin hücre canlılığına etkisini göstermektedir.

SPBC17A3.05c geni bakımından delesyonlu ırklarda apoptoz miktarları karşılaştırıldığında, deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre görüldü. Hücre içi oksidasyon miktarının istatistiki açıdan anlamlı bulunması ve kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikmesi, hücrelerin daha uzun ve şekilsiz yapılarda görülmesi, tunikamisinin hücrel metabolizmayı olumsuz etkileyerek ER stresine neden olduğunu düşündürdü. Tunikamisinin deney gruplarına ait hücrelerde protein katlanmalarının bozularak hücrelerin üremelerinin azalttığı, apoptoz oranını artırdığı ve hücrel metabolizmayı bozduğu görülmüştür. Ayrıca spot ekimlere bakıldığında kontrol grubundaki canlı hücre sayısının deney grubuna göre daha yoğun olması, hücre canlılığına etkisinin bir göstergesi olabileceği sanılmaktadır.

cds1 geni bakımından delesyonlu ırklarda hücre içi oksidasyon miktarının istatistiki açıdan anlamlı bulunması, deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi, daha bozulmuş hücre yapılarının bulunması ve nukleusun kutba yakın konumlanması, uygulanan stres faktörü tunikamisinin hücreleri oldukça etkilediğianca apoptoza yönlendirmediğini gösterdi. Spot ekimlerde deney grubu hücrelerin kontrol grubuna göre daha az yoğunlukta üremesi, tunikamisinin hücre çoğalması konusunda fikir verebilmektedir.

SPBC19G7.18c geni bakımından delesyonlu ırklarda spot ekimler göz önüne alındığında, kontrol grubundaki hücrelerin deney grubundakilere göre daha fazla yoğunlukta olması, tunikamisinin hücre canlılığına etkisi olduğunu düşündürdü. Bu gen bakımından delesyonlu ırklar apoptoz miktarı açısından ele alındığında, deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre bulunması bu genin, hücre ölümünde etkin bir rolü olduğunu gösterdi. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiki açıdan anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi, hücre morfolojilerinin daha bozuk olması ve nukleusun kutba yakın yerleşimi tunikamisinin hücrelerde yarattığı stresi göstermektedir.

SPBC8E4.04 genibakımından delesyonlu ırka ait deney grubunda kontrol grubuna göre apoptotik hücre sayısının daha çok olması ve hücre içi oksidasyon miktarı istatistiki açıdan anlamlı bulunan bu ırkta kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi, bu genin hücre canlılığında etkin bir rolü olduğunu işaret etmektedir. Deney grubuna ait hücrelerin daha büyük ve nukleusun kutba yakın olması tunikamisinin hücre morfolojisini değiştirdiğini göstermektedir. Spot ekimlere göre kontrol grubunda deney grubundan çok daha fazla canlı hücre bulunması, tunikamisinin hücre canlılığındaki etkisi konusunda fikir verebilmektedir. Karbonhidrat metabolizmasında rol alan bu gen bakımından delesyonlu hücrelerde tunikamisinin hücre metabolizmasına ve morfolojisine etkisinin fazla olduğunu ortaya koymaktadır.

rlc1 geni bakımından delesyonlu ırklara ait spot ekimler kıyaslandığında, kontrol grubunda deney grubuna göre daha fazla canlı hücre bulunması ve deney grubundaki hücrelerin üremelerinin oldukça düşük olması, tunikamisinin hücre canlılığına etkisi konusunda fikir verebilmektedir. Hücreler apoptoz miktarı açısından ele alındığında deney grubunda kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla apoptotik hücre bulunması bu genin, hücre canlılığında çok büyük etkisi olduğunu gösterdi. Deney gruplarında kontrol grubuna göre daha fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi tunikamisinin bu bakımından delesyonlu ırklarda hücresele reaktif oksijen miktarını çok fazla değiştirmedeğini ancak hücrelerin morfolojik olarak daha bozuk ve büyük olması ve ayrıca nukleusun kutba yakın konumda yer almasına bakılarak hücre metabolizmasını değiştirdiğini ve hücresele ölüm mekanizmalarını artırdığı ortaya konuldu.

SPAC688.03c geni bakımından delesyonlu ırklarda apoptotik hücrelere bakıldığında deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre bulunması tunikamisinin hücre ölümünü önemli ölçüde artırdığını gösterdi. Kontrol grubuna ait hücrelerin spot ekimleri, deney grubuna ait hücrelere göre daha fazla canlı hücre içermesi, canlılık üzerine etkisinin göstergesi sayılabilmektedir. Deney gruplarındaki hücre içi oksidasyon miktarı istatistiki açıdan anlamlı bulunan bu ırkta, kontrol grubuna göre daha çok reaktif oksijen birikimi ve daha uzun yapıda hücre morfolojisi bulunmaktadır. Bunun yanı sıra çok sayıda çift nukleuslu hücrelerin bulunması hücre bölünmesinin bloke edildiğini, bölünemediğinden dolayı hücrelerin uzamış olabileceğini ve apoptotik sürece yöneldiğini düşündürmektedir.

sec71 geni bakımından delesyonlu ırklar apoptoz miktarı açısından ele alındığında deney grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptotik hücre bulunması bu genin, hücre

ölümünde etkin bir rolü olduğunu göstermektedir. Deney gruplarında hücre içi oksidasyon miktarı istatistiksel açıdan anlamlı bulunmayan bu ırkta, kontrol grubuna göre biraz fazla reaktif oksijen birikimi görülmesi tunikamisinin bu bakımından delesyonlu ırklarda hücrel reaktif oksijen miktarını çok fazla değiştirmediği düşünölmektedir. Deney grubuna ait spot ekimlerde kontrol grubuna göre daha az canlı hücre bulunması, hücre canlılığı hakkında da ön bilgi verebilmektedir. Ayrıca kontrol grubundaki normal yapıdaki hücelere kıyasla deney grubu hücelerinin daha büyük ve koni şeklindeki morfolojik yapılar dönuşmeleri de hücel metabolik süreçlerin streten etkilendiğini göstermektedir.

Bu çalışmada yer alan birçok genin çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceği göröldü. *hnt3* geninin insanlardaki ortoloğu olan *APTX* geni ile ilgili çalışmalarda okömotor apraksi (*APTX* genindeki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkan otozomal resesif kalıtsal bir hastalık) ve ataksiye neden olan nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. *APTX* geni tarafından kodlanan Aprataxin proteini, DNA-tek-zincir kırılmalarının tamirinde rol almakta ve bu gen delesyona uğratıldığında DNA hasarı birikerek hücreyi ölüme sürökmektedir (Gong ve diğ., 2011). DNA onarım mekanizmasının engellenmesi ile hücelerin apoptotik sürece yöneldeği düşünölmektedir. *S. pombe*'de *hnt3* geni çalışmalarının artırılması, insanlarda nörodejeneratif, otozomal resesif ve monogenik (tek gen) hastalıkların aydınlatılmasında oldukça yararlı olacaktır. SPAC3H1.08c geni ortoloğu *MCUR1* geni (*Homo sapiens*) mitokondride kalsiyum geçişini düzenlemektedir. Mitokondriyal kalsiyum uniporter kompleksi oldukça seçici bir kalsiyum kanalıdır. Mitokondriyal kalsiyum homeostazı, hücre hayatta kalmasında ve ökaryotlarda aerobik metabolizmada kritik roller oynar. Aşırı Ca^{+2} birikimi, mitokondri iç zarını geçirgen hale getirir. Bu da apoptoz ile sonuçlanmaktadır ve insan patolojisindeki apoptotik özellikler neoplazmlar, otoimmün hastalıklar, inme, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve ailesel amiyotrofik lateral skleroz gibi bazı nörodejeneratif hastalıklarla ilgilidir (Yamamoto ve diğ., 2019). SPAC3H1.08c geninin fonksiyonunun ortaya koyulabilmesi için gerekli çalışmaların artırılması gerekmektedir. SPBC8D2.18c geni çalışmalarının artırılması, insanlardaki aminoasit metabolizması bozuklukları (örneğin, S-adenosilhomosistein hidrolaz eksikliği olan hipermetiyoninemi) gibi hastalıkların aydınlatılabilmesi için oldukça faydalı olabileceği sanılmaktadır. ER ve mitokondri zarları arasında moleküler ilişki, sadece lipid gibi metabolitlerin değişimini ve sinyalleşme süreçlerini kapsamaz, aynı zamanda kalsiyum sinyali, apoptoz, Alzheimer hastalığı patolojisi ve viral replikasyonda da rol oynamaktadır (Lahiri ve diğ., 2014). *S.*

pombe'deki *oca3* geninin Alzheimer gibi diğer nörodejeneratif hastalıkların moleküler mekanizmasının aydınlatılması için öncü olabileceğini düşündürmektedir. Bunun dışında Mg^{+2} , genomik stabilitenin sürdürülmesinde ve kanserojenliğin önlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, Mg^{+2} metabolizmasındaki değişikliklerin, tip 2 diabetes mellitus ve hipertansiyon gibi metabolik sendromlar dahil olmak üzere birçok önemli insan hastalığı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Cui ve diğ., 2015). *tbc13* geni hakkında yeterli çalışma olmamasına rağmen insanlardaki ortoloğunda (*TBC1D13* geni) insülin çalışılmış (Davey ve diğ., 2012) ve adipositlerdeki glikoz naklini uyardığı görülmüştür. Khan ve arkadaşlarının (2013) insanlarda prostat kanserinin ilerlemesinin metabolomik profili üzerine yaptığı çalışmada, pipekolat oksidazın sarkosini metabolize ederek prostat hücrelerinin onkojenik potansiyelini azalttığı görülmüştür. İnsanlardaki ortoloğu *PIPOX* geni olan *fap1* geni, özellikle kanser gibi hastalıkların araştırılmasında oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca Alzheimer, Parkinson ve Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar, proteinlerin yıkımı nedeniyle karşılaşılan hastalıklardır ve bu hastalıkların aydınlatılması için *S. pombe*'lerdeki *ubp2* geni çalışmalarının artırılması oldukça faydalı olacağı düşünülmektedir. Çeşitli kanser türleri (Meme kanseri, kalıtsal meme-yumurtalık kanseri sendromu, osteosarkom, prostat kanseri), monogenik hastalıklar, böbrek yetersizliği ve otozomal dominant hastalıklarının aydınlatılabilmesi için yapılacak çalışmalarda *S. pombe*'lerdeki *cds1* geni çalışmalarının artırılması oldukça yararlı olacağı tahmin edilmektedir. Bunun dışında, delesyonu hücre iskeleti organizasyonunun bozulmasına neden olan *rlc1* bakımından mutasyonlu hücrelerde, ER stresine neden olan tunikamisin antibiyotiğine maruz kaldığında meydana gelen metabolik ve morfolojik değişiklikler gösterildi ve *S. pombe*'deki *rlc1* geni çalışmalarının artırılması, insanlardaki miyopati ve kalp hastalıklarının aydınlatılmasında yararlı olacaktır. Bir diğer gen olan SPAC688.03c geni çalışmalarının artırılması, insanlardaki Alport sendromu gibi monogenik hastalıkların tedavilerinin geliştirilmesi için oldukça önemli olacağı varsayılmaktadır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular, bu genlerle ilişkili bazı yorumların yapılabilmesine olanak vermektedir. Bu genlerin yapısı ve işlevleri hakkında ilişkinin ortaya konulması açısından tam olarak açıklanabilmesi için başka araştırmaların da yapılabilmesi gerekecektir. Bunlar arasında gen anlatım düzeylerine bakılması, gen izolasyonu ve klonlanması yer alabilir. Çalışmada kullanılan mutantlara ait kontrol gruplarının morfolojik yapıları, pombase.org sitesindeki verilerle uyumaktadır. Ayrıca ROT seviyesi artan

hücrelerde antioksidan savunma sağlayan çeşitli gen ürünlerinin ekspresyonuna bakılması gerekebilir. Bu çalışmada, *S. pombe*'lerde bulunan genler hakkında daha detaylı bilgi edinilerek çalışmada yer alan genlerin fonksiyonel özellikleri ayrıntılı olarak incelenmiş ve bu genlerin insanlardaki diyabet, obezite ve nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilerine bakılmıştır. Ayrıca bu hastalıkların tedavileri için gereken moleküler mekanizmaların temelini aydınlatmak üzere tunikamisin antibiyotiğinin hücrelerde meydana getirdiği değişiklikler ve hücrelerin bu strese maruz kaldığında hayatta kalma süreçleri incelenmiştir. Bu tezde yapıldığı gibi, tunikamisin stresine maruz bırakılan *S. pombe*'lerde hücresel yanıtın moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik çalışmalar, hastalıkların moleküler düzeyde tedavileri için yeni fikirler oluşturacaktır.



KAYNAKLAR

- Ağuş, H.H., Sarp, C., Cemiloğlu, M., 2018, Oxidative stress and mitochondrial impairment mediated apoptotic cell death induced by terpinolene in *Schizosaccharomyces pombe*, *The Royal Society of Chemistry*, 7 (5), 848–58.
- Álvarez, V., Viñas, L., Gallego-Sánchez, A., Andrés, S., Sacristán, M.P., Bueno, A., 2016, Orderly progression through S-phase requires dynamic ubiquitylation and deubiquitylation of PCNA, *Scientific Reports*, 6;25513. <http://www.nature.com/srep>.
- Belužić, L., Grbeša, I., Belužić, R., Park, J.H., Kong, H.K., Kopjar, N., 2018, Knock-down of AHCY and depletion of adenosine induces DNA damage and cell cycle arrest, *Scientific Reports*, 8 (1), 14012.
- Boddy, M.N., Lopez-Girona, A., Shanahan, P., Interthal, H., Heyer, W.D., Russell P. 2000, Damage tolerance protein Mus81 associates with the FHA1 domain of checkpoint kinase Cds1, *Molecular and Cellular Biology*, 20 (23), 8758-66.
- Bravo, R, Vicencio J.M., Parra, V., Troncoso, R., Munoz, J.P., Bui, M., et al., 2011, Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress, *Journal of Cell Science*, 124:2143–52.
- Cardenas, M.E., Cruz, C., Del Poeta, M., Chung, N., Perfect, J.R. and Heitman, J., 1999, Antifungal Activities of Antineoplastic Agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System To Study Drug Action, *Clinical Microbiology reviews*, 12 (4), 583–611.
- Couplana, E., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Kabalac, A., Ezkurdiac, N., Gagneurb, J., et al., 2011, A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders, *PNAS*, 108, (29), 11989–94.
- Cui, Y., Zhao, S., Wang, J., Wang, X., Gao, B., Fan, Q., et al., 2015, A novel mitochondrial carrier protein Mme1 acts as a yeast mitochondrial magnesium exporter, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1863 (1), 30-39.
- Cummings, R., Esko, J., Stanley, P., Hart, G., Aebi, M., Darvill, A., Kinoshita, T., Packer, N., Prestegard, J., Schnaar, R., Seeberger, P., 2015, *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, Copyright 2015-2017 by The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.
- Çetinkaya, S., Dursun, H.G., 2016, Endoplazmik Retikulum Stresinde Hücre Sağkalım ve Ölüm Kararı, *Sakarya Tıp Dergisi*, 6 (2), 73-80.
- Daleya, J.M., Wilsonb, T.E., Ramotara, D., 2010, Genetic interactions between HNT3/Aprataxin and RAD27/FEN1 suggest parallel pathways for 5' end processing during base excision repair, *DNA Repair (Amst)*, 9 (6), 690-99.

- Davey, J.R., Humphrey, S.J., Junutula, J.R., Mishra, A.K., Lambright, D.G., James, D.E., et al., 2012, TBC1D13 is a RAB35 Specific GAP that Plays an Important Role in GLUT4 Trafficking in Adipocytes, *Traffic*, 13 (10), 1429-41.
- Deshpande, G.P., Hayles, J., Hoe, K.L., Kim, D.U., Park, H.O., Hartsuiker, E., 2009, Screening a genome-wide *S. pombe* deletion library identifies novel genes and pathways involved in genome stability maintenance, *DNA Repair (Amst)*, 8 (5), 672-79.
- Egel, R., 1994, Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*, *The Mycota*, 251-265.
- Egel, R., 2004, The Molecular Biology of *Schizosaccharomyces pombe*, Springer, ISBN: 978-3642056314.
- Fields, S., Johnston, M., 2005, Whither Model Organism Research?, *Science*, vol. 307, Issue 5717, 1885-86.
- Flood, F., Murphy, S., Cowburn, R.F., Lannfelt, L., Walker, B., Johnston, J.A., 2005, Proteasome-mediated effects on amyloid precursor protein processing at the γ -secretase site, *Biochemical Journal*, 385 (2), 545-50.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., Walter, P., 2013, Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5 (3), a013169.
- Gong, Y., Zhu, D., Ding, J., Dou, C.N., Ren, X., Gu, L., et al. 2011, Crystal structures of aprataxin ortholog Hnt3 reveal the mechanism for reversal of 5'-adenylated DNA, *Nature Structural & Molecular Biology*, vol. 18 (11).
- Goff, X.L., Motegi, F., Salimova, E., Mabuchi, I., Simanis, V., 2000, The *S. pombe rlc1* gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p, *Journal of Cell Science*, 113, 4157-63.
- Guydosh, N., Kimmig, P., Walter, P., Green, R., 2017, Regulated Ire1-dependent mRNA decay requires no-go mRNA degradation to maintain endoplasmic reticulum homeostasis in *S. pombe*, *Elife*, 25, (6), e29216.
- Hanner, A., Dunworth, M., Casero, R.A., MacDiarmid, C.W., Park, M.H., 2019, Elevation of cellular Mg^{2+} levels by the Mg^{2+} transporter, Alr1, supports growth of polyamine-deficient *Saccharomyces cerevisiae* cells, *Journal of Biological Chemistry*, 294 (45), 17131-42.
- Hayashi, T., Teruya, T., Chaleckis, R., Morigasaki, S., Yanagida, M., 2018, S-Adenosylmethionine Synthetase Is Required for Cell Growth, Maintenance of G0 Phase, and Termination of Quiescence in Fission Yeast, *iScience*, 5, 38-51.
- <http://biochem4.okstate.edu/~firefly/Bioch205/Bioch205clmfolder/b205clm23/proteinsynthesis.html>, Tunikamisinin ER'de GPT'yi inhibe etme mekanizması [Ziyaret tarihi:10.10.2019].

<https://micro.magnet.fsu.edu/cells/endoplasmicreticulum/endoplasmicreticulum.html>,
Endoplazmik retikulumun yapısı [Ziyaret tarihi:15.01.2020].

<http://tr.redsearch.org>, *S.pombe*'nin Yaşam Döngüsü [Ziyaret tarihi:18.10.2019].

<http://slideplayer.com/slide/14290345/>, Tunikamisinin GPT enzimini inhibe etmesi [Ziyaret tarihi:12.12.2019].

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 (17), 27002–9.

Kaufman R.J., 1999, Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls, *Genes & Development*, 13,1211–1233.

Kerr. J.F., Wyllie, A. H, Currie, A.H., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26,239-257.

Kimata, Y., Kohno, K., 2011, Endoplasmic reticulum stress-sensing mechanisms in yeast and mammalian cells, *Curr Opin Cell Biol.* 23(2):135-42.

Khan, A.,Rajendiran, T.M., Ateeq, B., Asangani, I.A., Athanikar, J.N., Yocum, A.K., et al. 2013, The Role of Sarcosine Metabolism in Prostate Cancer Progression, *Neoplasia*, 15, 491–501.

Klar, A.J.S., Bonaduce, M.J., 2013, Unbiased segregation of fission yeast chromosome 2 strands to daughter cells, *Chromosome Research*, 21, 297-309.

Knupp, J., Arvan, P., Chang, A., 2019, Increased mitochondrial respiration promotes survival from endoplasmic reticulum stres, *Cell Death & Differentiation- Nature*, 26, 487–501.

Lahiri, Sujoy., Chao, J.T., Tavassoli, S., Wong, A.K.O., Choudhary, V., Young, B.P., et al., 2014, Conserved Endoplasmic Reticulum Membrane Protein Complex (EMC) Facilitates Phospholipid Transfer from the ER to Mitochondria, *PLoS Biology*, 12 (10), e1001969.

Le Goff, X., Motegi, F., Salimova, E., Mabuchi, I., and Simanis, V., 2000, The *S. pombe* rlc1 gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins myo3p and myo2p, *Journal of Cell Science*, 113, 4157-63.

Leupold, U., 1950, Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*, *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg Série physiologique*, 24: 381–480.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951, Protein measurement with the folin phenol, *The Journal of Biological Chemistry*, 193 (1), 265-75.

Matsuyama et al., 2006, ORFeome cloning and global analysis of protein localization inthe fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature Biotechnology*, 24, 841-47.

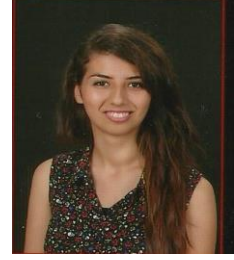
- Mirza Mohammad Reza Sharifmoghdam, 2009, *Role of Cfh3p in the morphogenesis of Schizosaccharomyces pombe*, Yüksek Lisans, Departamento de Microbiología y Genética Instituto de Microbiología Bioquímica Universidad de Salamanca/CSIC.
- Munoz, A. J., Wanichthanarak, K., Meza, E., and Petranovic, D., 2012, Systems biology of yeast cell death, *FEMS Yeast Research*, 12, 249–65.
- Özarabacı, İ., 2019, *Schizosaccharomyces pombe’de Endoplazmik Retikulum Stresi ile Apoptoz Arasındaki İlişki*, Yüksek Lisans, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Pajaniradje, S., Mohankumar, K., Pamidimukkala, R., Subramanian, S., Rajagopalan, R., 2014, Antiproliferative and Apoptotic Effects of Sesbania grandiflora Leaves in Human Cancer Cells, *BioMed Research International*, ID:474953,11.
- Palade G.E., 1956, The Endoplasmic Reticulum, *J Biophys Biochem Cytol*, 2, (4), 85-98.
- Paparatto, D., Fletcher, D., Piwowar, K., Baldino, K., Morel, C., Dunaway, S., 2009, The *Schizosaccharomyces pombe* checkpoint kinases Chk1 and Cds1 are important for cell survival in response to cisplatin, *PLoS One*, 4 (7), e6181.
- Pereira, E., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2003, Protection against oxidation during dehydration of yeast, *Cell Stress & Chaperones*, 8 (2), 120–24.
- Phillips, J.D., Schmitt, M.E., Brown, T.A., Beckmann, J.D., Trumpower, B.L., 1990, Isolation and characterization of QCR9, a nuclear gene encoding the 7.3-kDa subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex, An intron-containing gene with a conserved sequence occurring in the intron of COX4, *Journal of Biological Chemistry*, 265, 20813–21.
- Phillips, M., Voeltz, G., 2016, Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17, 69–82.
- Pisat, N. P., Pandey, A., MacDiarmid, C. W., 2009, MNR2 Regulates Intracellular Magnesium Storage in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics*, 183, 873–84.
- Sabatinos, S.A., Forsburg, S.L., 2010, Molecular genetics of *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods in Enzymology*, 470, 759–795.
- Schwarz, D.S., and Blower, M.D., 2016, The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 79–94.
- Shaabani, N., Honke, N., Lang, P.A., Görg, B., Proksch, P., Gailus, N., et al. 2012, Tunicamycin Inhibits Diabetes, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 29 (3-4), 595-602.
- Shurtleff, M., Itzhak, D., Hussmann, J.A., Schirle., Oakdale, N.T., Costa, E.A., Jonikas, M., et al., 2018, The ER membrane protein complex interacts cotranslationally to enable biogenesis of multipass membrane proteins, *eLife*, 7, e37018.

- Smith, M.H., Ploegh, H.L., Weissman, J.S., 2011, Road to ruin: Targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum, *Science*, 334, 1086–90.
- Sousa, C.A., Soares, H., Soares, E., 2019, Nickel Oxide Nanoparticles Trigger Caspase- and Mitochondria-Dependent Apoptosis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Chemical Research in Toxicology*, 32 (2), 245–54.
- Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A., 2006, Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, National University of Ireland, Galway, Ireland. *Embo reports review*, 7 (9), 880-85.
- Takatsuki, A., Arima, K., Tamura, G., 1971, Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin, *The Journal of antibiotics*, 24 (4), 215-23.
- Tashiro, E., 2019, Screening and identification of inhibitors of endoplasmic reticulum stress-induced activation of the IRE1 α -XBP1 branch, *The Journal of Antibiotics*, 72, 899–905.
- Tomatır, A.G., 2003, Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü, *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 3 (6), 499-508.
- Tran, D.M., Takagi, H., Kimata, Y., 2019, Categorization of endoplasmic reticulum stress as accumulation of unfolded proteins or membrane lipid aberrancy using yeast *Ire1* mutants, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 83 (2), 326-29.
- Ui, M., Okada, T., Hazeki, K., Hazeki, O., 1995, Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase, *Trends in Biochemical Sciences*, 20 (8), 303-07.
- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., 1999, *Essentials of Glycobiology*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN-10: 0-87969-559-5.
- Walter, P, Ron, D., 2011, The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation, *Science*, 334:1081-86.
- Waterborg, J.H., 2002, The Lowry method for proteins quantitation. In: Walker JM (ed) *The protein protocols handbook*, Humana Press, Totowa, NJ, 7–9.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., 2002, The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*, *Nature*, 415 (6874), 871–80.
- Xiao, H., Smeekens, J.M., & Wu, R., 2016, Quantification of tunicamycin-induced protein expression and N-glycosylation changes in yeast, *The Analyst*, 141 (12), 3737–45.
- Xiong, L., Zhang, L., Yang, Y., Li, N., Lai, W., Wang, F., et al. 2019, ER complex proteins are required for rhodopsin biosynthesis and photoreceptor survival in *Drosophila* and mice, *Cell Death & Differentiation*. volume 27, 646–61.

- Xu, Y.J., Kelly, T.J., 2009, Autoinhibition and Autoactivation of the DNA Replication Checkpoint Kinase Cds1, *The Journal of Biological Chemistry*, 284 (23), 16016–27.
- Yamamoto, K., Ichikawa, S., 2019, Tunicamycin: chemical synthesis and biosynthesis, *The Journal of Antibiotics*, 72, 924–33.
- Yoshida, N., Akazawa, S.I., Katsuragi, T., Tani, Y., 2004, Characterization of Two Fructosyl-Amino Acid Oxidase Homologs of *Schizosaccharomyces pombe*, *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 97 (4), 278–280.
- Yoshida, N., Akazawa, S., Karino, T., Ishida, H., Hata, Y., Katsuragi, T., et al. 2007, Functional Analysis of Genes Encoding Putative Oxidoreductases in *Aspergillus oryzae*, Which Are Similar to Fungal Fructosyl-Amino Acid Oxidase, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (5), 424–27.
- 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 Medicinal Sciences*, 47, 77-95.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Merve YEMENİCİ
Doğum Yeri	Sakarya
Doğum Tarihi	18.11.1992
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	
E-Posta Adresi	mervedalms@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi
Fakülte	Fen-Edebiyat Fakültesi
Bölümü	Moleküler Biyoloji ve Genetik
Mezuniyet Yılı	2015

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

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Anabilim Dalı Adı
Programı	Program Adı

Makale ve Bildiriler	